



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

(11) PI 0906429-0 B1



(22) Data do Depósito: 09/01/2009

(45) Data de Concessão: 03/08/2021

(54) Título: MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UMA INFECÇÃO POR E. CHAFFEENSIS EM UM INDIVÍDUO, USO DE UM OU MAIS POLIPEPTÍDEO SINTÉTICO E KIT

(51) Int.Cl.: C07K 14/29; C07K 16/12.

(30) Prioridade Unionista: 10/01/2008 US 61/020,379.

(73) Titular(es): RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION.

(72) Inventor(es): JERE W. MCBRIDE; TIAN LUO.

(86) Pedido PCT: PCT US2009030527 de 09/01/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/102509 de 20/08/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/07/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE POLIPEPTÍDEO, ANTICORPO, MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UMA INFECÇÃO DE E. CHAFFEENSIS EM UM INDIVÍDUO E KIT COMPREENDENDO A REFERIDA COMPOSIÇÃO DE POLIPEPTÍDEO. A presente invenção refere-se a composições imunorreativas de VLPT para E. chaffeensis e composições relacionada a esta, incluindo vacinas, anticorpos, polipeptídeos, peptídeos, e polinucleotídeos. Em particular, epítopes para VLPT de E. chaffeensis são descritos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UMA INFECÇÃO POR *E. CHAFFEENSIS* EM UM INDIVÍDUO, USO DE UM OU MAIS POLIPEPTÍDEO SINTÉTICO E KIT".

[0001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório Nº de Série 61/020.379, depositado em 10 de janeiro de 2008, que é incorporado por referência aqui em sua totalidade.

[0002] A presente invenção foi produzida pelo menos em parte por fundos dos Institutos Nacionais de Saúde R01 AI 071145-01. O Governo dos Estados Unidos tem certos direitos nesta invenção.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A presente invenção refere-se pelo menos aos campos de biologia molecular, biologia de célula, patologia, e medicina, incluindo medicina veterinária. Em aspectos específicos, a presente invenção refere-se a composições de VLPT imunorreativas em *E. chaffeensis*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0004] *Ehrlichia chaffeensis* é uma bactéria intracelular obrigatoriamente por carrapato que causa erlichiose monocitotrópica humana (HME), uma doença que ameaça a vida emergente em humanos e também causa doença branda à severa em canídeos selvagens e domésticos. (Paddock e Childs, 2003). Os genomas de *E. canis* e outros organismos no gênero, incluindo *E. chaffeensis* e *E. ruminantium*, exibem um alto grau de "sinteny" genómica, famílias de proteína paralogas, uma grande proporção de proteínas com espirais de transmembrana e/ou sequências de sinal, e uma inclinação única de serina-treonina associada com potencial para O-glicosilação e fosforilação, e tem repetições em tandem e domínios de ankyrin em proteínas associadas com interações hospedeiro-patogenia (Collins *et al.*, 2005; Dunning Hotopp *et al.*, 2006; Frutos *et al.*, 2006; Mavromatis *et al.*, 2006). Um pequeno subconjunto das mais de 900 proteínas

codificadas por cada um destes genomas são reconhecidos pelo anticorpo (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000). Várias das proteínas imunorreativas maiores identificadas e molecularmente caracterizadas são glicoproteínas ricas em serina que são secretadas. Muitos destas glicoproteínas têm repetições em tandem; contudo, têm numerosos domínios de ankyrin similares a eucarionte (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000; Nethery *et al.*, 2005; Singu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2000).

[0005] Três proteínas imunorreativas com repetições em tandem foram identificadas e molecularmente caracterizadas em *E. chaffeensis* (gp120, gp47, e VLPT), bem como dois ortólogos em *E. canis* (gp140 e gp36, respectivamente). *E. chaffeensis* gp120 e gp47 são proteínas imunorreativas maiores que são diferencialmente expressas em ehrlichiae de núcleo de densa superfície e são secretadas (Doyle *et al.*, 2006; Popov, *et al.* 2000). A variabilidade extensiva no número e/ou sequência de repetições em tandem nas proteínas imunorreativas de *E. chaffeensis* (gp120, gp47 e VLPT), bem como *E. canis* gp36 é bem documentado (Chen *et al.*, 1997; Doyle *et al.*, 2006; Sumner *et al.*, 1999). O gp120 contém duas a cinco TRs ricas em serina quase idênticas com 80-aminoácidos cada, e gp47 tem TRs ricas em serina carboxi-terminal que variam em número e sequência de aminoácido entre isolados diferentes de cada espécie. Epítopos de anticorpo maiores ambos gp120 e gp47 foram mapeados para estas TRs acídicas ricas em serina. (Doyle *et al.*, 2006; Yu *et al.* 1996; Yu *et al.* 1997). Similarmente, as VLPT tem três a seis TRs ricas em serina não idênticas (30 aminoácidos); contudo, o ortólogo de *E. canis* (gp19) carece de TRs múltiplas. A presença de repetições em tandem em ambas regiões de codificação e não codificação do genoma foi ligada a um processo ativo de expansão e redução de genomas ehrlichiais (Frutos *et al.*, 2006) e é considerada uma fonte maior de mudança genômica e instabilidade

(Bzymek e Lovett, 2001). O gene de *E. chaffeensis* VLPT também exibe variações no número de repetições em tandem de 90-bp (2 a 6) e foi utilizado como um alvo de diagnóstico molecular e para diferenciação de isolados (Sumner *et al.*, 1999; Yabsley *et al.*, 2003).

[0006] Recentemente, uma proteína imunorreativa maior fortemente acídica de 19-kDa de *E. canis* foi identificada (gp19), tendo a mesma localização cromossomal relativa e homologia substancial em domínio rico em cisteína-tirosina C-terminal conforme anteriormente reportado para proteína de VLPT em *E. chaffeensis*. Contudo, enquanto *E. chaffeensis* VLPT é imunorreativo, pouco é conhecido com relação a sua localização celular, função e papel no desenvolvimento de imunidade protetora. A massa molecular de VLPT nativa é também desconhecida. Foi sugerido que cepa de *E. chaffeensis* Arkansas era de 44 –kDa, mas proteínas imunorreativas com esta massa não foram reportadas (Sumner *et al.* 1999). A VLPT de *E. chaffeensis* Arkansas é uma proteína de 198 aminoácidos que tem quatro repetições (30 aminoácidos) e tem uma massa molecular aproximadamente dobrada que se prognostica por sua sequência de aminoácido (Sumner *et al.*, 1999). A proteína de VPT de *E. chaffeensis* parece ter modificação pós-traducional consistente com outras glicoproteínas ehrlichiais descritas, mas a presença de carboidrato na VLPT não foi demonstrada.

[0007] Definindo-se as características moleculares de imunodeterminantes ehrlichiais envolvidas na indução de imunidade humoral durante infecção é importante para compreensão da base de imunidade a espécies de *Ehrlichia*. A presente invenção preenche uma necessidade na técnica pela provisão de novos métodos e composições concernentes à infecção ehrlichial em mamíferos, e, em particular, proporciona métodos e composições que utilizam VLPT de *E. chaffeensis*.

RESUMO DA INVENÇÃO

[0008] Ehrlichiose monocitrotópica humana (HME) é uma doença proveniente de carrapato causada pela bactéria intracelular favorecida por *Ehrlichia chaffeensis*. Em geral, a presente invenção refere-se a composições ehrlichiais e métodos de fabricação e uso das mesmas. Nas concretizações específicas, a invenção refere-se a composições imunogênicas, incluindo, por exemplo, antígenos imunoprotetores como vacinas para doenças ehrlichiais, tal como vacinas de subunidade, por exemplo. A composição imunogênica pode ser empregada a qualquer mamífero, incluindo, por exemplo, humanos, cães, gatos, cavalos, porcos, cabras ou ovelhas.

[0009] *Ehrlichia chaffeensis* e *E. canis* têm um pequeno subconjunto de proteínas contendo repetição em tandem (TR) que induzem fortes respostas imunes de hospedeiro e são associadas com interação de hospedeiro-patogenia. Previously, uma proteína imunorreativa maior altamente conservada de 19-kDa (gp19) de *E. canis* foi caracterizada e a proteína alvo de PCR de comprimento variável ortóloga (VLPT) contendo TR correspondente em *E. chaffeensis* foi identificada. Em uma concretização desta invenção, a proteína de VLPT nativa de 32-kDa é identificada e os imunodeterminantes definidos de modo a definir adicionalmente a base molecular da resposta imune de hospedeiro a *E. chaffeensis*. Polipeptídeos sintéticos e/ou recombinantes correspondentes a várias regiões de VLPT foram usados para localizar epítópos de anticorpo maiores à região contendo TR. Epítópos de anticorpo maiores foram identificados nas três repetições não idênticas (R2, R3 e R4), que reagem fortemente com anticorpos nos soros de um cão infectado com *E. chaffeensis* e pacientes de HME. VLPT-R3 e VLPT-R2 reagem mais fortemente com anticorpo, e o epítopo foi adicionalmente localizado a uma região de 17 aminoácidos próximos quase idêntica comum entre estas repetições que eram específicas de espécie. O epítopo em R4 era distinto daquele de R2 e

R3 e foi encontrado para ter dependência conformacional. A VLPT foi detectada nos sobrenadantes de células infectadas, indicando que a proteína foi secretada. A VLPT foi localizada em ambas células reticuladas e de núcleo denso, e foi encontrada extracelularmente na matriz fibrilar de mórula e associada com a membrana de mórula.

[00010] Em certos aspectos da invenção, existe identificação e caracterização da VLPT de glicoproteína imunorreativa maior em *E. chaffeensis*, o ortólogo do *E. canis* gp19. O *E. canis* gp19 carece de repetições em tandem presentes na VLPT de *E. chaffeensis*, mas as duas proteínas exibem similaridade substancial de aminoácido (59%) em uma região carboxila terminal rica em cisteína/tirosina, e ambos os genes têm a mesma localização cromossomal relativa. Foi verificado que carboidrato nas proteínas contendo TR ehrlichial recombinante exibem mais do que massas prognosticadas às suas contrapartes nativas. A VLPT exibe uma massa mais do que prognosticada por eletroforese de gel, uma descoberta que é observada com ambas proteínas de VLPT nativas e recombinantes. Resíduos de serina e treonina são locais de ligação para O-glicanos, e alguns destes aminoácidos foram prognosticados para serem locais de fixação de glicano na VLPT. Contudo, diferente de outras proteínas ehrlichiais, o carboidrato não encontrado na VLPT, e a massa (conforme determinado por MALDI-TOF) de duas repetições recombinantes contendo fragmento (VLPT-R32; a combinação de repetições R3 e R2) foi consistente com sua massa prognosticada confirmando a migração anormal não foi devido à modificação pós-traducional de repetições em tandem de VLPT. Em uma concretização alternativa, contudo, a VLPT é pós-traducionalmente modificada. A VLPT é uma proteína altamente acídica, que em certas concretizações se relaciona ao aumento na mobilidade eletroforética. Em concretizações específicas, o teor de aminoácido acídico alto e pl total baixo (3,8) de VLPT se relaciona a seu

comportamento eletroforético e, em particular, casos contribuem para o comportamento anômalo de outras proteínas ehrlichiais contendo TR altamente acídicas.

[00011] Em aspectos específicos da presente invenção, existem composições de polipeptídeo de VLPT ehrlichiais (ou composições de polinucleotídeo que codificam toda ou parte delas) com uma ou mais das seguintes características: 1) comprehende uma ou mais porções, que em concretizações específicas comprehende parte de um epítopo determinante; 2) comprehende uma ou mais das porções, tal como um epítopo, que são imunogenicamente específica de espécie; 3) é liberada extracelularmente, tal como por secreção; 4) comprehende epítopos de célula B maiores; 5) é exposta à superfície; 6) é associada com as formas de núcleo denso infecciosas de ehrlichiae, tal como na superfície, por exemplo; e 7) é associada com fibrilas de mórula (microcolônias de forma de ehrlichiae dentro de vacúolos celulares (morulae) que abriga muitas ehrlichiae individuais). Em outros aspectos, composições de polipeptídeo recombinantes da presente invenção podem ser empregadas como uma composição imunogênica, incluindo, por exemplo, uma vacina.

[00012] Em concretizações particulares da invenção, existem composições imunogênicas de VLPT de *E. chaffeensis* que comprehendem uma sequência de aminoácido que é imunogênica, e, em concretizações particulares adicionais, a imunogenicidade é caracterizada por ser pelo menos parte de um epítopo. Em outras concretizações, a sequência de aminoácido comprehende pelo menos parte de uma composição de vacina contra um organismo ehrlichial, tal como *E. chaffeensis*. Em concretizações específicas, a sequência de aminoácido comprehende serinas, treoninas, e/ou, opcionalmente, alanina, prolina, valina, e/ou ácido glutâmico.

[00013] Em concretizações adicionais específicas, uma sequência de

aminoácido da invenção, por exemplo, uma sequência de aminoácido imunogênica, comprehende parte ou toda da seguinte sequência exemplar: SDSHEPSHLELPSLSEEVIQLESDLQQSSN (SEQ ID NO: 3); sequência exemplar: SDLHGSFSVELFDPFKEAVQLGNLQQSSD (SEQ ID NO: 4); sequência exemplar: SDLHGSFSVELFDPFKEAVQLGNLQQSSD (SEQ ID NO: 5); sequência exemplar: SDLHGSFSVELFDPFKE (SEQ ID NO: 8) sequência exemplar: HGSFSVELFDPFKE (SEQ ID NO: 9); sequência exemplar: HGSFSVELFDPFKEAVQ (SEQ ID NO: 10); ou sequência exemplar: HGSFSVELFDPFKEAVQLGN (SEQ ID NO: 11). Em concretizações adicionais, a sequência de aminoácido é comprehendida em um excipiente farmaceuticamente aceitável, que em alguns aspectos da invenção comprehende um adjuvante. Em certos aspectos da invenção, existe um polinucleotídeo comprehendendo SEQ ID NO:16

(tttatatttatatatgattaatataatgataatggtatgtgttataactgcttattagttgatcatgtacctgtgttatgttaatagggtat
aaatatgtcacaattctctgaagataatatggtaatataacaatgcctttgattctgattcacatgagcccttcacatcttgagctacatgc
tttctgaagaagtgattcaatttagagagtgatctacaacaatcttcaattctgatttacacggctttctgttgagttatgtatccctttaa
gaagcagttcaattgggaatgatctacaacaatcttctgatttacacggctttctgttgagttatgtatcccttaaagaaga
agtcaattggagagtgtatctacaacaatcttcaattctgatttacacggctttctgttgagttatgtatcccttccaaagaagaagttc
aattcgaagatgtatcttcaatttgcataatggacaagaccatgttagttatctgatttaggcttattgttaggtgttttagtacaatg
aatttttgtctggttatacaccgtattatcatcattattgttgttataatccttattattttgttattgttactccagatttgtcatcactgt
agtgaaagttagtttaggtatgttagaaatataatggttgtgacttcacaaaagggttagtttatatgtttatgtttatgtttatgttt
ataaggatatgagttgtttactatttt) que codifica a sequência de peptídeo de SEQ ID NO:1

(MSQFSEDNMGNIQMPFDSDSHEPSHLELPSLSEEVIQLESDLQQSSNSDLHGSFSVEL
FDPFKEAVQLGNLQQSSSDLHGSFSVELFDPKKEEVQLESDLQQSSNSDLHESSFV
ELPGPSKEEVQFEDDAKVVYQGDHVSLSELGLLGGVFSTMNYLSGYTPYYYHHY
CCYNPYYYFDYVTPDYCHHCSESSLE).

[00014] Em certas concretizações da presente invenção, existem composições imunogênicas de VLPT *E. chaffeensis*, e sequências particulares das composições de VLPT podem conceder sua imunogenicidade; por exemplo, uma região da composição de VLPT pode comprehender um epítopo.

[00015] Em alguns aspectos da invenção, cepas de *E. chaffeensis* diferentes múltiplas compreendem composições de VLPT imunogênicas, e existe identidade de sequência significante entre as cepas nas regiões das composições de VLPT que compreendem o epítopo (tais como maiores do que cerca de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%, por exemplo). Contudo, em algumas concretizações, pode existir identidade de sequência significante entre as cepas em regiões das composições de VLPT que não compreendem o epítopo. Em aspectos particulares da invenção, existe uma composição de VLPT que é imunogênica para mais do que uma cepa de *E. chaffeensis*, e, em aspectos particulares, o epítopo de uma das cepas é ou compreende ou consiste essencialmente em ou consiste em SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11, embora outros epítopos possam também serem identificados. Em concretizações nas quais um epítopo de VLPT *E. chaffeensis* alternativo é identificado, pode ser provida uma composição imunogênica compreendendo uma mistura de epítopos de VLPT *E. chaffeensis*, tais como uma mistura incluindo SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11, por exemplo.

[00016] Em uma concretização da invenção, existe uma glicoproteína imunogênica de VLPT *E. chaffeensis*. Em uma concretização adicional da invenção, existe uma composição de *E. chaffeensis* compreendendo SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11. Em aspectos específicos da invenção, a composição compreende adicionalmente um excipiente farmaceuticamente aceitável. A composição pode ser adicionalmente definida como compreendendo uma ou mais das porções de carboidrato, como compreendendo parte ou todo de um epítopo, e/ou como uma vacina, tal como uma vacina de subunidade.

[00017] Em outra concretização da invenção, existe uma composição de *E. chaffeensis* compreendendo um polipeptídeo codificado por pelo menos parte do polinucleotídeo de SEQ ID NO:16 e/ou uma composição de *E. chaffeensis* compreendendo um polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em uma concretização da invenção, existe uma composição isolada compreendendo uma glicoproteína de VLPT de *Ehrlichia*, compreendendo: (a) uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; ou (b) uma sequência que é pelo menos cerca de 70% idêntica a uma ou mais sequências em (a). A composição pode ser adicionalmente definida como uma sequência que é pelo menos cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, ou cerca de 95% idêntica a uma ou mais sequências em (a). A composição pode também ser adicionalmente definida como sendo compreendida em um excipiente farmaceuticamente aceitável, como compreendendo uma ou mais porções de carboidrato, e/ou como sendo compreendida em uma composição farmaceuticamente aceitável como uma vacina.

[00018] Em uma concretização específica, existe um polinucleotídeo isolado que codifica SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11, ou uma mistura destas.

[00019] Em concretizações particulares, existe um polinucleotídeo isolado, compreendendo: a) um polinucleotídeo que codifica SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; ou b) um polinucleotídeo que é pelo menos cerca de 90% idêntico ao polinucleotídeo de a) e que codifica um polipeptídeo imunorreativo de *E. chaffeensis* VLPT.

[00020] Em uma concretização adicional da invenção, existe um polipeptídeo isolado, compreendendo: a) SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4;

SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11, ou b) um polipeptídeo de VPPT que é pelo menos cerca de 70% idêntico a SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11, e que compreende atividade imunogênica. Em uma concretização específica, o polipeptídeo é compreendido em um excipiente farmaceuticamente aceitável, e/ou pode ser adicionalmente definido como sendo compreendido em uma composição farmacêutica aceitável como uma vacina.

[00021] Em certos aspectos da invenção, existem polinucleotídeos que são amplificáveis por um ou mais primeiros exemplares de SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, ou SEQ ID NO:22 (tabela 4.)

[00022] Em outro aspecto da invenção, existem anticorpos isolados que se ligam a um ou mais polipeptídeos da invenção. Os anticorpos podem ser monoclonais, policlonais, ou fragmentos de anticorpo, por exemplo. Em concretizações particulares, o anticorpo que se liga seletivamente a um epítopo de VLPT, por exemplo, uma que compreende SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11. Em concretizações específicas, o anticorpo pode ser referido como reagindo imunologicamente com um ou mais polipeptídeos da invenção.

[00023] Em uma concretização adicional da invenção, existe um método de provisão de resistência à infecção de *E. chaffeensis*, compreendendo a etapa de distribuir uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição da invenção, tal como anticorpo de VLPT, polipeptídeo, e/ou polinucleotídeo, ao indivíduo.

[00024] Em outra concretização, existe um método de induzir uma resposta imune em um indivíduo, compreendendo a etapa de distribuir ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um

polipeptídeo de VLPT da invenção. Em uma concretização adicional da presente invenção, existe um método de inibir ou prevenir infecção de *E. chaffeensis* em um indivíduo compreendendo as etapas de: identificar um indivíduo antes da exposição ou suspeita de ser exposto a ou infectado com *E. chaffeensis*; e administrar um polipeptídeo, anticorpo, e/ou polinucleotídeo da invenção em uma quantidade eficaz para inibir infecção de *E. chaffeensis*.

[00025] Os polinucleotídeos da invenção podem ser compreendidos em um vetor, tal como um vetor viral ou um vetor não viral, no qual o vetor viral pode ser um vetor adenoviral, um vetor retroviral, um vetor lentiviral, um vetor adeno-associado, um vetor de vírus herpes, ou um vetor de vírus de vacinia e no qual o vetor não viral pode ser um plasmídeo. Em aspectos adicionais da invenção, o vetor compreende um promotor operavelmente ligado ao polinucleotídeo no qual o promotor é operável em um procarionte, um eucarionte, ou ambos. O polinucleotídeo da invenção pode ser compreendido em um lipossomo e/ou compreendido em um excipiente farmaceuticamente aceitável.

[00026] Em certos aspectos da invenção, existe um anticorpo isolado que reage imunologicamente a um polipeptídeo da invenção, e o anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, pode ser compreendido em antissoros policlonais, ou pode ser um fragmento de anticorpo, por exemplo.

[00027] Em outras concretizações da invenção, existe um método de induzir uma resposta imune em um indivíduo, compreendendo a etapa de distribuir ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição da invenção, tais como um polipeptídeo, anticorpo e/ou polinucleotídeo.

[00028] Em concretizações adicionais da invenção, existe um método de inibir infecção de *E. chaffeensis* em um indivíduo compreendendo as etapas de: identificar um indivíduo antes da

exposição ou suspeito de ser exposto a ou infectado com *E. chaffeensis*; e administrar o polipeptídeo da invenção em uma quantidade eficaz para inibir infecção de *E. chaffeensis*. Em concretizações adicionais da invenção, existe um método de identificar uma infecção de *E. chaffeensis* em um indivíduo, compreendendo a etapa de ensaiar uma amostra a partir do indivíduo para um anticorpo, polipeptídeo, e/ou polinucleotídeo da invenção.

[00029] Em aspectos específicos da invenção, um polipeptídeo é adicionalmente definido como sendo de 10 a 11 aminoácidos de comprimento, sendo de 10 a 12 aminoácidos de comprimento, sendo de 10 a 13 aminoácidos de comprimento, sendo de 10 a 14 aminoácidos de comprimento, sendo de 10 a 15 aminoácidos de comprimento, sendo de 10 a 17 aminoácidos de comprimento, de 10 a 20 aminoácidos de comprimento, de 10 a 25 aminoácidos de comprimento, sendo de 14 a 20 aminoácidos de comprimento, sendo de 14 a 25 aminoácidos de comprimento, sendo de 14 a 27 aminoácidos de comprimento, sendo de 14 a 30 aminoácidos de comprimento, de 15 a 30 aminoácidos de comprimento, sendo de 16 a 20 aminoácidos de comprimento, sendo de 16 a 25 aminoácidos de comprimento, sendo de 16 a 30 aminoácidos de comprimento, sendo de 17 a 20 aminoácidos de comprimento, sendo de 17 a 25 aminoácidos de comprimento, sendo de 17 a 30 aminoácidos de comprimento, sendo de 20 a 25 aminoácidos de comprimento, sendo de 20 a 27 aminoácidos de comprimento, sendo de 20 a 30 aminoácidos de comprimento, de 24 a 30 aminoácidos de comprimento, de 24 a 35 aminoácidos de comprimento, de 24 a 40 aminoácidos de comprimento, de 24 a 45 aminoácidos de comprimento, de 24 a 50 aminoácidos de comprimento, de 24 a 55 aminoácidos de comprimento, de 24 a 60 aminoácidos de comprimento, de 24 a 65 aminoácidos de comprimento, de 24 a 70 aminoácidos de comprimento, de 24 a 75 aminoácidos de comprimento, de 24 a 80 aminoácidos de comprimento, de 24 a 85

aminoácidos de comprimento, de 24 a 90 aminoácidos de comprimento, de 24 a 95 aminoácidos de comprimento, de 24 a 100 aminoácidos de comprimento, sendo de 30 a 50 aminoácidos de comprimento, sendo de 30 a 45 aminoácidos de comprimento, ou sendo de 30 a 55 aminoácidos de comprimento, por exemplo.

[00030] Em concretizações particulares, um polipeptídeo da invenção é pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, ou 75 ou mais aminoácidos de comprimento. Em certos aspectos da invenção, um polipeptídeo da invenção é não mais do que 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, ou 75 aminoácidos de comprimento.

[00031] Variantes de polipeptídeos compreendendo SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11, podem ser definidas como sendo pelo menos 80% idêntico a SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; como sendo menos 85% idêntico a SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; como sendo pelo menos 90% (ou 91%, ou 92%, ou 93%, ou 94%) idêntico a SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; ou como sendo pelo menos 95% (ou 96%, ou 97%, ou 98%, ou 99%) idêntico a SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11.

[00032] Em uma concretização adicional, existe uma composição compreendendo: (a) um peptídeo tendo SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; ou (b) uma variante do peptídeo de (a), no qual a variante é pelo menos 75% idêntico a SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ

ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11, no qual a composição é capaz de induzir uma reação imune em um indivíduo. Em uma concretização específica, existe um peptídeo de 14 a 30 aminoácidos de comprimento. Em uma concretização específica, existe uma variante adicionalmente definida como sendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% idêntico a SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11.

[00033] Uma composição da invenção pode ser definida como tendo atividade que proporciona imunidade contra *Ehrlichia chaffeensis* para um indivíduo. Uma composição da invenção pode ser definida como tendo atividade que induz uma reação imune contra *Ehrlichia chaffeensis* para um indivíduo. As composições da invenção incluem qualquer polipeptídeo, peptídeo, polinucleotídeo, e/ou anticorpo provido aqui.

[00034] As moléculas de ácido nucleico podem ser adicionalmente definidas como sendo compreendidas em um vetor, tal como um vetor viral ou um vetor não viral, no qual o vetor viral pode compreender vetor adenoviral, um vetor retroviral, ou um vetor viral adeno-associado. A molécula de ácido nucleico pode ser compreendida em um lipossomo.

[00035] Em concretizações específicas, existe um anticorpo isolado que reage imunologicamente com uma ou mais das sequências de aminoácido selecionadas a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; e SEQ ID NO:11. Em concretizações adicionais específicas, o anticorpo é um anticorpo monoclonal, é compreendido em antisoros policlonais, ou é um fragmento de anticorpo.

[00036] Em uma concretização adicional, existe um método de produzir um polipeptídeo, compreendendo: provisão de uma célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo da invenção e cultivo

da célula sob condições adequadas para a célula hospedeira expressar o polinucleotídeo para produzir o polipeptídeo codificado. O método pode adicionalmente compreender isolar o polipeptídeo.

[00037] Em uma concretização adicional da invenção, existe um método de induzir uma resposta imune em um indivíduo, compreendendo a etapa de distribuir ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição da invenção.

[00038] Em uma concretização adicional da invenção, existe um método de inibir infecção de *E. chaffeensis* em um indivíduo, compreendendo a etapa de administrar ao indivíduo antes da exposição ou suspeita de ser exposto a ou infectado com *E. chaffeensis*, uma quantidade eficaz de uma composição da invenção.

[00039] Em uma concretização adicional da invenção, existe um método de identificar uma infecção de *E. chaffeensis* em um indivíduo, compreendendo a etapa de ensaiar uma amostra do indivíduo para um ou ambos dos seguintes: (a) um polipeptídeo de SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11, ou uma mistura das mesmas; ou (b) um anticorpo que reage imunologicamente com uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11. Em concretizações específicas, o anticorpo de (b) reage imunologicamente com uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11. Em aspectos específicos, ensaiar uma amostra para um anticorpo é adicionalmente definida como ensaiar para um anticorpo por ELISA, tal como por permitir ensaiar para um ou mais anticorpos de *E. chaffeensis* outros que não o anticorpo de (b).

[00040] Em uma concretização da invenção, existe um kit, compreendendo uma ou mais das seguintes composições: (a) um

polipeptídeo isolado compreendendo SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; (b) um polipeptídeo isolado que é pelo menos 70% idêntico a um polipeptídeo de (a); (c) um polipeptídeo isolado compreendendo SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; (d) um polipeptídeo isolado que é pelo menos 70% idêntico a SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11; (e) um anticorpo isolado que reage imunologicamente com uma ou mais das sequências de aminoácido selecionadas a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11. Em uma concretização específica, o kit é adicionalmente definido como compreendendo duas ou mais das composições.

[00041] Em uma concretização da presente invenção, existe uma composição de polipeptídeo, compreendendo uma ou mais dos seguintes: (a) um polipeptídeo isolado compreendendo uma ou mais sequências de aminoácido selecionadas a partir do grupo consistindo em: SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; e SEQ ID NO:11; ou (b) um polipeptídeo isolado que é pelo menos 95% idêntico a um polipeptídeo de (a). Em uma concretização específica, o polipeptídeo isolado é disperso em um diluente farmaceuticamente aceitável. Em outra concretização específica, o polipeptídeo de (a) compreende a sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, e SEQ ID NO:5. Em uma concretização adicional específica, o polipeptídeo de (a) compreende a sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em: SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; ou SEQ ID NO:11.

[00042] Em uma concretização adicional da invenção, existe um

anticorpo isolado que reage imunologicamente com uma ou mais das sequências de aminoácido selecionadas a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; e SEQ ID NO:11. Em uma concretização específica, o anticorpo é um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal.

[00043] Em outra concretização da invenção, existe um método de induzir uma resposta imune em um indivíduo, compreendendo a etapa de distribuir ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição da invenção. Em uma concretização da invenção, existe um método de inibir infecção de *E. chaffeensis* em um indivíduo, compreendendo a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição da invenção.

[00044] Em um certo aspecto da invenção, existe um método de identificar uma infecção de *E. chaffeensis* em um indivíduo, compreendendo a etapa de ensaiar uma amostra do indivíduo para um dos seguintes: (a) um polipeptídeo isolado compreendendo uma ou mais sequências de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em: SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; e SEQ ID NO:11; ou (b) um anticorpo que reage imunologicamente com uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em polipeptídeos de (a). Em uma concretização da invenção, a amostra é ensaiada para os polipeptídeos tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:19. Em uma concretização específica, o ensaio é por ELISA para o anticorpo de (b). Em outra concretização da invenção, o método compreende adicionalmente obter a amostra do indivíduo.

[00045] Em uma concretização adicional da invenção, existe um kit, alojado em um recipiente adequado, que compreende uma composição de polipeptídeo da invenção. Em algumas concretizações, o kit

compreende duas ou mais composições de polipeptídeo da invenção. Em uma concretização específica, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, e/ou SEQ ID NO:5. [00046] Os precedentes esboçaram preferivelmente amplamente as características e vantagens técnicas da presente invenção de modo que a descrição detalhada da invenção que se segue possa ser melhor compreendida. Características adicionais e vantagens da invenção serão descritas daqui por diante que forma o objetivo das reivindicações da invenção. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que a concepção e concretização específica revelada pode ser prontamente utilizada como uma base para modificar ou designar outras estruturas para efetuar a mesma proposta da presente invenção. Deve também ser compreendido por aqueles versados na técnica que tais construções equivalentes não fogem do espírito e escopo da invenção conforme colocada nas reivindicações em anexo. As novas características que são acreditadas serem características da invenção, ambas como sua organização e método de operação, juntos com outros objetivos e vantagens serão melhor compreendidos a partir da descrição que se segue quando considerada em conjunto com as figuras acompanhantes. É para ser expressamente compreendido, contudo, que cada uma das figuras é provida para a proposta de ilustração e descrição somente, e não é pretendida como uma definição dos limites da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00047] Para uma compreensão mais completa da presente invenção, referência é feita agora às seguintes descrições tomadas em conjunto com os desenhos acompanhantes.

[00048] **Figura 1A** proporciona uma sequência de aminoácido de proteína de VLPT mostrando todos os domínios e localização de quatro

TRs (número de aminoácidos em parêntese; R= repetição). **figura 1B**. proporciona uma árvore Filogenética mostrando o relacionamento das quatro repetições de *E. chaffeensis*. A escala representa a identidade de percentagem de aminoácido acido.

[00049] **Figura 2A** mostra a identificação de VLPT nativa em lisato de célula total de *E. chaffeensis* (raia 1), sobrenadantes derivados de células infectadas com *E. chaffeensis* (raia 2), e lisatos de célula totais de *E. canis* (raia 3) reagidos com anticorpo de peptídeo anti-VLPT-R3 e a **figura 2B** mostra o mesmo, mas com soro de cão anti-*E. chaffeensis*. O soro de pré-imunização de coelho ou soro de cão não reconhece lisatos ou sobrenadantes de célula total de *E. chaffeensis* (dados não mostrados).

[00050] **Figura 3** proporciona um esquemático de peptídeos sintéticos e recombinantes usados para mapear os VLPT epítopos.

[00051] **Figura 4A** mostra a imunorreatividade de peptídeos sintéticos e recombinantes de *E. chaffeensis* VLPT com soro de cão anti-*E. chaffeensis* (nº 2251). SDS-PAGE e marcação de proteína total de peptídeos recombinantes purificados (topo) e imunomancha de Western (Western Immunoblotting) correspondente sondado com soro de cão anti-*E. chaffeensis* (fundo). M, Precision Protein Standard (Bio-Rad); Ctrl, thioredoxin recombinante purificada. A **figura 4B** proporciona imunorreatividade por ELISA de polipeptídeos de VLPT pequenos recombinantes e sintéticos correspondentes (N [sintético somente, R1, R2, R3, e R4] e fragmentos de proteína de VLPT (recombinante somente; C, R4321-C, e R32). As leituras de OD representam os meios para três poços (\pm desvios padrões), com o OD das cavidades apenas tampão subtraído.

[00052] **Figura 5A** proporciona a sequência e orientação de peptídeos de sobreposição (7 peptídeos) representando VLPT-R3. **figura 5B** mostra a imunorreatividade de peptídeos de sobreposição

VLPT-R3 por ELISA com soro de cão anti-*E. chaffeensis*.

[00053] **Figura 6** mostra a imunorreatividade de repetições de *E. chaffeensis* VLPT sintéticas e recombinantes (R2, R3 e R4) por ELISA com três soros de paciente de HME (**figuras 6A, 6B, 6C**; Ctrl, thioredoxin recombinante purificado). *E. chaffeensis* VLPT-R3 sintético reagido por ELISA com 14 soros de paciente de HME (raias 1-14), soro de cão anti-*E. chaffeensis* (raia 15) e soro humano normal (raia 16) (**figura 6D**). O soro humano normal não reconhece outros peptídeos e proteínas também (dados não mostrados).

[00054] **Figura 7** Imunomancha de Western de sobrenadante de cultura de célula DH82 (0 a 6 dias de pós-infecção, raias 1 a 7, respectivamente) de *E. chaffeensis* sondado com anticorpo de peptídeo anti-VLPT-R3. M, Precision Protein Standard (Bio-Rad).

[00055] **Figura 8A** proporciona uma fotomicrografia de elétron de uma seção ultrathin de células de DH82 infectadas com *E. chaffeensis* demonstrando a localização de *E. chaffeensis* VLPT em ehrlichiae reticulada e de núcleo, e **figura 8B** proporciona uma seção de ultrathin correspondente contendo células de DH82 não infectadas (controle negativo). As células em ambos os painéis foram reagidas com anticorpo de peptídeo de coelho anti-VLPT-R3 (1:10,000). Barra = 1 μ m

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00056] O presente pedido incorpora por referência em sua totalidade PCT/US2007/75343, depositado em 7 de agosto de 2007, e Pedido de Patente Provisório N° De Série 60/841.465, depositado em 31 de agosto de 2006.

I. Definições

[00057] Mantendo-se a convenção da lei de patente, as palavras "um" e "uma" quando usadas no presente relatório descritivo em conjunto com a palavra compreendendo, incluindo as reivindicações, denotam "um ou mais". Algumas concretizações da invenção podem

consistir de ou consistir essencialmente de um ou mais elementos, etapas de método, e/ou métodos da invenção. É contemplado que qualquer método ou composição aqui descritos podem ser implementados com relação a qualquer outro método ou composição aqui descritos.

[00058] O termo "carboidrato", conforme aqui usado, se refere a uma composição compreendida de carbono, hidrogênio, e oxigênio, particularmente na proporção de 2H:1C:1O. O termo inclui açúcares, amidos e celuloses, por exemplo.

[00059] O termo "epítopo", conforme aqui usado, se refere a um sítio de uma composição ao qual um anticorpo específico se liga.

[00060] O termo "glican," que pode também ser referido a como um "polissacarídeo", conforme aqui usado, se refere a um carboidrato que pode ser decomposto por hidrólise em dois ou mais monossacarídeos. Em outras palavras, pode ser referido como uma cadeia de açúcares simples (derivados de aldeído ou cetona de um álcool poli-hídrico).

[00061] O termo "identidade", conforme conhecido na técnica, se refere a um relacionamento entre as sequências de duas ou mais moléculas de polipeptídeo ou duas ou mais moléculas de ácido nucleico, conforme determinado por comparação das sequências. Na técnica, "identidade" também significa o grau de sequência relacionada a moléculas de ácido nucleico ou entre polipeptídeos, conforme o caso pode ser, conforme determinado pelo número de equiparações entre hastes de dois ou mais resíduos de nucleotídeo ou dois ou mais resíduos de aminoácido. "Identidade" mede a percentagem de equiparações idênticas entre as menores de duas ou mais sequências com alinhamentos de folga (se necessário) determinada por um modelo matemático particular ou programa de computador (isto é, "algoritmos").

[00062] O termo "imunogênico", conforme aqui usado, se refere a uma composição que é capaz de provocar uma resposta imune contar ela.

[00063] O termo "resposta imune", conforme aqui usado, se refere à reação do sistema imune à presença de um antígeno por produção de anticorpos para o antígeno. Em concretizações específicas adicionais, a imunidade ao antígeno pode ser desenvolvida em um nível celular, pelo corpo como um todo, hipersensibilidade ao antígeno pode ser desenvolvida, e/ou tolerância pode ser desenvolvida, tal como de provocação subsequente. Em concretizações específicas, uma resposta imune impõe linfócitos que identificam uma molécula抗igenica como estranha e induzindo a formação de anticorpos e linfócitos capazes de reagirem com eles e torná-los menos danoso.

[00064] O termo "imunorreativo", conforme aqui usado, se refere a uma composição sendo reativa com anticorpos a partir dos soros de um indivíduo. Em concretizações específicas, uma composição é imunorreativa se um anticorpo reconhece a mesma, tal como por ligação à mesma e/ou reagindo imunologicamente com a mesma.

[00065] O termo "mucin", conforme aqui usado, se refere a uma ou mais glicoproteínas altamente glicosilatadas com N-acetilgalactosamina (GalNAc.)

[00066] O termo "ortólogo", conforme aqui usado, se refere a um polinucleotídeo de uma espécie que corresponde a um polinucleotídeo em outra espécie; os dois polinucleotídeos estão relacionados através de uma espécie ancestral comum (um polinucleotídeo homólogo). Contudo, o polinucleotídeo de uma espécie se envolve para tornar-se diferente do polinucleotídeo de outras espécies.

[00067] O termo "similaridade" é um conceito relacionado, mas em contraste a "identidade", se refere a um relacionamento de sequência que inclui ambas equiparações idênticas e equiparações de substituição conservativas. Se duas sequências de polipeptídeo têm, por exemplo, {aminoácidos idênticos de fração (10/20)}, e o restante são todas substituições não conservativas, então a percentagem de identidade e

similaridade ambas seriam 50%. Se, no mesmo exemplo, existem 5 mais posições onde existem substituições conservativas, então a percentagem de identidade 50%, mas a percentagem de similaridade seria 75% ($\{\text{fração } (15/20)\}$). Portanto, em casos onde existem substituições conservativas, o grau de similaridade entre dois polipeptídeos será mais alto do que a percentagem de identidade entre aqueles dois polipeptídeos.

[00068] O termo "vacina de subunidade", conforme aqui usado, se refere a uma vacina na qual um polipeptídeo ou fragmento do mesmo é empregado, conforme oposto a um organismo total.

[00069] O termo "vacina", conforme aqui usado, se refere a uma composição que proporciona imunidade a um indivíduo após provação.

[00070] O termo "fator de virulência", conforme aqui usado, se refere a um ou mais produtos de gene que capacita um micro-organismo a estabelecer-se em ou dentro de uma espécie de hospedeiro particular e aumenta sua patogenicidade. Fatores de virulência exemplares incluem, por exemplo, proteínas de superfície de célula que mediam fixação bacterial, carboidratos de superfície de célula e proteínas que protegem uma bactéria, toxinas bacteriais, e enzimas hidrolíticas que podem contribuir para a patogenicidade da bactéria.

[00071] A prática da presente invenção empregará, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia, DNA recombinante, e assim por diante que estão dentro da técnica anterior. Tais técnicas são explanadas totalmente na literatura. Vide, *por exemplo*, Sambrook, Fritsch, e Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition (1989), OLIGONUCLEOTÍDEO SYNTHESIS (M. J. Gait Ed., 1984), ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, Ed., 1987), a série METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE

TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. M. Miller e M. P. Calos eds. 1987), HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (D. M. Weir e C. C. Blackwell, Eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, e K. Struhl, eds., 1987), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (J. *E. coli*gan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach e W. Strober, eds., 1991); ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY; bem como monografias em jornais tais como ADVANCES IN IMMUNOLOGY. Todas as patentes, pedidos de patente, e publicações mencionadas aqui, ambos supra e infra, são, desse modo, incorporados aqui por referência.

II. Concretizações da Presente invenção

[00072] A presente invenção se refere composições e métodos relacionados à espécie *Ehrlichia*. Proteínas, os polinucleotídeos que codificam as mesmas, e fragmentos e moléculas relacionadas a estes. Em aspectos particulares da invenção, existem ortólogos de proteína imunorreativos diferencialmente expressos e secretados maiores de *E. canis* e *E. chaffeensis* que induzem respostas de anticorpo anteriores a epítocos em repetições em tandem glicosilatadas. Especificamente, a presente invenção se refere a uma ou mais glicoproteínas de espécie *Ehrlichia*, em concretizações específicas. Em concretizações adicionais, a presente invenção se refere a uma glicoproteína de espécie *Ehrlichia* que é uma proteína de VLPT. Em concretizações adicionais, a proteína de VLPT é de *E. chaffeensis*.

[00073] *Ehrlichia chaffeensis* tem um pequeno subconjunto de proteínas imunorreativas maiores que incluem uma proteína de 19-kDa que induzem uma resposta de anticorpo específica de ehrlichial anterior em cães infectados. A presente invenção se refere à identificação e caracterização molecular da proteína-alvo de PCR de comprimento variável de *chaffeensis* (VLPT).

[00074] Algumas concretizações da presente invenção são direcionadas a um método de inibir infecção de *E. chaffeensis* em um indivíduo compreendendo as etapas de identificar um indivíduo antes da exposição ou suspeitado de ser exposto a ou infectado com *E. chaffeensis* e administração de uma composição compreendendo um antígeno de *E. chaffeensis* em uma quantidade eficaz para inibir infecção de *E. chaffeensis*. A inibição pode ocorrer através de qualquer meio tal como, *por exemplo*, a estimulação das respostas imunes humorais ou celulares do indivíduo, ou por outros meios tais como inibição da função normal do antígeno, ou ainda competindo com o antígeno para interação com algum agente no corpo do indivíduo, ou uma combinação dos mesmos, *por exemplo*.

[00075] A presente invenção é também direcionada a um método de terapia-alvo em um indivíduo, compreendendo a etapa de administrar um composto a um indivíduo, no qual os compostos têm uma porção-alvo e uma porção terapêutica, e no qual a porção-alvo é específica para proteína de VLPT. Em certos aspectos, a porção-alvo é um anticorpo específico para VLPT ou ligante ou domínio de ligação de ligante que se liga a VLPT. Do mesmo modo, a porção terapêutica pode compreender um radioisótopo, uma toxina, um agente quimioterapêutico, um estimulante imune, um agente citotóxico, ou um antibiótico, *por exemplo*.

[00076] Outras concretizações da presente invenção se referem à diagnose de infecção ehrlichial em um mamífero pelo ensaio de uma amostra do mamífero, tal como sangue ou soro, *por exemplo*, para anticorpos para uma composição de VLPT (para *E. chaffeensis*).

III. Composições de Aminoácido de VLPT de *E. chaffeensis*

[00077] A presente invenção se refere a um polipeptídeo ou peptídeo compreendendo VLPT de *E. chaffeensis*. Para a proposta de brevidade, a seguinte seção se referirá a quaisquer composições de aminoácido de VLPT de *E. chaffeensis* da presente invenção, incluindo polipeptídeos e peptídeos.

[00078] Em concretizações particulares, um polipeptídeo pode ser um polipeptídeo recombinante ou ele pode ser isolado e/ou purificado da natureza, por exemplo. Em aspectos particulares, a sequência de aminoácido é codificada por uma sequência de ácido nucleico. O polipeptídeo é útil como um antígeno, em concretizações específicas. Em outras concretizações particulares, um peptídeo pode ser gerado sinteticamente ou codificado por um oligonucleotídeo, por exemplo. O peptídeo é útil como um antígeno, em concretizações específicas.

[00079] A presente invenção é também direcionada a um método de produção do polipeptídeo recombinante, compreendendo as etapas de obtenção de um vetor que compreende uma construção de expressão compreendendo uma sequência que codifica a sequência de aminoácido operativamente ligada a um promotor; transfecção do vetor em uma célula; e cultura da célula sob condições eficazes para expressão da construção de expressão. A sequência de aminoácido pode ser gerada sinteticamente, em concretizações alternativas.

[00080] Por uma "proteína substancialmente pura" é significativo de uma proteína que foi separada de pelo menos alguns daqueles componentes a acompanham naturalmente. Uma composição imunorreativa substancialmente pura pode ser obtida, por exemplo, por extração de uma fonte natural; por expressão de um ácido nucleico recombinante que codifica uma composição imunorreativa; ou por sintetização quimicamente da proteína, por exemplo. Consequentemente, proteínas substancialmente puras incluem proteínas sintetizadas em *E. coli*, outros procariontes, ou qualquer outro organismo no qual eles não ocorrem naturalmente.

[00081] Desse modo, em certas concretizações, a presente invenção se refere a novas composições compreendendo pelo menos uma molécula proteinácea. Conforme aqui usado, uma "molécula proteinácea", "composição proteinácea", "composto proteináceo", "cadeia proteinácea" ou "material proteináceo" se referem geralmente, mas não é limitado a

uma proteína de mais do que cerca de 130 aminoácidos ou a sequência endógena de comprimento total traduzida de um gene; um polipeptídeo de mais do que cerca de 100 aminoácidos; e/ou um peptídeo de cerca de 3 a cerca de 100 aminoácidos. Todos os termos "proteináceos" descritos acima podem ser usados permutavelmente aqui.

[00082] Em certas concretizações, o tamanho da pelo menos uma molécula proteinácea pode compreender, mas não é limitado a, cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 13, cerca de 14, cerca de 15, cerca de 16, cerca de 17, cerca de 18, cerca de 19, cerca de 20, cerca de 21, cerca de 22, cerca de 23, cerca de 24, cerca de 25, cerca de 26, cerca de 27, cerca de 28, cerca de 29, cerca de 30, cerca de 31, cerca de 32, cerca de 33, cerca de 34, cerca de 35, cerca de 36, cerca de 37, cerca de 38, cerca de 39, cerca de 40, cerca de 41, cerca de 42, cerca de 43, cerca de 44, cerca de 45, cerca de 46, cerca de 47, cerca de 48, cerca de 49, cerca de 50, cerca de 51, cerca de 52, cerca de 53, cerca de 54, cerca de 55, cerca de 56, cerca de 57, cerca de 58, cerca de 59, cerca de 60, cerca de 61, cerca de 62, cerca de 63, cerca de 64, cerca de 65, cerca de 66, cerca de 67, cerca de 68, cerca de 69, cerca de 70, cerca de 71, cerca de 72, cerca de 73, cerca de 74, cerca de 75, cerca de 76, cerca de 77, cerca de 78, cerca de 79, cerca de 80, cerca de 81, cerca de 82, cerca de 83, cerca de 84, cerca de 85, cerca de 86, cerca de 87, cerca de 88, cerca de 89, cerca de 90, cerca de 91, cerca de 92, cerca de 93, cerca de 94, cerca de 95, cerca de 96, cerca de 97, cerca de 98, cerca de 99, cerca de 100, cerca de 110, cerca de 120, cerca de 130, ou mais do que resíduos de aminoácido, e qualquer faixa derivável desta.

[00083] Conforme aqui usado, uma "molécula de aminoácido" se refere a qualquer polipeptídeo, derivado de polipeptídeo, ou polipeptídeo mimético conforme seria conhecido a um versado na

técnica. Em certas concretizações, os resíduos da molécula proteinácea são sequenciais, sem qualquer não molécula de aminoácido que interrompe a sequência de resíduos de molécula de aminoácido. Em outras concretizações, a sequência pode compreender uma ou mais porções de molécula não amino. Em concretizações particulares, a sequência de resíduos da molécula proteinácea pode ser interrompida por uma ou mais porções de molécula não amino.

[00084] Consequentemente, o termo "composição proteinácea" envolve sequências de molécula de amino compreendendo pelo menos um dos 20 aminoácidos comuns nas proteínas naturalmente sintetizadas, ou pelo menos um aminoácido modificado ou não usual, incluindo, mas não limitado a aqueles mostrados na Tabela 1 abaixo.

TABELA 1.			
Aminoácidos Modificados e Não usuais			
Abrev.	Aminoácido	Abrev.	Aminoácido
Aad	Ácido 2-Aminoadípico	EtAsn	N-Etilasparagina
Baad	3- Ácido aminoadípico	Hyl	Hidroxilisina
Bala	β-alanina, Ácido β-amino- propiônico	AHyl	allo-Hidroxilisina
Abu	Ácido 2-aminobutírico	3Hyp	3-Hidroxiprolina
4Abu	Ácido 4- aminobutírico, ácido piperidínico	4Hyp	4-Hidroxiprolina
Acp	Ácido 6-aminocapróico	lde	Isodesmosina
Ahe	Ácido 2-amino-heptanóico	Alle	allo-Isoleucina
Aib	Ácido 2-aminoisobutírico	MeGly	N-Metilglicina, sarcosina
Baib	Ácido 3-aminoisobutírico	Melle	N-Metilisoleucina
Apm	Ácido 2-aminopimélico	MeLys	6-N-Metilisina
Dbu	Ácido 2,4-diaminobutírico	MeVal	N-Metilvalina
Des	Desmosina	Nva	Norvalina
Dpm	Ácido 2,2'-diaminopimélico	Nle	Norleucina
Dpr	Ácido 2,3-diaminopropiônico	Orn	Ornitina
EtGly	N-Etilglicina		

[00085] Em certas concretizações a composição proteinácea

compreende pelo menos uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo. Em concretizações adicionais, a composição proteinácea compreende uma proteína biocompatível, polipeptídeo ou peptídeo. Conforme aqui usado, o termo "biocompatível" se refere a uma substância que não produz efeitos desfavoráveis significantes quando aplicada a, ou administrada a um dado organismo de acordo com os métodos e quantidades aqui descritos. Tais efeitos desfavoráveis ou indesejáveis são aqueles tais como toxicidade significante ou reações imunológicas adversas.

[00086] As composições proteináceas podem ser produzidas por qualquer técnica conhecida àqueles versados na técnica, incluindo a expressão de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos através de técnicas de biologia molecular padrões, o isolamento de compostos proteináceos de fontes naturais, ou a síntese química de materiais proteináceos, por exemplo. O nucleotídeo e proteína, polipeptídeo e sequências de peptídeo para vários genes foram previamente descritos, e podem ser encontrados nas bases de dados computadorizadas conhecidas àqueles versados na técnica. Duas tais bases de dados são a National Center for Biotechnology Information's GenBank® e GenPept databases, por exemplo. As regiões de codificação para estes genes conhecidos podem ser amplificadas e/ou expressas usando as técnicas aqui descritas, ou conforme seria conhecida àqueles versados na técnica. Alternativamente, várias preparações comerciais de proteínas, polipeptídeos e peptídeos são conhecidos àqueles versados na técnica.

[00087] Em certas concretizações, um composto proteináceo pode ser purificado. Geralmente, "purificado" se referirá a uma composição específica ou de proteína, de polipeptídeo, ou de peptídeo que foi individualizada para fracionamento para remover várias outras proteínas, polipeptídeos, ou peptídeos, e cuja composição retém substancialmente sua atividade, conforme pode ser avaliado, por exemplo, pelos ensaios de proteína, conforme seria conhecido àquele

versado na técnica para a proteína específica ou desejada, polipeptídeo ou peptídeo. As atividades exemplares que podem ser avaliadas para retenção na composição proteinácea purificada são atividade de ligação de ferro e imunorreatividade.

[00088] Em concretizações específicas da presente invenção, um polipeptídeo é marcado, e qualquer marcação detectável é adequada na invenção. A marcação pode ser fixada ao polipeptídeo no N-terminal, no C-terminal, ou em uma cadeia lateral de um resíduo de aminoácido, por exemplo. Uma ou mais marcações podem ser empregadas. Marcações exemplares incluem marcações radioativas, marcações fluorescentes, marcações colorimétricas, e assim por diante. Em concretizações específicas, a marcação é covalentemente fixada ao polipeptídeo.

IV. Composições de Ácido Nucleico de VLPT de *E. chaffeensis*

[00089] Certas concretizações da presente invenção se referem a um ácido nucleico gp19 de *E. canis*. Para a proposta de brevidade, a seguinte seção se referirá a quaisquer composições de ácido nucleico gp19 de *E. canis* da presente invenção.

[00090] Em certos aspectos, um ácido nucleico compreende um ácido nucleico tipo selvagem ou mutante. Em aspectos particulares, um ácido nucleico que codifica para ou compreende um ácido nucleico transcrito. Em outros aspectos, um ácido nucleico compreende um segmento de ácido nucleico, ou um equivalente biologicamente funcional do mesmo. Em aspectos particulares, um ácido nucleico codifica uma proteína, polipeptídeo, peptídeo.

[00091] O termo "ácido nucleico" é bem conhecido na técnica e pode ser usado permutavelmente aqui com o termo "polinucleotídeo". Um "ácido nucleico", conforme aqui usado, se referirá geralmente a uma molécula (*isto é*, uma fita) de DNA, RNA ou um derivado ou análogo dos mesmos, compreendendo uma nucleobase. Uma nucleobase inclui, por

exemplo, uma purina que ocorre naturalmente ou base de pirimidina encontrada no DNA (*por exemplo*, uma adenina "A," uma guanina "G," uma thimina "T" ou uma citosina "C") ou RNA (*por exemplo*, um A, um G, um "U" uracil ou um C). O termo "ácido nucleico" envolve os termos "oligonucleotídeo" e "polinucleotídeo," cada um com um subgênero do termo "ácido nucleico". O termo "oligonucleotídeo" se refere a uma molécula de entre cerca de 3 e cerca de 100 nucleobases de comprimento. O termo "polinucleotídeo" se refere a pelo menos uma molécula de mais do que cerca de 100 nucleobases de comprimento.

[00092] Estas definições geralmente se referem a uma molécula de fita simples, mas em concretizações específicas também envolverão uma fita adicional que é parcialmente, substancialmente ou totalmente complementar à molécula de fita simples. Desse modo, um ácido nucleico pode envolver uma molécula de fita dupla ou uma molécula de fita tripla que compreende uma ou mais fita(s) ou "complemento(s)" de uma sequência particular compreendendo uma molécula. Conforme aqui usado, um ácido nucleico de fita simples pode ser denotado pelo prefixo "ss," um ácido nucleico de fita dupla pelo prefixo "ds," e um ácido nucleico de fita tripla pelo prefixo "ts."

A. Nucleobases

[00093] Conforme aqui usado, uma "nucleobase" se refere a uma base heterocíclica, tal como, por exemplo, uma nucleobase que ocorre naturalmente (*isto é*, uma A, T, G, C ou U) encontrada em pelo menos um ácido nucleico que ocorre naturalmente (*isto é*, DNA e RNA), e derivado(s) que ocorre(m) naturalmente ou não naturalmente e análogos de tal nucleobase. Uma nucleobase geralmente pode formar uma ou mais ligações de hidrogênio ("reforçar" ou "hibridizar") com pelo menos uma nucleobase que ocorre naturalmente de maneira que pode substituir emparelhamento de nucleobase que ocorre naturalmente (*por exemplo*, a ligação de hidrogênio entre A e T, G e C, e A e U).

[00094] Nucleobase(s) de "purina" e/ou "pirimidina" envolvem nucleobases de purina e/ou pirimidina que ocorrem naturalmente, e também derivado(s) e análogo(s) destas, incluindo, mas não limitados a, aquelas de uma purina ou pirimidina substituída por um ou mais de uma alquila, carboxialquila, amino, hidroxila, halogênio (*isto é*, flúor, cloro, bromo, ou iodo), tiol ou porção de alquiltiol. Porções de alquila preferidas (*por exemplo*, alquila, caboxialquila, *etc.*) compreendem de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, a cerca de 6 átomos de carbono. Outros exemplos não limitativos de uma purina ou pirimidina incluem uma deazapurina, uma 2,6-diaminopurina, uma 5-fluorouracila, uma xantina, uma hipoxantina, uma 8-bromoguanina, uma 8-cloroguanina, uma bromotimina, uma 8-aminoguanina, uma 8-hidroxiguanina, uma 8-metilguanina, uma 8-tioguanina, uma azaguanina, uma 2-aminopurina, uma 5-etilcitosina, uma 5-metilcitosina, uma 5-bromouracila, uma 5-etiluracila, uma 5-iodouracila, uma 5-clorouracila, uma 5-propiluracila, uma tiouracila, uma 2-metiladenina, uma metiltioadenina, uma N,N-diemetiladenina, uma aza-adeninas, uma 8-bromoadenina, uma 8-hidroxiadenina, uma 6-hidroxiaminopurina, uma 6-tiopurina, uma 4-(6-aminoheptil)citosina), e similares.

[00095] Uma nucleobase pode ser compreendida em um nucleosídeo ou nucleotídeo, usando-se qualquer método de síntese química ou natural aqui descrito ou conhecido a um versado na técnica.

B. Nucleosídeos

[00096] Conforme aqui usado, um "nucleosídeo" se refere a uma unidade química individual compreendendo uma nucleobase covalentemente fixada a uma porção ligadora de nucleobase. Um exemplo não limitativo de uma "porção ligadora de nucleobase" é um açúcar compreendendo 5 átomos de carbono (*isto é*, um "açúcar de 5 carbonos"), incluindo, mas não limitado a uma deoxiribose, uma ribose, uma arabinose, ou um derivado ou um análogo de um açúcar de 5

carbonos. Exemplos não limitativos de um derivado ou um análogo de um açúcar de 5 carbonos incluem uma 2'-fluoro-2'-deoxirribose ou um açúcar carbocíclico onde um carbono é substituído por um átomo de oxigênio no anel de açúcar.

[00097] Tipos diferentes de fixação(ões) covalente(s) de uma nucleobase a uma porção ligadora de nucleobase são conhecidos na técnica. Por meio de exemplo não limitativo, um nucleosídeo compreendendo uma purina (*isto é*, A ou G) ou uma 7-deazapurina nucleobase tipicamente covalentemente se fixa à posição 9 de uma purina ou uma 7-deazapurina à posição 1' de um açúcar de 5 carbonos. Em outro exemplo não limitativo, uma nucleosídeo compreendendo uma pirimidina nucleobase (*isto é*, C, T ou U) tipicamente covalentemente se fixa a uma posição 1 de uma pirimidina a uma posição 1' de um açúcar de 5 carbonos (Kornberg e Baker, 1992).

C. Nucleotídeos

[00098] Conforme aqui usado, um "nucleotídeo" se refere a um nucleosídeo compreendendo adicionalmente uma "porção de cadeia principal". Uma porção de cadeia principal geralmente covalentemente se fixa a um nucleotídeo a outra molécula compreendendo um nucleotídeo, ou a outro nucleotídeo para formar um ácido nucleico. A "porção de cadeia principal" nos nucleotídeos que ocorrem naturalmente compreende uma porção de fósforo, que é covalentemente fixada a um açúcar de 5 carbonos. A fixação da porção de cadeia principal ocorre tipicamente em qualquer da posição 3' ou 5' do açúcar de 5 carbonos. Contudo, outros tipos de fixações são conhecidos na técnica, particularmente quando um nucleotídeo compreende derivados ou análogos de uma porção de açúcar de 5 carbonos ou fósforo que ocorre naturalmente.

D. Análogos de Ácido nucleico

[00099] Um ácido nucleico pode compreender, ou ser composto

totalmente de um derivado ou análogo de uma nucleobase, uma porção ligadora de nucleobase e/ou porção de cadeia principal que podem estar presentes em um ácido nucleico que ocorre naturalmente. Conforme aqui usado, um "derivado" se refere a uma forma quimicamente modificada ou alterada de uma molécula que ocorre naturalmente, enquanto os termos "imitadores" ou "análogos" se referem a uma molécula que pode ou não pode parecer-se estruturalmente com uma molécula ou porção que ocorre naturalmente, mas possui funções similares. Conforme aqui usado, uma "porção" geralmente se refere a um componente químico ou molecular menor de uma estrutura química ou molecular grande. Análogos ou derivados de nucleobase, nucleosídeo e nucleotídeo são bem-conhecidos na técnica, e foram descritos (vide, por exemplo, Scheit, 1980, incorporado aqui por referência).

[000100] Exemplos não limitativos adicionais de nucleosídeos, nucleotídeos ou ácidos nucleicos compreendendo açúcar de 5 carbonos e/ou derivados e análogos de porção de cadeia principal, incluem aqueles na Patente U.S. Nº 5.681.947 que descreve oligonucleotídeos compreendendo derivados de purina que formam espiras triplas com e/ou previnem expressão de dsDNA; Patentes US 5.652.099 e 5.763.167 que descrevem ácidos nucleicos incorporando análogos fluorescentes de nucleosídeos encontrados em DNA ou RNA, particularmente para uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; Patente U.S. 5.614.617 que descrevem análogos de oligonucleotídeo com substituições em anéis de pirimidina que possuem estabilidade de nuclease aumentada; Patentes US 5.670.663, 5.872.232 e 5.859.221 que descrevem análogos de oligonucleotídeo com açúcar de 5 carbonos modificados (*isto é*, porções de modificadas 2'-deoxiuranosil) usadas na detecção de ácido nucleico; Patente U.S. 5.446.137 que descreve oligonucleotídeos compreendendo pelo menos

uma porção de açúcar de 5 carbonos substituída na posição 4' com um substituinte outro do que hidrogênio que pode ser usado nos ensaios de hibridização; Patente U.S. 5.886.165 que descreve oligonucleotídeos com ambos deoxirribonucleotídeos com ligações de 3'-5' internucleotídeo e ribonucleotídeos com ligações 2'-5' internucleotídeo; Patente U.S. 5.714.606 que descreve uma ligação de internucleotídeo modificada no qual uma posição 3' de oxigênio da ligação internucleotídeo é substituída por um carbono para aumentar a resistência à nuclease de ácidos nucleicos; Patente U.S. 5.672.697 que descreve oligonucleotídeos contendo uma ou mais ligações de internucleotídeo de 5' metileno fosfonato que aumentam a resistência a nuclease; Patente U.S. 5.466.786 e 5.792.847 que descrevem a ligação de porção de substituinte que podem compreender um fármaco ou tag ao 2' carbono de um oligonucleotídeo para proporcionar estabilidade de nuclease aumentada e capacidade de distribuir fármacos ou porções de detecção; Patente U.S. 5.223.618 que descreve análogos de oligonucleotídeo com uma ligação de suporte de 2 ou 3 carbonos que fixa a posição 4' e posição 3' de porção de açúcar de 5 carbonos adjacente para entendimento celular aumentado, resistência à nucleases e hibridização a RNA alvo; Patente U.S. 5.470.967 que descreve oligonucleotídeos compreendendo pelo menos uma ligação de internucleotídeo de sulfamato ou sulfamida que são úteis como sonda de hibridização de ácido nucleico; Patente U.S. 5.378.825, 5.777.092, 5.623.070, 5.610.289 e 5.602.240 que descrevem oligonucleotídeos com três ou quatro porções ligadora de átomo que substitui porção de cadeia principal de fosfodiéster usada para resistência à nucleose aperfeiçoada, entendimento celular e regulação de expressão de RNA; Patente U.S. 5.858.988 que descreve agente transportador hidrofóbico fixado a 2'-O posição de oligonucleotídeos para aumentar sua permeabilidade e estabilidade à membrana; Patente

U.S. 5.214.136 que descreve oligonucleotídeos conjugados a antraquinona no 5' terminal que possuem hibridização aumentada para DNA ou RNA; estabilidade aumentada para nucleases; Patente U.S. 5.700.922 que descreve quimeras de PNA-DNA-PNA no qual o DNA compreende 2'-deoxi-eritro-pentofuranosil nucleotídeos para resistência à nuclease aumentada, afinidade de ligação, e capacidade para ativar RNase H; e Patente U.S. 5.708.154 que descreve RNA ligado a um DNA para formar um híbrido de DNA-RNA.

E. Ácidos nucleicos de poliéster e peptídeo

[000101] Em certas concretizações, é contemplado que um ácido nucleico compreendendo um derivado ou análogo de um nucleosídeo ou nucleotídeo pode ser usado nos métodos e composições da invenção. Em exemplo não limitativo é um "ácido nucleico de poliéster", descrito na Patente U.S. Nº De Série 5.908.845, incorporada aqui por referência. Em um ácido nucleico de poliéster, uma ou mais nucleobases são ligadas a átomos de carbono quirais em uma cadeia principal de poliéster.

[000102] Exemplo não limitativo é um "ácido nucleico de peptídeo", também conhecido como um "PNA", "análogo de ácido nucleico baseado em peptídeo" ou "PENAM", descrito nas Patentes US Nºs De Série 5.786.461. 5891.625. 5.773.571. 5.766.855. 5.736.336. 5.719.262. 5.714.331. 5.539.082, e WO 92/20702, cada uma da qual é incorporada aqui por referência. Os ácidos nucleicos de peptídeo geralmente têm especificidade de sequência aumentada, propriedades de ligação, e resistência à degradação enzimática em comparação a moléculas tais como DNA e RNA (Egholm *et al.*, 1993; PCT/EP/01219). Um ácido nucleico de peptídeo geralmente compreende um ou mais nucleotídeos ou nucleosídeos que compreendem uma porção de nucleobase, uma porção ligadora de nucleobase que não é um açúcar de 5 carbonos, e/ou uma porção de cadeia principal que não é uma

porção de cadeia principal de fosfato. Exemplos de porções ligadoras de nucleobase descritas para PNAs incluem átomos de aza nitrogênio, amido e/ou ureído éteres (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.539.082). Exemplos de porções de cadeia principal descritas para PNAs incluem uma porção de cadeia principal de aminoetilglicina, poliamida, polietila, politioamida, polissulfinamida ou polissulfonamida.

[000103] Em certas concretizações, um análogo de ácido nucleico tal como um ácido nucleico de peptídeo pode ser usado para inibir amplificação de ácido nucleico, tal como em PCR, para reduzir falsos positivos e discriminar entre mutantes de base simples, conforme descrito na Patente U.S. Nº de Série 5891.625. Outras modificações e usos de análogos de ácido nucleico são conhecidas na técnica, e são envolvidas pelo gp36 polinucleotídeo. Em um exemplo não limitativo, a Patente U.S. 5.786.461 descreve PNAs com cadeias laterais de aminoácido fixadas ao suporte de PNA para aumentar solubilidade da molécula. Em outro exemplo, a propriedade de entendimento celular de PNAs é aumentada pela fixação de um grupo lipofílico. O pedido dos Estados Unidos Nº De Série 117.363 descreve várias porções de alquilamino usadas para aumentar entendimento celular de um PNA. Outro exemplo é descrito nas Patentes US Nºs 5.766.855. 5.719.262. 5.714.331 e 5.736.336. que descrevem PNAs compreendendo nucleobases que ocorrem naturalmente e não naturalmente e cadeias laterais de alquilamina que proporcionam aperfeiçoamentos na especificidade de sequência, solubilidade e/ou afinidade de ligação relativa a um ácido nucleico que ocorre naturalmente.

F. Preparação de Ácidos nucleicos

[000104] Um ácido nucleico pode ser produzido por qualquer técnica conhecida a um versado na técnica, tal como, por exemplo, síntese química, produção enzimática ou produção biológica. Exemplos não limitativos de um ácido nucleico sintético (*por exemplo*, um

oligonucleotídeo sintético), incluem um ácido nucleico produzido por síntese química *in vitro* usando fosfotriéster, técnicas de química de fosfato ou fosforamidita e técnicas de fase sólida tais como descritas em EP 266.032, aqui incorporado por referência, ou *via* intermediários de deoxinucleosídeo H-fosfonato conforme descritos por Froehler *et al.*, 1986 e Patente U.S. Nº De Série 5.705.629, cada incorporada aqui por referência. Nos métodos da presente invenção, um ou mais do oligonucleotídeo podem ser usados. Vários mecanismos diferentes de síntese de oligonucleotídeo foram descritos em, por exemplo, Patente U.S. 4.659.774. 4.816.571. 5.141.813. 5.264.566. 4.959.463. 5.428.148. 5.554.744. 5.574.146. 5.602.244, cada uma da qual sendo aqui incorporada por referência.

[000105] Um exemplo não limitativo de um ácido nucleico enzimaticamente produzido inclui um produzido por enzimas em reações de amplificação tais como PCR® (vide, por exemplo, Patente U.S. 4.683.202 e Patente U.S. 4.682.195, cada uma incorporada aqui por referência), ou a síntese de um oligonucleotídeo descrito na Patente U.S. Nº 5.645.897, incorporada aqui por referência. Um exemplo não limitativo de um ácido nucleico biologicamente produzido inclui um ácido nucleico recombinante produzido (*isto é*, replicado) em uma célula viva, tais como um vetor de DNA recombinante replicado na bactéria (vide, por exemplo, Sambrook *et al.* 1989, incorporado aqui por referência).

G. Purificação de Ácidos nucleicos

[000106] Um ácido nucleico pode ser purificado em géis de poliacrilamida, gradientes de centrifugação de cloreto, ou por quaisquer outros meios conhecidos a um versado na técnica (vide, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, incorporado aqui por referência).

[000107] Em certo aspecto, a presente invenção se refere a um ácido nucleico que é um ácido nucleico isolado. Conforme aqui usado, o termo "ácido nucleico isolado" se refere a uma molécula de ácido nucleico (por

exemplo, uma molécula de RNA ou DNA) que foi isolada livre de, ou é, de outro modo, livre da massa dos ácidos nucleicos de genômicos totais e transcritos de uma ou mais células. Em certas concretizações, "ácido nucleico isolado" se refere a um ácido nucleico que foi isolado livre de, ou é, de outro modo, livre de massa de componentes celulares ou componentes de reação *in vitro* tais como, por exemplo, macromoléculas tais como lipídeos ou proteínas, moléculas biológicas pequenas, e similares.

H. Segmentos de ácido nucleico

[000108] Em certas concretizações, o ácido nucleico é um segmento de ácido nucleico. Conforme aqui usado, o termo "segmento de ácido nucleico" são fragmentos menores de um ácido nucleico, tais como para exemplo não limitativo, aqueles que codificam somente parte do peptídeo ou sequência de polipeptídeo. Desse modo, um "segmento de ácido nucleico" pode compreender qualquer parte de uma sequência de gene, de a partir de cerca de 2 nucleotídeos ao comprimento total da região que codifica peptídeo ou polipeptídeo.

[000109] Vários segmentos de ácido nucleico podem ser designados baseados em uma sequência de ácido nucleico particular, e podem ser de qualquer comprimento. Pela designação de valores numéricos para uma sequência, por exemplo, o primeiro resíduo é 1, o segundo resíduo é 2, *etc.*, um algoritmo que define todos os segmentos de ácido nucleico pode ser gerado:

n para $n + y$

onde n é um inteiro de 1 ao último número da sequência e y é o comprimento do segmento de ácido nucleico menos um, onde $n + y$ não excede o último número da sequência. Desse modo, para um 10 mer, os segmentos de ácido nucleico correspondem às bases 1 a 10, 2 a 11, 3 a 12 ... e assim por diante. Para um 15-mer, os segmentos de ácido nucleico correspondem às bases 1 a 15, 2 a 16, 3 a 17 ... e assim por

diante. Para um 20-mer, os segmentos nucleicos correspondem às bases 1 a 20, 2 a 21, 3 a 22 ... e assim por diante. Em certas concretizações, o segmento de ácido nucleico pode ser uma sonda ou iniciador. Conforme aqui usado, uma "sonda" geralmente se refere a um ácido nucleico usado em um método de detecção ou composição. Conforme aqui usado, um "iniciador" geralmente se refere a um ácido nucleico usado em um método de extensão ou amplificação ou composição.

I. Complementos de ácido nucleico

[000110] A presente invenção também envolve um ácido nucleico que é complementar a um ou mais outros ácidos nucleicos. Em concretizações específicas, por exemplo, um ácido nucleico é empregado para proposta de antissentido ou siRNA, tal como para inibir pelo menos expressão parcialmente de um polinucleotídeo.

[000111] Em concretizações particulares a invenção envolve um ácido nucleico ou um segmento de ácido nucleico complementar à sequência aqui colocada, por exemplo. Um ácido nucleico é "complemento(s)" ou é "complementar" a outro ácido nucleico quando ele é capaz de emparelhamento de base com outro ácido nucleico de acordo com as regras padrões de Watson-Crick, Hoogsteen ou regras complementares de ligação de Hoogsteen reversas. Conforme aqui usado, "outro ácido nucleico" pode se referir a uma molécula separada ou a uma sequência espacial separada da mesma molécula.

[000112] Conforme aqui usado, o termo "complementar" ou "complemento(s)" também se refere a um ácido nucleico comprendendo uma sequência de nucleobases consecutivas ou semiconsecutivas (*por exemplo*, uma ou mais porções de nucleobase não estão presentes na molécula) capazes de hibridizarem para outra fita de ácido nucleico ou duplex mesmo se menos do que todas as nucleobases não formam par base com uma nucleobase de contra-parte. Em certas

concretizações, um ácido nucleico "complementar" compreende uma sequência em que cerca de 70%, cerca de 71%, cerca de 72%, cerca de 73%, cerca de 74%, cerca de 75%, cerca de 76%, cerca de 77%, cerca de 77%, cerca de 78%, cerca de 79%, cerca de 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, a cerca de 100%, e qualquer faixa derivável da sequência de nucleobase é capaz de emparelhamento de base com uma molécula de ácido nucleico de fita simples ou dupla durante hibridização. Em certas concretizações, o termo "complementar" se refere a um ácido nucleico que pode hibridizar para outra fita de ácido nucleico ou duplex em condições estringentes, conforme seria compreendido por um versado na técnica.

[000113] Em certas concretizações, um ácido nucleico "parcialmente complementar" compreende uma sequência que pode hibridizar em condições de baixa estringência para um ácido nucleico de fita simples ou dupla, ou contém uma sequência em que menos do que cerca de 70% da sequência de nucleobase é capaz de emparelhamento de base com uma molécula de ácido nucleico de fita simples ou dupla durante hibridização.

J. Hibridização

[000114] Conforme aqui usado, "hibridização", "hibridiza" ou "capaz de hibridizar" é compreendido para significar a formação de uma molécula de trançado duplo ou triplo ou uma molécula com natureza trançada dupla ou tripla parcial. O termo "anela", conforme aqui usado, é sinônimo de "hibridiza". O termo "hibridização", "hibridiza" ou "capaz de hibridizar" envolve os termos "condição(ões) estringente(s)" ou "alta estringência" e os termos "baixa estringência" ou "baixa(s) condição(ões) de estringência."

[000115] Conforme aqui usado "condição(ões) estringente(s)" ou "alta estringência" são aquelas condições que permitem hibridização entre ou dentro de uma ou mais fita(s) de ácido nucleico contendo sequência(s) complementar(es), mas impede hibridização de sequências aleatórias. Condições estringentes toleram pouca, quando muito, equiparação entre um ácido nucleico e uma fita alvo. Tais condições são bem conhecidas àquele versado na técnica, e são preferidas para aplicações que requerem alta seletividade. Aplicações não limitativas incluem isolar um ácido nucleico, tal como um gene ou um segmento de ácido nucleico deste, ou detectar pelo menos um transrito de mRNA ou um segmento de ácido nucleico deste, e similar.

[000116] As condições estringentes podem compreender condições de sal baixas e/ou altas condições de temperatura, tal como provido por cerca de 0,02 M a cerca de 0,15 M de NaCl, por exemplo, a temperaturas de cerca de 50°C a cerca de 70°C ou, por exemplo, no qual referidas condições estringentes são hibridização a 50-65°C, 5X de SSPC, 50% de formamida; lavagem 50-65°C, 5X de SSPC; ou lavagem a 60°C, 0,5X decSSC, 0,1% de SDS. É compreendido que a temperatura e resistência iônica de uma estringência desejada são determinadas em parte pelo comprimento do(s) ácido(s) nucleico(s) particular(es), o comprimento e teor de nucleobase da(s) sequência(s) alvo(s), a composição de carga do(s) ácido(s) nucleico(s), e à presença ou concentração de formamida, cloreto de tetrametilamônia ou outro(s) solvente(s) em uma mistura de hibridização.

[000117] É também compreendido que estas faixas, composições e condições para hibridização são mencionadas por meio de exemplos não limitativos somente, e que a estringência desejada para uma reação de hibridização particular é frequentemente determinada empiricamente por comparação a um ou mais controles positivos ou negativos. Dependendo da aplicação considerada, é preferido empregar condições

variantes de hibridização para alcançar graus variantes de seletividade de um ácido nucleico para uma sequência alvo. Em um exemplo não limitativo, a identificação ou isolamento de um ácido nucleico alvo relacionado que não hibridiza a um ácido nucleico sob condições estringentes pode ser alcançada por hibridização em baixa temperatura e/ou alta resistência iônica. Tais condições são denominadas "baixa estringência" ou "condições de baixa estringência", e exemplos não limitativos de baixa estringência incluem hibridização realizada a cerca de 0,15 M a cerca de 0,9 M de NaCl a uma faixa de temperatura de cerca de 20°C a cerca de 50°C. Naturalmente, está dentro da técnica do assunto modificar adicionalmente as baixas ou altas condições de estringência para adequar a uma aplicação particular.

V. Sistemas de Expressão Baseados em ácido nucleico

[000118] Em concretizações particulares, a presente invenção se refere a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo imunorreativo de *ehrlichiae*, e também inclui a distribuição do polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo, ou produto codificado deste, a um indivíduo em necessidade deste, tal como um indivíduo infectado com *Erhlichia* e/ou um indivíduo susceptível a ser infectado com *Erhlichia*. Para a proposta de brevidade, a seção seguinte se referirá a quaisquer composições de ácido nucleico de VLPT de *E. chaffeensis* e/ou sistema de expressão baseado em ácido nucleico da presente invenção.

[000119] A presente invenção é direcionada a sequências de DNA substancialmente puras e/ou sequência de DNA isoladas que codificam uma composição imunorreativa de *Ehrlichia* composição. Geralmente, a proteína codificada compreende uma sequência N-terminal, que pode ser clivada após modificação pós-traducional resultando na produção de proteína madura.

[000120] É bem conhecido na técnica que devido à degeneração do código genético (*isto é*, para muitos aminoácidos, mais do que um trio

de nucleotídeo (códon) codifica para um aminoácido simples), sequências de nucleotídeo diferentes podem codificar para um aminoácido particular, ou polipeptídeo. Desse modo, as sequências de polinucleotídeo da invenção objeto incluem quaisquer das sequências exemplares providas, ou uma variante degenerada de tais sequências, por exemplo. Em aspectos particulares da invenção, uma variante degenerada compreende uma sequência que não é idêntica a uma sequência da invenção, mas que ainda retém uma ou mais propriedades de uma sequência da invenção.

[000121] Conforme aqui usado, "DNA substancialmente puro" significa DNA que não é parte de um meio no qual o DNA ocorre naturalmente, em virtude de separação (purificação parcial ou total) de algumas ou todas as moléculas daquele meio, ou em virtude de alteração de sequências que flanqueiam o DNA reivindicado. O termo, portanto, inclui, por exemplo, um DNA recombinante que é incorporado em um vetor, em um plasmídeo ou vírus de replicação autônoma, ou no DNA genômico de um procarionte ou eucarionte; ou que existe como uma molécula separada (*por exemplo*, um cDNA ou um genômico ou fragmento de cDNA produzido por reação de cadeia de polimerase (PCR) ou digestão de endonuclease de restrição) independente de outras sequências. Também se inclui um DNA recombinante, que é parte de um gene híbrido que codifica sequência de polipeptídeo adicional, *por exemplo*, uma proteína de fusão.

[000122] A presente invenção é adicionalmente direcionada a um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma composição imunorreativa de *Ehrlichia* e capaz de expressar o polinucleotídeo quando o vetor é introduzido em uma célula. Em concretizações específicas, o vetor compreende em ligação operável o seguinte: a) uma origem de replicação; b) um promotor; e c) uma sequência de DNA que codifica para a proteína.

[000123] Conforme aqui usado, "vetor" pode ser definido como uma construção de ácido nucleico replicável, *por exemplo*, um plasmídeo ácido nucleico viral. Os vetores podem ser usados para amplificar e/ou expressar ácido nucleico que codifica uma composição imunorreativa de *Ehrlichia*. Um vetor de expressão é uma construção replicável em que uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo é operavelmente ligada a sequências controle adequadas de efetuar expressão do polipeptídeo em uma célula. A necessidade de tais sequências controle variará dependendo da célula selecionada e do método de transformação escolhido. Geralmente, as sequências controle incluem um promotor transcracional e/ou intensificadora, locais de ligação ribossomal de mRNA adequados, e sequências que controlam a terminação de transcrição e tradução, por exemplo. Métodos que são bem conhecidos àqueles versados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão compreendendo sinais de controle transcracional e traducional apropriados. Vide, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Press, N.Y. Uma sequência de nucleotídeo a ser expressa e suas sequências controle transcrpcionais são definidas como sendo "operavelmente ligadas" se as sequências controle de transcrição controlam efetivamente a transcrição da sequência de polinucleotídeo. Os vetores da invenção incluem, mas não estão limitados a vetores de plasmídeo e vetores virais. Vetores virais preferidos da invenção são aqueles derivados de retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associado, vírus SV40, ou vírus herpes, por exemplo.

[000124] Em geral, vetores de expressão compreendem sequências promotoras que facilitam a transcrição eficiente do polinucleotídeo a ser expresso, são usados em conjunto com uma célula hospedeira. Conforme aqui usado, o termo "hospedeiro" é significativo para incluir

não somente procariontes, mas também eucariontes, tais como levedura, planta e células de animal. Um polinucleotídeo recombinante que codifica uma composição imunorreativa de *Ehrlichia* da presente invenção pode ser usado para transformar um hospedeiro usando quaisquer das técnicas comumente conhecido àqueles versados na técnica. Hospedeiros procariontes podem incluir *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis*. Hospedeiros eucariontes incluem leveduras, tais como *Pichia pastoris*, células de mamífero e células de inseto.

[000125] A descrição seguinte se refere a elementos exemplares, reagentes, e métodos para distribuição de polinucleotídeos e ácido nucleico de um polinucleotídeo de *Ehrlichia*.

A. Vetores

[000126] O termo "vetor" é usado para se referir a uma molécula de ácido nucleico transportadora em que uma sequência de ácido nucleico pode ser inserida para introdução em uma célula onde ela pode ser replicada. Uma sequência de ácido nucleico pode ser "exógena," que significa que ela é estranha à célula na qual o vetor está sendo introduzido ou que a sequência é homóloga a uma sequência na célula, mas em uma posição dentro do ácido nucleico da célula hospedeira na qual a sequência é ordinariamente não encontrada. Vetores incluem plasmídeos, cosmídeos, vírus (bacteriófago, vírus de animal, e vírus de planta), e cromossomos artificiais (*por exemplo*, YACs). Um versado na técnica estaria bem equipado para construir um vetor através de técnicas recombinantes padrões (vide, por exemplo, Maniatis *et al.*, 1988 e Ausubel *et al.*, 1994, ambos incorporados aqui por referência).

[000127] O termo "vetor de expressão" se refere a qualquer tipo de construção genética compreendendo um ácido nucleico que codifica para um RNA capaz de ser transcrito. Em alguns casos, as moléculas de RNA são então traduzidas em uma proteína, polipeptídeo ou

peptídeo. Em outros casos, estas sequências não são traduzidas, por exemplo, na produção de moléculas de antissentido ou ribozimas. Os vetores de expressão podem conter uma variedade de "sequências controle" que se referem a sequências de ácido nucleico necessárias para a transcrição e possivelmente tradução de uma sequência de codificação operavelmente ligada em uma célula hospedeira particular. Em adição às sequências controle que governam transcrição e tradução, vetores e vetores de expressão podem conter sequências de ácido nucleico que servem outras funções também e são descritas infra.

1. Promotores e Intensificadores

[000128] Um "promotor" é uma sequência de controle que é uma região de sequência de ácido nucleico na qual a iniciação e taxa de transcrição são controladas. Ele pode conter elementos genéticos no qual proteínas regulatórias e moléculas podem se ligar, tais como RNA polimerase e outros fatores de transcrição, para iniciar a transcrição específica de uma sequência de ácido nucleico. As frases "operativamente posicionada", "operativamente ligada", "sob controle", e "sob controle transcripcional" significam que um promotor está em uma localização funcional correta e/ou orientação em relação a uma sequência de ácido nucleico para controlar iniciação transcripcional e/ou expressão daquela sequência.

[000129] Um promotor geralmente compreende uma sequência que funciona para posicionar o sítio de partida para síntese de RNA. O melhor exemplo conhecido disto é a caixa TATA, mas em alguns promotores que carecem de uma caixa TATA, tais como, por exemplo, o promotor para o gene de mamífero terminal deoxinucleotidil transferase e o promotor para os genes SV40, um elemento discreto que ocorre no próprio sítio de partida ajuda a fixar o lugar de iniciação. Os elementos promotores adicionais regulam a frequência de iniciação transcripcional. Tipicamente, estes estão localizados na região 30 110 bp

a montante do sítio de partida, embora um número de promotores tenha sido mostrado para conter elementos funcionais à jusante do sítio de partida também. Para trazer uma sequência de codificação "sob o controle de" um promotor, posiciona-se a extremidade 5' do sítio de iniciação de transcrição da estrutura de leitura transcrecional "à jusante" de (*isto é*, 3' do) promotor escolhido. O promotor "a montante" estimula a transcrição do DNA e promove expressão do RNA codificado.

[000130] O espaçamento entre elementos promotores frequentemente é flexível, de modo que a função do promotor é preservada quando elementos são invertidos ou movidos entre si. No promotor tk, o espaçamento entre elementos promotores pode ser aumentado para 50 bp a parte antes da atividade começar a declinar. Dependendo do promotor, parece que elementos individuais podem funcionar ou cooperativamente ou independentemente para ativar transcrição. Um promotor pode ou não pode ser usado em conjunto com um "intensificador", que se refere a uma sequência regulatória de cis-ação envolvida na ativação transcrecional de uma sequência de ácido nucleico.

[000131] Um promotor pode ser um naturalmente associado com uma sequência de ácido nucleico, conforme pode ser obtida pelo isolamento das sequências de 5' de não codificação localizadas a montante do segmento de codificação e/ou exon. Tal promotor pode ser referido como "endógeno". Similarmente, um intensificador pode ser um naturalmente associado com uma sequência de ácido nucleico, localizada ou à jusante ou a montante daquela sequência. Alternativamente, certas vantagens serão ganhas pelo posicionamento do segmento de ácido nucleico de codificação sob o controle de um promotor recombinante ou heterólogo, que se refere a um promotor que não é normalmente associado com uma sequência de ácido nucleico em seu ambiente natural. Um intensificador recombinante ou heterólogo se refere também a um intensificador não normalmente associada com

uma sequência de ácido nucleico em seu meio natural. Tais promotores ou intensificadores podem incluir promotores ou intensificadores de outros genes, e promotores ou intensificadores isolados de qualquer outro vírus, ou célula procarionte ou eucarionte, e promotores ou intensificadores que não "ocorrem naturalmente", *isto* é, contendo elementos diferentes de regiões regulatórias transcricionais diferentes, e/ou mutações que alteram a expressão. Por exemplo, promotores que são mais comumente usados em construção de DNA recombinante incluem os beta lactamase (penicilinase), lactose e sistemas de promotor (trp) triptofano. Em adição à produção de sequências de ácido nucleico de promotores e intensificadores sinteticamente, sequências podem ser produzidas usando-se clonagem recombinante e/ou tecnologia de amplificação de ácido nucleico, incluindo PCR®, em conjunto com as composições descritas aqui (vide Patentes US N°s 4.683.202 e 5.928.906, cada uma aqui incorporada por referência). Além disso, é contemplado as sequências controle que direcionam transcrição e/ou expressão de sequências dentro de organelas não nucleares tais como mitocôndria, cloroplastos, e similares, pode ser empregados também.

[000132] Naturalmente, será importante empregar um promotor e/ou intensificador que direciona efetivamente a expressão do segmento de DNA na célula, organela, tipo de célula, tecido, órgão, ou organismo escolhido para expressão. Aqueles versados na técnica de biologia molecular geralmente conhecem o uso de promotores, intensificadores, e combinações de tipo de célula para expressão de proteína (vide, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, incorporado aqui por referência). Os promotores empregados podem ser constitutivos, específicos de tecido, indutíveis, e/ou úteis sob as condições apropriadas para direcionar alto nível de expressão do segmento de DNA introduzido, tal como é vantajoso na produção de larga escala de proteínas recombinantes e/ou

peptídeos. O promotor pode ser heterólogo ou endógeno.

[000133] O promotor pode ser adequado para uso em uma célula procariótica, uma célula eucariótica, ou ambas. Adicionalmente, qualquer combinação de promotor/intensificador (vide por, por exemplo, a Eukaryotic Promoter Data Base EPDB) pode também ser usada para acionar expressão. Uso de um sistema de expressão citoplasmico de T3, T7 ou SP6 é uma concretização possível.

2. Sinais de iniciação e Sítios de Ligação de Ribossomo Interno

[000134] Um sinal de iniciação específico também pode ser requerido para tradução eficiente de sequências de codificação. Estes sinais incluem o códon de iniciação de ATG ou sequências adjacentes. Os sinais de controle tradicional exógenos, incluindo o códon de iniciação de ATG, podem necessitar serem providos. Um versado na técnica seria prontamente capaz de determinar isto e proporcionando os sinais necessários. É bem conhecido que o códon de iniciação deve ser "em estrutura" com a estrutura de leitura da sequência de codificação desejada para assegurar tradução do inserto total. Os sinais de controle translacionais exógenos e códons de iniciação podem ser ou naturais ou sintéticos. A eficiência de expressão pode ser aumentada pela inclusão de elementos intensificadores de transcrição associados.

[000135] Em certas concretizações da invenção, o uso de elementos de locais de entrada de ribossomo internos (IRES) são usados para criar mensagens multigene, ou policistrônicas. Elementos de IRES são capazes de derivar o modelo de escaneamento de ribossomo de tradução dependente de 5' Cap metilatada e começar a tradução em locais internos (Pelletier e Sonenberg, 1988). Os elementos de IRES de dois membros da família picornavírus (polio e encefalomiocardite) foram descritos (Pelletier e Sonenberg, 1988), também um IRES de uma mensagem de mamífero (Macejak e Sarnow, 1991). Os elementos de IRES podem ser ligados a estruturas de leitura aberta heteróloga. Estruturas de leitura aberta múltipla

podem ser transcritas juntas, cada uma separada por um IRES, criando mensagens policistrônicas. Em virtude do elemento de IRES, cada estrutura de leitura aberta é acessível a ribossomas para tradução eficiente. Os genes múltiplos podem ser eficientemente expressos usando-se um promotor simples/intensificador para transcrever uma mensagem simples (vide Patentes US N^os 5.925.565 e 5.935.819, cada uma aqui incorporada por referência).

3. Locais de Clonagem Múltipla

[000136] Os vetores podem incluir um sítio de clonagem múltiplo (MCS), que é uma região de ácido nucleico que contém locais de enzima de restrição múltiplos, qualquer dos quais pode ser usado em conjunto com tecnologia recombinante padrão para digerir o vetor (vide, por exemplo, Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, e Cocea, 1997, incorporado aqui por referência). "Digestão de enzima de restrição" se refere à clivagem catalítica de uma molécula de ácido nucleico com uma enzima que funciona somente em localizações específicas em uma molécula de ácido nucleico. Muitas destas três enzimas de restrição são comercialmente disponíveis. O uso de tais enzimas é amplamente compreendido por aqueles versados na técnica. Frequentemente, um vetor é linearizado ou fragmentado usando-se uma enzima de restrição que corta dentro do MCS para capacitar sequências exógenas a serem ligadas ao vetor. "Ligaç^{ão}" se refere ao processo de formação de ligações de fosfodiéster entre dois fragmentos de ácido nucleico, que podem ser ou não ser contíguos entre si. Técnicas envolvendo enzimas de restrição e reações de ligação são bem conhecidas àqueles versados na técnica de tecnologia recombinante.

4. Sítios de Junção

[000137] Muitas moléculas eucarióticas de RNA transcritas suportarão junção de RNA para remover ítrons a partir de transcritos primários.

Os vetores contendo sequências eucarióticas genômicas requerem sítios de junção doadores e/ou aceitadores para assegurar processamento correto do transcrito para expressão de proteína (vide, por exemplo, Chandler *et al.*, 1997, aqui incorporado por referência.)

5. Sinais de Terminação

[000138] Os vetores ou construções da presente invenção geralmente compreenderão pelo menos um sinal de terminação. Um "sinal de terminação" ou "terminador" é compreendido das sequências de DNA envolvidas na terminação específica de um transcrito de RNA por uma RNA polimerase. Desse modo, em certas concretizações, um sinal de terminação que termina a produção de um transcrito de RNA é contemplado. Um terminador pode ser necessário *in vivo* para alcançar níveis de mensagem desejáveis.

[000139] Em sistemas eucarióticos, a região terminadora pode também compreender sequências de DNA específicas que permitem clivagem específicas locais do novo transcrito de modo a expor um sítio de poliadenilação. Este sinaliza uma polimerase endógena especializada para adicionar um estiramento de cerca de 200 A resíduos (polyA) à extremidade 3' do transcrito. As moléculas de RNA modificadas com esta calda polyA parece mais estável e são transladas mais eficientemente. Desse modo, em outras concretizações envolvendo eucariontes, é preferido que o terminador compreenda um sinal para a clivagem do RNA, e é mais preferido que o sinal do terminador promova poliadenilação da mensagem. O terminador e/ou elementos de sítio de poliadenilação podem servir para aumentar os níveis de mensagem e para minimizar leitura através do cassete em outras sequências.

[000140] Os terminadores contemplados para uso na invenção incluem qualquer terminador conhecido de transcrição aqui descrito ou conhecido a um versado na técnica, incluindo, mas não limitado a, por exemplo, as sequências de terminação de genes, tais como, por

exemplo, o terminador de hormônio de crescimento bovino ou sequências terminadoras virais, tal como, por exemplo, o terminador SV40. Em certas concretizações, o sinal de terminação pode ser uma falta de sequência transcrevível ou traduzível, tal como devido a um truncamento de sequência.

6. Sinais de Poliadenilação

[000141] Na expressão, particularmente expressão eucariótica, se incluirá tipicamente um sinal de poliadenilação para efetuar poliadenilação correta do transcrito. A natureza do sinal de poliadenilação não é acreditada ser crucial à prática bem-sucedida da invenção, e qualquer tal sequência pode ser empregada. Concretizações preferidas incluem o sinal de poliadenilação de SV40 ou o sinal de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino, conveniente e conhecido para funcionar bem em várias células alvos. A poliadenilação pode aumentar a estabilidade do transcrito ou pode facilitar o transporte citoplasmico.

7. Origens de Replicação

[000142] De modo a propagar um vetor em uma célula hospedeira, ele pode conter uma ou mais origens de locais de replicação (frequentemente denominadas "ori"), que é uma sequência de ácido nucleico específica em que replicação é iniciada. Alternativamente uma sequência de replicação autônoma (ARS) pode ser empregada se a célula hospedeira é levedura.

8. Marcadores Selecionáveis e Classificáveis

[000143] Em certas concretizações da invenção, células contendo uma construção de ácido nucleico da presente invenção podem ser identificadas *in vitro* ou *in vivo* incluindo um marcador no vetor de expressão. Tais marcadores deveriam conferir uma mudança identificável à célula, permitindo fácil identificação de células contendo o vetor de expressão. Geralmente, um marcador selecionável é um que confere uma propriedade que permite seleção. Um marcador

selecionável positivo é um em que a presença do marcador permite sua seleção, enquanto um marcador selecionável negativo é um em que sua presença previne sua seleção. Em exemplo de um marcador selecionável positivo é um marcador de resistência a fármaco.

[000144] Usualmente a inclusão de um marcador de resistência à fármaco auxilia na clonagem e identificação de transformantes, por exemplo, genes que conferem resistência a neomicin, puromycin, higromycin, DHFR, GPT, zeocin e histidinol são marcadores selecionáveis úteis. Em adição aos marcadores que conferem um fenótipo que permite a discriminação de transformantes baseado na implementação de condições, outros tipos de marcadores incluindo marcadores classificáveis tal como GFP, cuja base é análise colorimétrica, são também contemplados. Alternativamente, enzimas classificáveis tais como vírus simplex da herpes timidina kinase (tk) ou cloranfenicol acetiltransferase (CAT) podem ser utilizados. Um versado na técnica também saberia como empregar marcadores imunológicos, possivelmente em conjunto com análise de FACS. O marcador usado não é acreditado ser importante, considerando-se que é capaz de ser expresso simultaneamente com o ácido nucleico que codifica um produto de gene. Exemplos adicionais de marcadores selecionáveis e classificáveis são bem conhecidos a um versado na técnica.

9. Vetores de Plasmídeo

[000145] Em certas concretizações, um vetor de plasmídeo é contemplado para uso para transformar uma célula hospedeira. Em geral, vetores de plasmídeo contendo replicon e sequências controle que são derivados de espécies compatíveis com a célula hospedeira são usados em conjunto com estes hospedeiros. O vetor ordinariamente conduz um sítio de replicação, bem como sequências de marcação que são capazes de proporcionar seleção fenotípica em células transformadas. Em um exemplo não limitativo, *E. coli* é frequentemente

transformado usando-se derivados de pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie *E. coli*. pBR322 contém genes para resistência a ampicilina e tetraciclina e, desse modo, proporciona meio fácil para identificar células transformadas. O plasmídeo de pBR, ou outro plasmídeo microbiano ou fago devem também conter, ou ser modificado para conter, por exemplo, promotores que podem ser usados pelo organismo microbiano para expressão de suas próprias proteínas.

[000146] Em adição, vetores de fago contendo replicon e sequências controle que são compatíveis com o micro-organismo hospedeiro podem ser usados como vetores de transformação em conjunto com estes hospedeiros. Por exemplo, o fago lambda GEMTM 11 pode ser utilizado na produção de um vetor de fago recombinante que pode ser usado para transformar células hospedeiras, tais como, por exemplo, *E. coli* LE392.

[000147] Vetores de plasmídeo úteis adicionais incluem vetores pIN (Inouye *et al.*, 1985); e vetores pGEX, para uso na geração de proteínas de fusão solúveis de glutationa S transferase (GST) para purificação mais tarde e separação ou clivagem. Outras proteínas de fusão adequadas são aquelas com beta galactosidase, ubiquitina e similares.

[000148] As células hospedeiras bacteriais, por exemplo, *E. coli*, compreendendo o vetor de expressão são crescidas em qualquer de um número de meio adequado, por exemplo, LB. A expressão da proteína recombinante em certos vetores pode ser induzida, conforme seria compreendido por aqueles versados na técnica, pelo contato de uma célula hospedeira com um agente específico para certos promotores, *por exemplo*, pela adição de IPTG ao meio ou por comutação de incubação a uma temperatura mais alta. Após cultivo da bactéria por um período adicional, geralmente de entre 2 e 24 horas, as células são coletadas por centrifugação e lavadas para remover meio residual.

10. Vetores Virais

[000149] A capacidade de certos vírus infectarem células ou entrarem nas células *via* endocitose mediada por receptor, e integrarem-se em genoma de célula hospedeira e expressarem genes virais estavelmente e eficientemente os tem tornado candidatos atrativos para a transferência de ácidos nucleicos estranho em células (*por exemplo*, células de mamífero). Os componentes da presente invenção podem compreender um vetor viral que codifica uma ou mais composições ou outros componentes tais como, por exemplo, um imunomodulador ou adjuvante. Exemplos não limitativos de vetores de vírus que podem ser usados para distribuir um ácido nucleico da presente invenção são descritos abaixo.

a. Vetores Adenovirais

[000150] Um método particular para distribuição do ácido nucleico envolve o uso de um vetor de expressão de adenovírus. Embora os vetores de adenovírus sejam conhecidos por ter uma baixa capacidade de integração no DNA genômico, esta característica é contrabalanceada pela alta eficiência de transferência de gene proporcionada por estes vetores. "Vetor de expressão de adenovírus" é significativo incluir aquelas construções contendo sequências de adenovírus suficiente para (a) suportar acondicionamento da construção e (b) expressar ultimamente um tecido ou construção específica de célula que foi clonada neste. O conhecimento da organização genética ou adenovírus, um vírus de DNA de fita dupla, linear, de 36 kb, permite substituição de grandes peças de DNA adenoviral com sequências estranhas até 7 kb (Grunhaus e Horwitz, 1992).

b. Vetores AAV

[000151] O ácido nucleico pode ser introduzido na célula usando-se transfecção auxiliada por adenovírus. As eficiências de transfecção aumentadas foram reportadas nos sistemas de célula usando-se sistemas acoplados de adenovírus (Kelleher e Vos, 1994; Cotten *et al.*,

1992; Curiel, 1994). Vírus adeno associado (AAV) é um sistema de vetor atrativo para uso nas composições da presente invenção, visto que ele tem uma alta frequência de integração e ele pode infectar células de não divisão, tornando-o, desse modo, útil para distribuição de genes em células de mamífero, por exemplo, em cultura de célula (Muzyczka, 1992) ou *in vivo*. AAV tem uma ampla faixa de hospedeiro para infectividade (Tratschin *et al.*, 1984; Laughlin *et al.*, 1986; Lebkowski *et al.*, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988). Detalhes concernentes à geração e uso de vetores rAAV são descritos nas Patentes US N^{os} 5.139.941 e 4.797.368, cada uma incorporada aqui por referência.

c. Vetores Retrovirais

[000152] Os retrovírus são úteis como vetores de distribuição devido a sua capacidade de integrar seus genes no genoma de hospedeiro, transferindo uma grande quantidade de material genético estranho, infectando um amplo espectro de espécies e tipos de célula e de ser acondicionado em linhas de célula especiais (Miller, 1992).

[000153] De modo a construir um vetor retroviral, um ácido nucleico (*por exemplo*, um que codifica uma composição de interesse) é inserido no genoma viral no lugar de certas sequências virais para produzir um vírus que é defectivo de replicação. De modo a produzir vírions, uma linha de célula de acondicionamento contendo os genes gag, pol, e env, mas sem o LTR e componentes de acondicionamento são construídos (Mann *et al.*, 1983). Quando um plasmídeo recombinante contendo um cDNA, junto com o LTR retroviral e sequências de acondicionamento é introduzido em uma linha de célula especial (*por exemplo*, por precipitação de fosfato de cálcio, *por exemplo*), a sequência de acondicionamento permite que o transcrito de RNA do plasmídeo recombinante a ser acondicionado em partículas virais, que são, então, secretados no meio de cultura (Nicolas e Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). O meio contendo os retrovírus recombinantes

é, então, coletado, opcionalmente concentrado, e usado para transferência de gene. Os vetores retrovirais são capazes de infectar uma ampla variedade de tipos de célula. Contudo, integração e expressão estável requerem a divisão de células hospedeiras (Paskind *et al.*, 1975).

[000154] Lentivírus são retrovírus complexos, que, em adição aos genes retrovirais comuns gag, pol, e env, contêm outros genes com função regulatória ou estrutural. Vetores lentivirais são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; Patentes US N^{os} 6.013.516 e 5.994.136). Alguns exemplos de lentivírus incluem os Vírus da Imunodeficiência Humana: HIV-1, HIV-2 e o Vírus da Imunodeficiência Símia: SIV. Os vetores lentivirais foram gerados por atenuação múltipla dos genes de virulência de HIV, por exemplo, os genes env, vif, vpr, vpu e nef são anulados, tornando o vetor biologicamente seguro.

[000155] Vetores lentivirais recombinantes são capazes de infectar células de não divisão e podem ser usados para ambas transferência de gene *in vivo* e *ex vivo* e expressão de sequências de ácido nucleico. Por exemplo, lentivírus recombinante capazes de infectar uma célula de não divisão no qual uma célula hospedeira adequada é transfetada com dois ou mais vetores que conduzem as funções de acondicionamento, denominados gag, pol e env, bem como rev e tat é descrito na Patente U.S. Nº 5.994.136, incorporada aqui referência. Pode-se alcançar o vírus recombinante pela ligação da proteína envelope com um anticorpo ou um ligante particular para alvejar a um receptor de um tipo de célula particular. Pela inserção de uma sequência (incluindo uma região regulatória) de interesse no vetor viral, junto com outro gene que codifica o ligante para um receptor em uma célula alvo específica, por exemplo, o vetor é agora específico de alvo.

d. Outros Vetores Virais

[000156] Outros vetores virais podem ser empregados como construções de vacina na presente invenção. Os vetores derivados de vírus tais como vírus de vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal e Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), vírus sindbis, vírus citomegalovírus e vírus simplex da herpes podem ser empregados. Eles oferecem várias características atrativas para várias células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal e Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwitz *et al.*, 1990).

e. Distribuição Usando Vírus Modificados

[000157] Um ácido nucleico a ser distribuído pode ser alojado dentro de um vírus infectivo que foi projetado para expressar um ligante de ligação específica. A partícula de vírus, desse modo, se ligará especificamente aos receptores cognatos da célula alvo e distribui os conteúdos para a célula. Uma nova aproximação designada para permitir direcionamento específico de vetores de retrovírus foi desenvolvido baseado na modificação química de um retrovírus pela adição química de resíduos de lactose ao envelope virêmico I. Esta modificação pode permitir a infecção específica de hepatócitos *via* receptores de sialoglicoproteína.

[000158] Outra aproximação para direcionamento de retrovírus recombinante foi designada em que anticorpos biotinilatados contra proteína envelope retroviral e contra um receptor de célula específico foram usados. Os anticorpos foram acoplados *via* os componentes de biotin pelo uso de streptavidin (Roux *et al.*, 1989). Usando-se anticorpos contra classe complexa de histocompatibilidade maior I e antígenos de classe II, eles demonstraram a infecção de uma variedade de células humanas que perfuram estes antígenos superficiais com um vírus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

11. Distribuição de Vetor e Transformação de Célula

[000159] Métodos adequados para distribuição de ácido nucleico

ehrlichial para transformação de uma organela, uma célula, um tecido ou um organismo para uso com a presente invenção são acreditados incluírem virtualmente qualquer método pelo qual um ácido nucleico (*por exemplo*, DNA) pode ser introduzido em uma organela, uma célula, um tecido ou organismo, conforme descrito aqui ou conforme seria conhecido a um dos versados na técnica. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a, distribuição direta de DNA tal como por transfecção *ex vivo* (Wilson *et al.*, 1989, Nabel *et al.*, 1989), por injeção (Patentes US N^{os} 5.994.624. 5.981.274. 5.945.100. 5.780.448. 5.736.524. 5.702.932. 5.656.610. 5.589.466 e 5.580.859, cada aqua incorporada por referência), incluindo microinjeção (Harlan e Weintraub, 1985; Patente U.S. N^º 5.789.215, incorporada aqua por referência); por eletroporação (Patente U.S. N^º 5.384.253, incorporada aqua por referência; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); por precipitação de fosfato de cálcio (Graham e Van Der Eb, 1973; Chen e Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); pelo uso de DEAE dextrano, seguido por polietileno glicol (Gopal, 1985); por carregamento sônico direto (Fechheimer *et al.*, 1987); por transfecção mediada por lipossomo (Nicolau e Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) e transfecção mediada por receptor (Wu e Wu, 1987; Wu e Wu, 1988); por bombardeio de micropojétil (Pedido PCT N^{os} WO 94/09699 e 95/06128; Patente U.S. N^{os} 5.610.042; 5.322.783 5.563.055. 5.550.318. 5.538.877 e 5.538.880, e cada incorporada aqua por referência); por agitação com fibras de carbeto de silício (Kaepller *et al.*, 1990; Patente U.S. N^{os} 5.302.523 e 5.464.765, cada incorporada aqua por referência); por transformação mediada por Agrobacterium (Patente U.S. N^{os} 5.591.616 e 5.563.055, cada incorporada aqua por referência); por transformação mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh *et al.*, 1993; Patente U.S. N^{os} 4.684.611 e 4.952.500, cada incorporada aqua por referência); por entendimento

de DNA mediado por dissecação/inibição (Potrykus *et al.*, 1985), e qualquer combinação de tais métodos. Através da aplicação de técnicas tais como estas, organela (s), célula (s), tecido (s) ou organismo(s) podem ser estavelmente ou transientemente transformados.

a. Transformação *Ex vivo*

[000160] Métodos para tranfecção de células vasculares e tecidos removidos de um organismo em um ajuste *ex vivo* são conhecidos àqueles versados na técnica. Por exemplo, células endoteliais caninas foram geneticamente alteradas por transferência de gene retrovirais *in vitro* e transplantadas em um canino (Wilson *et al.*, 1989). Em outro exemplo, células endoteliais de porquinhos yucatan foram tranfetadas pelo retrovírus *in vitro* e transplantadas em uma artéria usando um cateter de balão duplo (Nabel *et al.*, 1989). Desse modo, é contemplado que células ou tecidos podem ser removidos e tranfetados *ex vivo* usando os ácidos nucleicos da presente invenção. Em aspectos particulares, as células transplantadas ou tecidos podem ser colocados em um organismo. Em facetas preferidas, um ácido nucleico é expresso nas células transplantadas ou tecidos.

b. Injeção

[000161] Em certas concretizações, um ácido nucleico pode ser distribuído a uma organela, uma célula, um tecido ou um organismo *via* uma ou mais injeções (*isto é*, uma injeção de agulha), tal como, por exemplo, subcutaneamente, intradermalmente, intramuscularmente, intervenosamente, intraperitonealmente, *etc.* Métodos de injeção de vacinas são bem conhecidos àqueles versados na técnica (*por exemplo*, injeção de uma composição compreendendo uma solução salina). Concretizações adicionais da presente invenção incluem a introdução de um ácido nucleico por microinjeção direta. A microinjeção direta foi usada para introduzir construtos de ácido nucleico em *Xenopus* oócitos (Harland e Weintraub, 1985). A quantidade de composição usada pode

variar sob a natureza do antígeno, bem como a organela, célula, tecido ou organismo usados.

c. Electroporação

[000162] Em certas concretizações da presente invenção, um ácido nucleico é introduzido em uma organela, uma célula, um tecido ou um organismo *via* eletroporação. A eletroporação envolve a exposição de uma suspensão de células e DNA a uma descarga de alta voltagem elétrica. Em algumas variantes deste método, certas enzimas de degradação de parede celular, tais como enzimas de degradação de pectina, são empregadas para tornar as células recipientes alvos mais susceptíveis a transformação por eletroporação do que células não tratadas (Patente U.S. Nº 5.384.253, incorporada aqui por referência). Alternativamente, células recipientes podem ser produzidas mais susceptíveis a transformação por bobinamento químico.

[000163] A transfecção de células eucarióticas usando eletroporação foi muito bem sucedida. Os linfócitos pre B de camundongo foram transfectados com genes de imunoglobulina kappa humano (Potter *et al.*, 1984), e hepatócitos de rato foram transfectados com o gene de cloranfenicol acetiltransferase (Tur Kaspa *et al.*, 1986) dessa maneira.

[000164] Para efetuar a transformação por eletroporação em células tais como, por exemplo, células de planta, pode-se empregar ou tecidos friáveis, tais como uma cultura de suspensão de células ou callus embriogênicos alternativamente pode-se transformar embriões imaturos ou outro tecido organizado diretamente. Nesta técnica, se degradaria parcialmente as paredes de célula das células escolhidas por exposição das mesmas a enzimas de degradação de pectina (pectolases) ou bobinando-se mecanicamente em uma maneira controlada. Exemplos de algumas espécies que foram transformadas por eletroporação de células intactas incluem milho (Patente U.S. Nº 5.384.253; Rhodes *et al.*, 1995; D'Halluin *et al.*, 1992), trigo (Zhou *et al.*, 1993), tomate (Hou e

Lin, 1996), soja (Christou *et al.*, 1987) e tabaco (Lee *et al.*, 1989).

[000165] Pode-se também empregar protoplastos para eletroporação de células de planta (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Por exemplo, a geração de plantas de soja transgênicas por eletroporação de protoplastos derivados de cotiledon é descrita por Dhir e Widholm no Pedido de Patente Internacional Nº WO 9217598, incorporado aqui por referência. Outros exemplos de espécie para qual transformação de protoplastos foram descritos incluem cevada (Lazerri, 1995), sorgo (Battraw *et al.*, 1991), milho (Bhattacharjee *et al.*, 1997), trigo (He *et al.*, 1994) e tomate (Tsukada, 1989).

d. Fosfato de Cálcio

[000166] Em outras concretizações da presente invenção, um ácido nucleico é introduzido às células usando precipitação de fosfato de cálcio. As células KB humanas foram transfectadas com adenovírus 5 DNA (Graham e Van Der Eb, 1973) usando esta técnica. Também dessa maneira, camundongo L(A9), camundongo C127, CHO, CV 1, BHK, NIH3T3 e células HeLa foram transfectadas com um gene marcador de neomicin (Chen e Okayama, 1987), e hepatócitos de rato foram transfectados com uma variedade de genes marcadores (Rippe *et al.*, 1990).

e. DEAE Dextrano

[000167] Em outra concretização, um ácido nucleico é distribuído em uma célula usando-se DEAE dextrano, seguido por polietileno glicol. Dessa maneira, plasmídeos relatores foram introduzidos em mieloma de camundongo e células de eritroleucemia (Gopal, 1985).

f. Carregamento de Sonicação

[000168] Concretizações adicionais da presente invenção incluem a introdução de um ácido nucleico por carregamento sônico direto. Os fibroblastos de LTK foram transfectados com o gene timidina kinase por carregamento de sonicação (Fechheimer *et al.*, 1987).

g. Transfecção Mediada por Lipossomo

[000169] Em uma concretização adicional da invenção, um ácido nucleico ehrlichial pode ser compreendido com um complexo de lipídeo tal como, por exemplo, compreendido em um lipossomo. Os lipossomos são estruturas vesiculares caracterizadas por uma membrana de bicamada de fosfolipídeo e um meio aquoso interno. Os lipossomos multilamelares têm camadas de lipídeo múltiplas separadas por meio aquoso. Eles se formam espontaneamente quando os fosfolipídeos são suspensos em um excesso de solução aquosa. Os componentes de lipídeo suportam auto re-arranjo antes da formação de estruturas fechadas e prendem água e solutos dissolvidos entre as bicamadas de lipídeo (Ghosh e Bachhawat, 1991). Também contemplado é um ácido nucleico complexado com Lipofectamina (Gibco BRL) ou Superfect (Qiagen).

[000170] A distribuição e expressão de ácido nucleico mediada por lipossomo de DNA estranho *in vitro* foi muito bem sucedida (Nicolau e Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987). A praticabilidade de distribuição e expressão mediada por lipossomo de DNA estranho em embrião de galinha cultivado, células HeLa e de hepatoma foram também demonstradas (Wong *et al.*, 1980).

[000171] Em certas concretizações da invenção, um lipossomo pode ser complexado com um vírus de hemaglutinação (HVJ). Isto foi mostrado facilitar fusão com a membrana de célula e promove entrada de célula de DNA encapsulado com lipossomo (Kaneda *et al.*, 1989). Em outras concretizações, um lipossomo pode ser complexado ou empregado em conjunto com proteínas cromossomais nucleares de não histona (HMG 1) (Kato *et al.*, 1991). Em ainda outras concretizações, um lipossomo pode ser complexado ou empregado em conjunto com ambos HVJ e HMG 1. Em outras concretizações, um veículo de distribuição pode compreender um ligante e um lipossomo.

h. Transfecção Mediada por Receptor

[000172] Ainda adicionalmente, um ácido nucleico pode ser distribuído a uma célula alvo *via* veículos de distribuição mediados por receptor. Estes levam vantagem do entendimento seletivo de macromoléculas por endocitose mediada por receptor que estará ocorrendo em uma célula alvo. Em vista da distribuição específica de tipo de célula de vários receptores, este método de distribuição adiciona outro grau de especificidade à presente invenção.

[000173] Certos veículos de direcionamento de gene mediados por receptor compreendem um ligante específico de receptor de célula e um agente de ligação de ácido nucleico. Outros compreendem um ligante específico de receptor de célula ao qual o ácido nucleico a ser distribuído foi operativamente fixado. Vários ligantes foram usados para transferência de gene mediada por receptor (Wu e Wu, 1987; Wagner *et al.*, 1990; Perales *et al.*, 1994; Myers, EPO 0273085), que estabelecem a operabilidade da técnica. A distribuição específica no contexto de outro tipo de célula de mamífero foi descrita (Wu e Wu, 1993; incorporada aqui por referência). Em certos aspectos da presente invenção, um ligante será escolhido para corresponder a um receptor especificamente expresso na população de célula alvo.

[000174] Em outras concretizações, um componente de veículo de distribuição de ácido nucleico de um veículo de alvo de ácido nucleico específico de célula pode compreender um ligante de ligação específica em combinação com um lipossomo. Os ácido(s) nucleico(s) a ser(em) distribuído(s) é (são) alojado(s) dentro do lipossomo e o ligante de ligação específico é funcionalmente incorporado na membrana de lipossomo. O lipossomo, desse modo, se ligará especificamente ao(s) receptor(es) de uma célula alvo e distribuirá os conteúdos a uma célula. Tais sistemas foram mostrados serem funcionais usando-se sistemas em que, por exemplo, fator de crescimento epidermal (EGF) é usado na

distribuição mediada por receptor de um ácido nucleico a células que exibem regulação ascendente do receptor de EGF.

[000175] Em ainda outras concretizações, o componente de veículo de distribuição de ácido nucleico de um veículo de distribuição alvo pode ser um próprio lipossomo, que compreenderá preferivelmente um ou mais lipídeos ou glicoproteínas que direcionam ligação específica de célula. Por exemplo, lactosil ceramida, uma galactose terminal asialganglioside, foram incorporadas nos lipossomos e observado um aumento no entendimento do gene de insulina por hepatócitos (Nicolau *et al.*, 1987). É contemplado que as construtos de transformação específicas de tecido da presente invenção podem ser especificamente distribuídas em uma célula alvo em uma maneira similar.

i. Bombardeo de Micropojétil

[000176] Técnicas de bombardeio de micropojétil podem ser usadas para introduzir um ácido nucleico em pelo menos uma organela, célula, tecido ou organismo (Patente U.S. Nº 5.550.318; Patente U.S. Nº 5.538.880; Patente U.S. Nº 5.610.042; e Pedido PCT WO 94/09699; cada um do qual é incorporado aqui por referência). Este método depende da capacidade de acelerar micropojéteis revestidos com DNA a uma alta velocidade permitindo que os mesmos perfurem as membranas de célula e entrem nas células sem matá-las (Klein *et al.*, 1987). Existe uma ampla variedade de técnicas de bombardeio de micropojétil conhecidas na técnica, muitas das quais sendo aplicáveis à invenção.

[000177] O bombardeio de micropojétil pode ser usado para transformar várias célula(s), tecido(s) ou organismo(s), tal como, por exemplo, qualquer espécie de planta. Exemplos de espécie que foram transformadas por bombardeio de micropojétil incluem espécie de monocotiledônia tal como milho (Pedido PCT WO 95/06128), cevada (Ritala *et al.*, 1994; Hensgens *et al.*, 1993), milho (Patente U.S. Nº

5.563.055, incorporada aqui por referência), arroz (Hensgens *et al.*, 1993), aveia (Torbet *et al.*, 1995; Torbet *et al.*, 1998), centeio (Hensgens *et al.*, 1993), cana-de-açúcar (Bower *et al.*, 1992), e sorgo (Casas *et al.*, 1993; Hagio *et al.*, 1991); bem como um número de dicotiledônias incluindo tabaco (Tomes *et al.*, 1990; Busing e Benbow, 1994), soja (Patente U.S. Nº 5.322.783, incorporada aqui por referência), girassol (Knittel *et al.* 1994), amendoim (Singsit *et al.*, 1997), algodão (McCabe e Martinell, 1993), tomate (VanEck *et al.* 1995), e legumes em geral (Patente U.S. Nº 5.563.055, incorporada aqui por referência).

[000178] Neste bombardeio de microprojétila, uma ou mais partículas podem ser revestidas com pelo menos um ácido nucleico e distribuídos em células por uma força de propulsão. Vários dispositivos para aceleração de partículas pequenas foram desenvolvidos. Tal dispositivo ocorrem em uma descarga de alta voltagem para gerar uma corrente elétrica, que, por sua vez, proporciona a força motiva (Yang *et al.*, 1990). Os microprojéteis usados consistiram de substâncias biologicamente inertes tais como tungstênio ou partículas de ouro ou contas. Partículas exemplares incluem aquelas de tungstênio, platina, e preferivelmente, ouro. É contemplado que em alguns exemplos a precipitação de DNA em partículas de metal não seriam necessárias para distribuição de DNA para uma célula recipiente usando bombardeio de microprojétil. Contudo, é contemplado que as partículas podem conter DNA preferivelmente do que serem revestidas com DNA. As partículas revestidas com DNA podem aumentar o nível de distribuição de DNA *via* bombardeio de partícula, mas não necessárias.

[000179] Para o bombardeio, as células em suspensão são concentradas em filtros ou meio de cultura sólido. Alternativamente, embriões imaturos ou outras células alvos podem ser dispostos no meio de cultura sólido. As células a serem bombardeadas são posicionadas a uma distância apropriada abaixo da placa de cessamento de macroprojétil.

[000180] Uma concretização ilustrativa de um método para distribuição de DNA em uma célula (*por exemplo*, uma célula de planta) por aceleração é o Biolistics Particle Delivery System, que pode ser usado para propelir partículas revestidas com DNA ou células através de uma peneira, tal como uma peneira de aço inoxidável ou Nytex, em uma superfície de filtro coberta com células, tal como, por exemplo, células de planta monocotiledônia cultivadas em suspensão. A peneira dispersa as partículas de modo que elas não são distribuídas às células recipientes em grandes agregados. É acreditado que uma peneira que intervém entre o aparelho de projétil e as células a serem bombardeadas reduzem o tamanho de agregados de projéteis e podem contribuir para uma frequência mais alta de transformação pela redução do dano infligido nas células recipientes por projéteis que são muito grandes.

12. Células Hospedeiras

[000181] Conforme aqui usado, os termos "célula", "linha de célula", e "cultura de célula" podem ser usados permutavelmente. Todos estes termos também incluem sua progenia, que é qualquer e todas as gerações subsequentes. É compreendido que toda a progenia não pode ser idêntica devido a mutações deliberadas ou inadvertentes. No contexto de expressão de uma sequência de ácido nucleico heteróloga, "célula hospedeira" se refere a uma célula procariótica ou eucariótica, e inclui qualquer organismo transformável que é capaz de replicar um vetor e/ou expressar um gene heterólogo codificado por um vetor. Uma célula hospedeira pode, e tem sido, usada como um recipiente para vetores. Uma célula hospedeira pode ser "transfetada" ou "transformada", que se refere a um processo pelo qual ácido nucleico exógeno é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula transformada inclui a célula individual primária e sua progenia. Conforme aqui usado, os termos células "projetadas" e "recombinantes" ou células hospedeiras são pretendidas para se referirem a uma célula

na qual uma sequência de ácido nucleico exógena, tal como, por exemplo, um vetor, foi introduzida. Portanto, células recombinantes são distinguíveis de células que ocorrem naturalmente que não contêm um ácido nucleico recombinantemente introduzido.

[000182] Em certas concretizações, é contemplado que RNAs ou sequências proteináceas podem ser coexpressos com outros RNAs selecionados ou sequências proteináceas na mesma célula hospedeira. A coexpressão pode ser alcançada por cotransfecção da célula hospedeira com dois ou mais vetores distintos recombinantes. Alternativamente, um vetor recombinante simples pode ser construído para incluir regiões de codificação distintas múltiplas para RNAs, que podem, em seguida, serem expressas em células hospedeiras transfetadas com o vetor simples.

[000183] Um tecido pode compreender uma célula hospedeira ou células a serem transformadas com uma composição da invenção. O tecido pode ser parte ou separado de um organismo. Em certas concretizações, um tecido pode compreender, mas não é limitado a, adipócitos, alveolares, ameloblastos, axônio, células basais, sangue (por exemplo, linfócitos), vaso sanguíneo, osso, tutano de osso, cérebro, seio, cartilagem, colo do útero, cólon, córnea, embrônico, endométrio, endotelial, epitelial, esôfago, facia, fibroblasto, folicular, células de ganglion, células gliais, células de copo, rim, fígado, pulmão, nodo de linfa, músculo, neurônio, ovários, pâncreas, sangue periférico, próstata, pele, intestino delgado, baço, células tronco, estômago, testes, anteras, tecido ascite, espigas, alças, flores, cascas, sementes, folhas, células meristêmicas, pólen, pontas de raiz, raízes, seda, talos, e todos os cânceres dos mesmos.

[000184] Em certas concretizações, a célula hospedeira ou tecido podem ser compreendidos de pelo menos um organismo. Em certas concretizações, o organismo pode ser, mas não é limitado a, um

procarionte (por exemplo, uma eubactéria, uma archaea), ou um eucariote, conforme seria compreendido por um dos versados na técnica (vide, por exemplo, webpage <http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>).

[000185] Numerosas linhas de célula e culturas são disponíveis para uso como uma célula hospedeira, e elas podem ser obtidas através de American Type Culture Collection (ATCC), que é uma organização que serve como um arquivo para culturas vivas e materiais genéticos (www.atcc.org). Um hospedeiro apropriado pode ser determinado por um dos versados na técnica baseado no suporte do vetor e no resultado desejado. Um plasmídeo ou cosmídeo, por exemplo, pode ser introduzido em uma célula hospedeira procariote para replicação de muitos vetores. Os tipos de célula disponíveis para replicação de vetor e/ou expressão incluem, mas não são limitados a, bactéria, tal como *E. coli* (por exemplo, cepa de *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC Nº 31537), bem como *E. coli* W3110 (F⁻, lambda⁺, prototrófico, ATCC Nº 273325), DH5 α , JM109, e KC8, bacilos tal como *Bacillus subtilis*; e outras enterobacteriaceae tais como *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, várias espécies de *Pseudomonas*, bem como um número de hospedeiros bacteriais comercialmente disponíveis tais como SURE[®] Competent Cells e SOLOPACK Gold Cells (STRATAGENE[®], La Jolla). Em certas concretizações, células bacteriais tal como *E. coli* LE392 são particularmente contempladas como células hospedeiras para vírus de fago.

[000186] Exemplos de células hospedeiras eucarióticas para replicação e/ou expressão de um vetor incluem, mas não são limitados a, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos, e PC12. Muitas células hospedeiras de vários tipos de célula e organismos são disponíveis e seriam conhecidas a um versado na técnica. Similarmente, um vetor viral pode ser usado em conjunto com uma célula hospedeira eucariótica ou uma célula hospedeira procariótica, particularmente uma

que é permissiva para replicação ou expressão do vetor.

[000187] Alguns vetores podem empregar sequências controle que permitem que eles sejam replicados e/ou expressos em ambas as células procarióticas e eucarióticas. Um dos versados na técnica compreenderia adicionalmente as condições sob as quais se incuba todas as células hospedeiras acima descritas para mantê-las e para permitir replicação de um vetor. Também compreendida e conhecida são técnicas e condições que permitiriam produção em larga escala de vetores, bem como produção dos ácidos nucleicos codificados pelos vetores e seus polipeptídeos cognatos, proteínas, ou peptídeos.

13. Sistemas de Expressão

[000188] Numerosos sistemas de expressão existem que compreendem pelo menos uma parte ou todas das composições discutidas acima. Sistemas baseados em procarionte e/ou eucarionte podem ser empregados para uso com a presente invenção para produzir sequências de ácido nucleico, ou seus polipeptídeos cognatos, proteínas e peptídeos. Muitos tais sistemas são comercialmente e amplamente disponíveis.

[000189] O sistema de célula de inseto/baculovírus pode produzir um alto nível de expressão de proteína de um segmento heterólogo de ácido nucleico, tal como descrito nas Patentes US Nº 5.871.986, 4.879.236, ambas aqui incorporadas por referência, e que podem ser compradas, por exemplo, sob o nome MAXBAC® 2.0 de INVITROGEN® e BACPACK® BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM FROM CLONTECH®.

[000190] Outros exemplos de sistemas de expressão incluem STRATAGENE®'s COMPLETE CONTROL Inducible Mammalian Expression System, que envolve um receptor indutível de ecdisona sintética, ou seu pET Expression System, um sistema de expressão de *E. coli*. Outro exemplo de um sistema de expressão indutível é

disponível de INVITROGEN®, que conduz o Sistema T-REX® (expressão regulada por tetraciclina), um sistema de expressão de mamífero indutível que usa o promotor CMV de comprimento total. INVITROGEN® também proporciona um sistema de expressão de levedura denominado o Pichia methanolica Expression System, que é designado para produção de alto nível de proteínas recombinantes na levedura metilotrófica Pichia methanolica. Um versado na técnica saberia como expressar um vetor, tal como uma construção de expressão, para produzir uma sequência de ácido nucleico, ou seu polipeptídeo cognato, proteína, ou peptídeo.

[000191] É contemplado que as proteínas, polipeptídeos ou peptídeos produzidos pelos métodos da invenção podem ser "sobre expressos", isto é, expressos em níveis aumentados relativos a sua expressão natural nas células. Tal sobre expressão pode ser avaliada por uma variedade de métodos, incluindo radioetiquetação e/ou purificação de proteína. Contudo, métodos simples e diretos são preferidos, por exemplo, aqueles envolvendo SDS/PAGE e marcação de proteína ou marcação por Western (Western blotting), seguido por análise quantitativa, tal como escaneamento densitométrico do gel resultante ou mancha. Um aumento específico no nível da proteína recombinante, polipeptídeo ou peptídeo em comparação ao nível em células naturais é indicativo de sobre expressão, como é uma abundância relativa da proteína específica, polipeptídeos ou peptídeos em relação a outras proteínas produzidas pela célula hospedeira e, *por exemplo*, visível em um gel.

[000192] Em algumas concretizações, a sequência proteinácea expressa um corpo de inclusão na célula hospedeira, as células hospedeiras são lisadas, por exemplo, por rompimento em um homogeneizador de célula, lavadas e/ou centrifugadas para separar os corpos de inclusão densos e membranas de célula a partir dos

componentes de célula solúveis. Esta centrifugação pode ser realizada sob condições pelas quais os corpos de inclusão densos são seletivamente enriquecidos por incorporação de açúcares, tal como sacarose, no tampão e centrifugação a uma velocidade seletiva. Os corpos de inclusão podem ser solubilizados em soluções contendo altas concentrações de ureia (*por exemplo*, 8M) ou agentes caotrópicos tal como hidrocloreto de guanidina na presença de agentes de redução, tais como beta mercaptoetanol ou DTT (ditiotreitol), e redobrados em uma conformação mais desejável, conforme seria conhecido a um versado na técnica.

VI. Equivalentes Funcionais Biológicos

[000193] Como modificações e/ou mudanças podem ser produzidas na estrutura dos polinucleotídeos e/ou proteínas de acordo com a presente invenção, enquanto se obtém moléculas tendo características similares ou aperfeiçoadas, tais equivalentes biologicamente funcionais são também envolvidos dentro da presente invenção.

A. Polinucleotídeos e Polipeptídeos Modificados

[000194] Um equivalente biológico funcional pode compreender um polinucleotídeo que foi projetado para conter sequências distintas enquanto, ao mesmo tempo, retém a capacidade de codificar a proteína "tipo selvagem" ou padrão. Isto pode ser acompanhado pela degeneração do código genético, isto é, a presença de códons múltiplos, que codificam para os mesmos aminoácidos. Em um exemplo, um versado na técnica pode desejar introduzir uma sequência de reconhecimento de enzima de restrição em um polinucleotídeo enquanto não provoca distúrbio na capacidade do polinucleotídeo codificar uma proteína.

[000195] Em outro exemplo, um polinucleotídeo pode ser (e codifica) um equivalente biológico funcional com mais mudanças significantes. Certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos em

uma estrutura de proteína sem perda apreciável de capacidade de ligação interativa com estruturas tais como, por exemplo, regiões de ligação de antígeno de anticorpos, locais de ligação em moléculas de substrato, receptores, e tais similares. Mudanças assim denominadas "conservativas" não rompem a atividade biológica da proteína, visto que a mudança estrutural não é uma que impinge a capacidade da proteína efetuar sua função designada. É, desse modo, contemplado pelos inventores que várias mudanças podem ser feitas na sequência de genes e proteínas aqui descrita, enquanto ainda preencherá os objetivos da presente invenção.

[000196] Em termos de equivalentes funcionais, é bem compreendido pelo versado na técnica que, inerente na definição de uma proteína "equivalente biologicamente funcional" e/ou polinucleotídeo, é o conceito que existe um limite para o número de mudanças que pode ser feito dentro de uma porção definida da molécula, enquanto retém uma molécula com um nível aceitável de atividade biológica equivalente. Os equivalentes biologicamente funcionais são, desse modo, aqui definidos como aquelas proteínas (e polinucleotídeos) em aminoácidos selecionados (ou códons) podem ser substituídos.

Atividade Funcional

[000197] Em geral, quanto mais curto o comprimento da molécula, menos mudanças podem ser feitas dentro da molécula enquanto retém a função. Domínios mais longos podem ter um número intermediário de mudanças. A proteína de comprimento total terá a maior tolerância de um grande número de mudanças. Contudo, deve ser apreciado que certas moléculas ou domínios que são altamente dependentes de sua estrutura podem tolerar pouca ou nenhuma modificação.

[000198] As substituições de aminoácido são geralmente baseadas na similaridade relativa dos substituintes de cadeia lateral de aminoácido, por exemplo, sua hidrofobicidade, hidrofilicidade, carga, tamanho, e/ou

similares. Uma análise do tamanho, forma e/ou tipo dos substituintes de cadeia lateral de aminoácido revela que arginina, lisina e/ou histidina são todos resíduos positivamente carregados; que alanina, glicina e/ou serina são todas de um tamanho similar; e/ou que fenilalanina, triptofano e/ou tirosina todos têm uma forma geralmente similar. Portanto, baseado nestas considerações, arginina, lisina e/ou histidina; alanina, glicina e/ou serina; e/ou fenilalanina, triptofano e/ou tirosina; são definidos aqui como equivalentes biologicamente funcionais.

[000199] Para efetuar mudanças mais quantitativas, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A cada aminoácido foi designado um índice hidropático na base de suas características de hidrofobicidade e/ou carga; estas são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (0,4); treonina (0,7); serina (0,8); triptofano (0,9); tirosina (1,3); prolina (1,6); histidina (3,2); glutamato (3,5); glutamina (3,5); aspartato (3,5); asparagina (3,5); lisina (3,9); e/ou arginina (4,5).

[000200] A importância do índice de aminoácido hidropático em conferir função biológica interativa em uma proteína é geralmente compreendida na técnica (Kyte & Doolittle, 1982, incorporado aqui por referência). É sabido que certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos tendo um índice hidropático similar e/ou classificação e/ou ainda retém uma atividade biológica similar. Em se fazendo mudanças no índice hidropático, a substituição de aminoácidos cujos índices hidropáticos estão dentro de ± 2 é preferido, aqueles que estão dentro de ± 1 são particularmente preferidos, e/ou aqueles dentro de $\pm 0,5$ são ainda mais particularmente preferidos.

[000201] É também compreendido na técnica que a substituição de aminoácidos similares pode ser feita efetivamente na base de hidrofilicidade, particularmente onde a proteína de equivalente funcional

biológico e/ou peptídeo desse modo criados é pretendido para uso nas concretizações imunológicas, como em certas concretizações da presente invenção. A Patente U.S. 4.554.101, incorporada aqui por referência, cita que a hidrofilicidade média local maior de uma proteína, conforme governada pela hidrofilicidade de seus aminoácidos adjacentes, se correlaciona com sua imunogenicidade e/ou antigenicidade, isto é, com uma propriedade biológica da proteína.

[000202] Conforme detalhado na Patente U.S. 4.554.101, os seguintes valores de hidrofilicidade foram designados para os resíduos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (0,5); histidina (0,5); cisteína (1,0); metionina (1,3); valina (1,5); leucina (1,8); isoleucina (1,8); tirosina (2,3); fenilalanina (2,5); triptofano (3,4). Em se fazendo mudanças baseadas nos valores de hidrofilicidade similares, a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofilicidade estão dentro de ±2 é preferida, aquelas que estão dentro de ±1 são particularmente preferidas, e/ou aquelas dentro de ±0,5 são ainda mais particularmente preferidas.

B. Aminoácidos alterados

[000203] A presente invenção, em muitos aspectos, está na síntese de peptídeos e polipeptídeos em cyto, via transcrição e tradução de polinucleotídeos apropriados. Estes peptídeos e polipeptídeos incluirão os vinte aminoácidos "naturais", e modificações pós-translacionais dos mesmos. Contudo, a síntese de peptídeo *in vitro* permite o uso de aminoácidos modificados e/ou não usuais. A tabela 1 proporciona aminoácidos modificados e/ou não usuais exemplares, mas não limitantes.

C. Miméticos

[000204] Em adição aos equivalentes funcionais biológicos acima

discutidos, os presentes inventores também contemplam que compostos estruturalmente similares podem ser formulados para imitar as porções chaves de peptídeo ou polipeptídeos da presente invenção. Tais compostos, que podem ser denominados peptidomimético, podem ser usados como os peptídeos da invenção e, consequentemente, também são equivalentes.

[000205] Certos miméticos que imitam elementos de estrutura secundária e terciária de proteína são descritos em Johnson *et al.* (1993). O fundamento lógico sublinhado atrás do uso de miméticos de peptídeo é que o suporte de peptídeo de proteínas existe principalmente para orientar cadeias laterais de aminoácido de tal modo a facilitar interações moleculares, tais como aquelas de anticorpo e/ou antígeno. Um mimético de peptídeo é, desse modo, designado para permitir interações moleculares similares à molécula natural.

[000206] Algumas aplicações bem sucedidas do conceito de mimético de peptídeo tem se focalizado nos miméticos de β -giros dentro das proteínas, que são conhecidos por serem altamente antigênicos. Do mesmo modo estrutura de β giro dentro de um polipeptídeo pode ser prognosticada por algoritmos baseados em computador, conforme discutido aqui. Uma vez que os aminoácidos componentes do giro são determinados, os miméticos podem ser construídos para alcançar uma orientação espacial similar dos elementos essenciais das cadeias laterais de aminoácido.

[000207] Outras aproximações têm se focalizado no uso de proteínas pequenas contendo multidissulfeto como gabaritos estruturais atrativos para produção de conformações biologicamente ativas que imitam os locais de ligação de proteínas grandes. Vita *et al.* (1998). Um motivo estrutural que parece ser evolucionamente conservado em certas toxinas é pequeno (30-40 aminoácidos), estável, e alto permissivo para mutação. Este motivo é composto de uma beta folha e uma espiral alfa

em ponte no núcleo interior por três dissulfetos.

[000208] Giros Beta II foram imitados com sucesso usando-se L-pentapeptídeos cílicos e aqueles com D-aminoácidos. Weisshoff *et al.* (1999). Também, Johannesson *et al.* (1999) reportam tripeptídeos bicíclicos com propriedades que induzem giro reverso.

[000209] Métodos para geração de estruturas específicas foram descritos na técnica. Por exemplo, miméticos de alfa-espiral são descritos nas Patentes US 5.446.128; 5.710.245; 5.840.833; e 5.859.184. Estas estruturas tornam o peptídeo ou proteína mais termicamente estáveis, também aumentam a resistência à degradação proteolítica. Seis, sete, onze, doze, treze e quatorze estruturas de anel membrado são descritos.

[000210] Métodos para geração de beta giros conformacionalmente restritos e beta protuberâncias são descritos, por exemplo, nas Patentes US 5.440.013; 5.618.914; e 5.670.155. Os beta-giros permitem substituintes laterais mudados sem ter mudanças na conformação de suporte correspondente, e têm terminais apropriados para incorporação em peptídeos por procedimentos de síntese padrão. Outros tipos de giros miméticos incluem giros reversos e gama. Os miméticos de giro reversos são descritos nas Patentes US 5.475.085 e 5.929.237, e miméticos de giro gama são descritos nas Patentes US 5.672.681 e 5.674.976.

VII. Composições Imunológicas

[000211] Em concretizações particulares da invenção, composições imunológicas são empregadas. Para a proposta de brevidade, a seguinte seção se referirá a quaisquer composições imunológicas de VLPT de *E. chaffeensis* da presente invenção, tais como são descritas por toda parte aqui como somente concretizações exemplares. Por exemplo, as composições podem incluir todo ou parte de um polipeptídeo de VLPT de *E. chaffeensis*, tal como uma compreendendo

parte ou toda de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, ou SEQ ID NO:15, um polinucleotídeo de VLPT, tal como um compreendendo parte ou todo de SEQ ID NO:16, um anticorpo para um polipeptídeo ou peptídeo da invenção, ou uma mistura destes, por exemplo. Anticorpos podem ser utilizados para se ligarem a um antígeno, tornando, desse modo, a molécula pelo menos parcialmente ineficiente para sua atividade, por exemplo. Em outras concretizações, os anticorpos para o antígeno são empregados em aspectos diagnósticos da invenção, tal como para detectar a presença do antígeno de uma amostra. Amostras exemplares podem ser de um animal suspeito de ter infecção de *E. canis* ou *E. chaffeensis*, de um animal susceptível a infecção de *E. canis* ou *E. chaffeensis*, ou de um animal que tem uma infecção de *E. canis* ou *E. chaffeensis*. Amostras exemplares podem ser obtidas de sangue, soro, fluido cerebroespinhal, urina, fezes, raspagens de bochecha, aspirado de mamilo, e assim por diante.

[000212] Composições imunorreativas purificadas ou fragmentos抗ígenicos das composições imunorreativas podem ser usadas para gerar novos anticorpos ou para testar anticorpos existentes (*por exemplo*, como controles positivos em um ensaio diagnóstico) pelo emprego de protocolos padrões conhecidos àqueles versados na técnica.

[000213] Conforme é bem conhecido na técnica, a imunogenicidade para um imunogen particular pode ser aumentada pelo uso de estimuladores não específicos da resposta imune conhecida como adjuvantes. Adjuvantes exemplares e preferidos incluem BCG completo, Detox, (RIBI, Immunochem Research Inc.), ISCOMS e adjuvante de hidróxido de alumínio (Superphos, Biosector).

[000214] Incluídos nesta invenção estão antissoros policlonais gerados pelo uso da composição imunorreativa ou um fragmento da composição imunorreativa como um imunogen em, *por exemplo*, coelhos. Os protocolos padrões para produção de anticorpo monoclonal e policlonal conhecidos àqueles versados na técnica são empregados. Os anticorpos monoclonais gerados por este procedimento podem ser classificados para a capacidade de identificar clones de cDNA de *Ehrlichia* recombinantes, e para distingui-los de clones de cDNA conhecidos, *por exemplo*.

[000215] A invenção envolve não somente um anticorpo monoclonal intacto, mas também um fragmento de anticorpo imunologicamente reativo, *por exemplo*, um fragmento Fab ou (Fab)2; uma molécula de scFv de cadeia simples projetada; ou uma molécula quimérica, *por exemplo*, um anticorpo que contém a especificidade de ligação de um anticorpo, *por exemplo*, de origem de murina, e as porções restantes de outro anticorpo, *por exemplo*, de origem humana.

[000216] Em uma concretização, o anticorpo, ou fragmento do mesmo, pode estar ligado a uma toxina ou a uma marcação detectável, *por exemplo*, uma marcação radioativa, marcação isotópica não radioativa, marcação fluorescente, marcação quimiluminescente, marcação paramagnética, marcação de enzima ou marcação colorimétrica. Exemplos de toxinas adequadas incluem toxina de difteria, *Pseudomonas* exotoxina A, ricina, e toxina da cólera. Exemplos de marcações de enzima adequadas incluem malato hidrogenase, estafilocóccico nuclease, delta-5-esteroide isomerase, álcool desidrogenase, alfa glicerol fosfato desidrogenase, triose fosfato isomerase, peroxidase, fosfatase alcalina, asparaginase, glicose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glucoamilase, acetilcolinesterase, etc. Exemplos de marcações radioisotópicas adequadas incluem ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , etc.

[000217] Isótopos paramagnéticos para proposta de diagnose *in vivo* podem também serem usados de acordo com os métodos desta invenção. Existem numerosos exemplos de elementos que são úteis em imagem de ressonância magnética. Para discutir em imagem de ressonância magnética nuclear *in vivo*, vide, por exemplo, Schaefer *et al.*, (1989) JACC 14, 472-480; Shreve *et al.*, (1986) Magn. Reson. Med. 3, 336-340; Wolf, G.L., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. RMN 16, 93-95; Wesby *et al.*, (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. RMN 16, 145-155; Runge *et al.*, (1984) Invest. Radiol. 19, 408-415. Exemplos de marcações fluorescentes adequadas incluem uma marcação de fluoresceína, uma marcação de isotiocianato, uma marcação de rodamina, uma marcação de ficoeritrina, uma marcação de ficocianina, uma marcação de aloficocianina, uma marcação de optaldeído, uma marcação de fluorescamina, *etc.* Exemplos de marcações quimilumincescentes incluem uma marcação luminal, uma marcação isoluminal, uma marcação de éster aromático de acridinium, uma marcação de luciferina, uma marcação de luciferase, uma marcação de aequorina, *etc.*

[000218] Aqueles versados na técnica dos mesmos e outras marcações adequadas, que podem ser empregadas de acordo com a presente invenção. A ligação destas marcações a anticorpos ou fragmentos dos mesmos pode ser acompanhada usando-se técnicas padrões comumente conhecidas àqueles versados na técnica. Técnicas típicas são descritas por Kennedy *et al.*, (1976) Clin. Chim. Acta 70, 1-31; e Schurs *et al.*, (1977) Clin. Chim. Acta 81, 1-40. As técnicas de acoplamento mencionadas posteriormente são o método de glutaraldeído, o método de periodato, o método de dimaleimida, o método de maleimidobenzil-N-hidroxi-succinimida éster. Todos estes métodos são incorporados por referência aqui.

D. Anticorpos

[000219] Em certos aspectos da invenção, um ou mais anticorpos podem ser produzidos para o VLPT expresso. Estes anticorpos podem ser usados em várias aplicações diagnósticas e/ou terapêuticas aqui descritas.

[000220] Conforme aqui usado, o termo "anticorpo" é pretendido para se referir amplamente a qualquer agente de ligação imunológico tais como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Geralmente, IgG e/ou IgM são preferidos porque eles são os anticorpos mais comuns na situação fisiológica e porque eles são mais facilmente produzidos em uma bancada de laboratório.

[000221] O termo "anticorpo" é usado para se referir a qualquer molécula similar a anticorpo que tem uma região de ligação de antígeno, e inclui fragmentos de anticorpo tais como anticorpos de domínio simples de Fab', Fab, F(ab')2 (DABs), Fv, scFv (Fv de cadeia simples), e similares. As técnicas para preparação e uso de vários construtos baseados em anticorpo e fragmentos são bem conhecidas na técnica. Meios para preparação e caracterização de anticorpos são também bem conhecidos na técnica (Vide, *por exemplo*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; incorporada aqui por referência).

[000222] "Minianticorpos" ou "minicorpos" são também contemplados para uso com a presente invenção. Minicorpos são cadeias de polipeptídeo de sFv que incluem domínios de oligomerização em seus C-terminais, separados a partir de sFv por uma região de articulação. Pack *et al.* (1992) Biochem 31:1579-1584. O domínio de oligomerização compreende α -hélices de autoassociação, *por exemplo*, leucina zippers, que podem ser adicionalmente estabilizados por ligações de dissulfeto adicionais. O domínio de oligomerização é designado para ser compatível com dobramento vetorial através de uma membrana, um processo para facilitar dobramento *in vivo* do polipeptídeo em uma

proteína de ligação funcional. Geralmente, minicorpos são produzidos usando-se métodos recombinantes bem conhecidos na técnica. Vide, *por exemplo*, Pack *et al.* (1992) Biochem 31:1579-1584; Cumber *et al.* (1992) J Immunology 149B:120-126.

[000223] Peptidomiméticos de ligação similares a anticorpo são também contemplados na presente invenção. Liu *et al.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003 Mar;49(2):209-16 descrevem "peptidomiméticos de ligação similares a anticorpo" (ABiPs), que são peptídeos que agem como anticorpos e têm certas vantagens de meia-vida de soro mais longa, bem como métodos de síntese menos problemáticos.

[000224] Os anticorpos monoclonais (MAbs) são reconhecidos por ter certas vantagens, *por exemplo*, reproduzibilidade e produção de grande escala, e seu uso é geralmente preferido. A invenção, desse modo, proporciona anticorpos monoclonais do humano, murina, macaco, rato, hamster, coelho e ainda de origem de galinha. Devido à facilidade de preparação e pronta disponibilidade de reagentes, anticorpos monoclonais de murina serão frequentemente preferidos.

[000225] Contudo, anticorpos "humanizados" são também contemplados, visto que são anticorpos quiméricos de camundongo, rato, ou outra espécie, suportando domínios constantes humanos e/ou de região variável, anticorpos biespecíficos, anticorpos recombinantes e projetados e fragmentos dos mesmos. Conforme aqui usado, o termo imunoglobulina "humaniza" se refere a uma imunoglobulina compreendendo uma região de estrutura humana e uma ou mais CDR's de uma imunoglobulina não humana (usualmente um camundongo ou rato). A imunoglobulina não humana que proporciona as CDR's é denominada a "doadora" e a imunoglobulina humana que proporciona a estrutura é denominada a "aceitadora". Um "anticorpo humanizado" é um anticorpo compreendendo uma cadeia lateral humanizada e uma imunoglobulina de cadeia pesada humanizada.

E. Métodos Exemplares para Geração de Anticorpos Monoclonais

[000226] Métodos exemplares para geração de anticorpos monoclonais (MAbs) geralmente começam ao longo das mesmas linhas conforme aquelas para preparação de anticorpos policlonais. Brevemente, um anticorpo policlonal é preparado por imunização de um animal com uma composição de LEE ou CEE de acordo com a presente invenção e coletando antissoro daquele animal imunizado.

[000227] Uma ampla faixa de espécie de animal pode ser usada para a produção de antissoro. Tipicamente o animal usado para produção de antissoro é um coelho, um camundongo, um rato, um hamster, um porquinho da índia, ou uma cabra. A escolha do animal pode ser decidida sob a facilidade de manipulação, custos ou a quantidade desejada de soro, conforme seria conhecido a um versado na técnica. Os anticorpos da invenção podem também serem produzidos através da geração de um mamífero ou planta que é transgênica para as sequências de cadeia pesada e leve de imunoglobulina de interesse e produção do anticorpo em uma forma recuperável. Em conjunto com a produção transgênica em mamíferos, os anticorpos podem ser produzidos em, e recuperados do leite de cabras, vacas, ou outros animais. Vide, *por exemplo*, Patentes US N^{os} 5.827.690. 5.756.687. 5.750.172. e 5.741.957.

[000228] Como é também bem conhecido na técnica, a imunogenicidade de uma composição de imunogen particular pode ser intensificada pelo uso de estimuladores não específicos da resposta imune, conhecidos como adjuvantes. Adjuvantes adequados incluem todos os compostos imunoestimulatórios adequados, tais como citoquinas, chemoquinas, cofatores, toxinas, plasmódia, composições sintéticas ou LEEs ou CEEs que codificam tais adjuvantes.

[000229] Os adjuvantes que podem ser usados incluem IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ -interferon, GM-CSF, BCG, hidróxido de alumínio,

compostos de MDP, tais como thur-MDP e nor-MDP, CGP (MTP-PE), lipídeo A, e monofosforil lipídeo A (MPL). RIBI, que contém três componentes extraídos de bactéria, MPL, trealose dimicolato (TDM) e esqueleto de parede de célula (CWS) em uma emulsão de 2% dec esqualeno/Tween 80 é também contemplado. Antígenos de MHC podem ainda serem usados. Adjuvantes exemplares frequentemente preferidos incluem adjuvante de Freund completo (um estimulador não específico da resposta imune contendo *Mycobacterium tuberculosis* morto), adjuvantes de Freund incompletos, e adjuvante de hidróxido de alumínio.

[000230] Em adição aos adjuvantes, pode ser desejável co-administrar modificadores de resposta biológica (BRM), que foram mostrados para regular ascendentemente imunidade de célula T ou atividade de célula supressora regulada descendente. Tais BRMs incluem, mas não estão limitados a, Cimetidine (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); Ciclofosfamida de dose baixa (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ), citoquinas tal como γ -interferon, IL-2, ou IL-12 ou genes que codificam proteínas envolvidas em funções auxiliadoras imunes, tal como B-7.

[000231] A quantidade de composição de imunogen usada na produção de anticorpos policlonais varia sob a natureza do imunogen, bem como o animal usado para imunização. Uma variedade de rotas pode ser usada para administrar o imunogen incluindo, mas não limitado a, subcutânea, intramuscular, intradermal, intraepidermal, intravenosa e intraperitoneal. A produção de anticorpos policlonais pode ser monitorada por amostragem de sangue do animal imunizado em vários pontos em seguida a imunização.

[000232] Uma segunda dose de reforço (*por exemplo*, provida em uma injeção), pode também ser dada. O processo de reforço e titulação é repetido até que uma titulação adequada seja alcançada. Quando um

nível desejado de imunogenicidade é obtido, o animal imunizado pode ser gerado e o soro isolado e armazenado, e/ou o animal pode ser usado para gerar MAbs.

[000233] Para produção de anticorpos policlonais de coelho, o animal pode ser gerado através de uma veia de alça ou alternativamente por punção cardíaca. O sangue removido é permitido coagular e, em seguida, centrifugado para separar componentes de soro das células totais e coágulos de sangue. O soro pode ser usado como é para várias aplicações ou ainda a fração de anticorpo desejada pode ser purificada por métodos bem conhecidos, tal como cromatografia de afinidade usando-se outro anticorpo, um peptídeo ligado a uma matriz sólida, ou pelo uso, *por exemplo*, de cromatografia de proteína A ou proteína G.

[000234] MAbs pode ser prontamente preparado através do uso de técnicas bem conhecidas, tais como aquelas exemplificadas na Patente U.S. 4.196.265, incorporada aqui por referência. Tipicamente, esta técnica envolve imunização de um animal adequado com uma composição de imunogen adequada, *por exemplo*, uma proteína purificada ou parcialmente purificada, polipeptídeo, peptídeo ou domínio, seja uma composição tipo selvagem ou mutante. A composição de imunização é administrada em uma maneira eficaz para estimular células que produzem anticorpo.

[000235] Os métodos para geração de anticorpos monoclonais (MAbs) geralmente começam ao longo das mesmas linhas conforme aquelas para preparação de anticorpos policlonais. Os roedores tais como camundongos e ratos são animais preferidos, contudo, o uso de células de coelho, carneiro ou rã é também possível. O uso de ratos pode proporcionar certas vantagens (Goding, 1986, pp. 60 61), mas camundongos são preferidos, com o camundongo BALB/c sendo mais preferidos, visto que este é mais rotineiramente usado e geralmente dá uma percentagem mais alta de fusões estáveis.

[000236] Os animais são injetados com antígeno, geralmente conforme descrito acima. O antígeno pode ser misturado com adjuvante, tal como adjuvante de Freund completo ou incompleto. Administrações de reforço com o mesmo antígeno ou DNA que codifica o antígeno ocorreria a aproximadamente intervalos de duas semanas.

[000237] Em seguida a imunização, células somáticas com o potencial para produção de anticorpos, especificamente linfócitos B (células B), são selecionadas para uso no protocolo de geração de MAb. Estas células podem ser obtidas de baços biopsiados, amídalas ou nodos de linfa, ou de uma amostra de sangue periférico. As células de baço e células de sangue periférico são preferidas, as primeiras porque elas são uma fonte rica de células de produção de anticorpo que estão no estágio de divisão de plasmablasto, e as últimas porque sangue periférico é facilmente acessível.

[000238] Frequentemente, um painel de animais terá sido imunizado e o baço de um animal com a titulação de anticorpo mais alta será removido e os linfócitos de baço obtidos por homogeneização do baço com uma seringa. Tipicamente, um baço de um animal imunizado contém aproximadamente 5×10^7 to 2×10^8 linfócitos.

[000239] Os linfócitos B de produção de anticorpo a partir do animal imunizado são, então, fundidos com células de uma célula de mieloma imortal, geralmente um da mesma espécie como o animal que foi imunizado. Linhas de célula de mieloma adequadas para uso em procedimentos de fusão de produção de hibridoma preferivelmente são de não produção de anticorpo, têm alta eficiência de fusão, e deficiências de enzima que tornam então incapazes de crescerem em certo meio seletivo que suporta o crescimento de somente as células fundidas desejadas (hibridomas).

[000240] Qualquer um de um número de células de mieloma pode ser usado, conforme são conhecidos àqueles versados na técnica (Goding,

pp. 65 66, 1986; Campbell, pp. 75 83, 1984). cites). Por exemplo, onde o animal imunizado é um camundongo, pode-se usar P3 X63/Ag8, X63 Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210 Ag14, FO, NSO/U, MPC 11, MPC11 X45 GTG 1.7 e S194/5XX0 Bul; para ratos, pode-se usar R210.RCY3, Y3 Ag 1.2.3, IR983F e 4B210; e U 266, GM1500 GRG2, LICR LON HMy2 e UC729 6 são todos úteis na conexão com fusões de célula humana. Vide Yoo *et al.*, J Immunol Methods. 2002 Mar 1;261(1-2):1-20, para uma discussão de sistemas de expressão de mieloma.

[000241] Uma célula de mieloma de murina preferida é a linha de célula de mieloma NS-1 (também denominada P3-NS-1-Ag4-1), que é prontamente disponível a partir de NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository pela requisição do número repositório de linha de célula GM3573. Outra linha de célula de mieloma de camundongo que pode ser usada é a linha de célula não produtora de mieloma de murina de camundongo resistente à 8 azaguanina SP2/0.

[000242] Métodos para geração de híbridos de baço de produção de anticorpo ou células de nodo de linfa e células de mieloma usualmente compreendem mistura de células somáticas com células de mieloma em proporção de 2:1, embora a proporção possa variar de cerca de 20:1 a cerca de 1:1, respectivamente, na presença de um agente ou agentes (químicos ou elétricos) que promovem a fusão de membranas de célula. Métodos de fusão usando vírus Sendai foram descritos por Kohler e Milstein (1975; 1976), e aqueles usando polietileno glicol (PEG), tal como 37% (v/v) PEG, por Gefter *et al.*, (1977). O uso de métodos de fusão induzidos eletricamente é também apropriado (Goding pp. 71 74, 1986).

[000243] Os procedimentos de fusão usualmente produzem híbridos viáveis em baixas frequências, cerca de 1×10^{-6} a 1×10^{-8} . Contudo, isto não impõe um problema, visto que os híbridos fundidos viáveis são diferenciados das células não fundidas originais (particularmente as

células de mieloma não fundidas que normalmente continuariam a se dividir indefinidamente) por cultura em um meio seletivo. O meio seletivo é geralmente um que contém um agente que bloqueia de novo síntese de nucleotídeos no meio de cultura de tecido. Agentes exemplares e preferidos são aminopterin, metotrexato, e azaserina. Aminopterin e metotrexato bloqueiam de novo síntese de ambas purinas e pirimidinas, pelo que azaserina bloqueia somente síntese de purina. Onde aminopterin ou metotrexato é usado, o meio é suplementado com hipoxantina e timidina como uma fonte de nucleotídeos (meio HAT). Onde azaserina é usada, o meio é suplementado com hipoxantina.

[000244] O meio de seleção preferido é HAT. Somente células capazes de operarem trajetórias de salvamento de nucleotídeo são capazes de sobreviverem no meio HAT. As células de mieloma são defectivas em enzimas chaves da trajetória de salvamento, *por exemplo*, hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), e elas não podem sobreviver. As células B podem operar esta trajetória, mas elas têm um breve espaço de tempo de vida limitado na cultura e geralmente morrem dentro de cerca de duas semanas. Portanto, as únicas células que podem sobreviver no meio seletivo são aqueles híbridos formados de mieloma e células B.

[000245] Esta cultura proporciona uma população de hibridomas da qual hibridomas específicos são selecionados. Tipicamente, a seleção de hibridomas é realizada por cultura das células por diluição de clone simples em placas de microtitulação, seguido por teste dos sobrenadantes clonais individuais (após cerca de duas a três semanas) para a reatividade desejada. O ensaio deve ser sensitivo, simples e rápido, tais como radioimunoensaios, imunoensaios de enzima, ensaios de citotoxicidade, ensaios de placa, ensaios de imunoligação de ponto, e similares.

[000246] Os hibridomas selecionados então seriam seriamente diluídos e clonados no anticorpo individual produzindo linhas de célula

cujos clones podem então serem propagados indefinidamente para produzir MAbs. As linhas de célula podem ser exploradas para produção de MAb em dois modos básicos. Primeiro, uma amostra do hibridoma pode ser injetada (frequentemente na cavidade peritoneal) em um animal histocompatível do tipo que foi usado para proporcionar as células somáticas e mieloma para a fusão original (*por exemplo*, um camundongo singenético). Opcionalmente, os animais são revestidos com um hidrocarboneto, especialmente óleos tais como pristano (tetrametilpentadecano) antes da injeção. O animal injetado desenvolve tumores secretando o anticorpo monoclonal específico produzido pelo híbrido de célula fundido. Os fluidos corpóreos do animal, tal como soro ou fluidos de ascites, podem, em seguida, serem extraídos para proporcionar MAbs em alta concentração. Segundo, as linhas de célula individuais podem ser cultivadas *in vitro*, onde os MAbs são naturalmente secretados no meio de cultura do qual elas podem ser prontamente obtidas em altas concentrações.

[000247] Adicionalmente, expressão de anticorpos da invenção (ou outras porções destes) de produção de linhas de célula pode ser intensificada usando-se um número de técnicas conhecidas. Por exemplo, o glutamino sintase e sistemas de expressão de gene de DHFR são aproximações comuns para intensificação de expressão sob certas condições. Clones de célula de alta expressão podem ser identificados usando-se técnicas convencionais, tais como clonagem de diluição limitada e tecnologia de Microdrop. O sistema de GS é discutido no todo ou parte em conjunto com as Patentes Europeias N^{os} 0 216 846, 0 256 055, e 0 323 997 e Pedido de Patente Europeu Nº 89303964.4.

[000248] Os MAbs produzidos por qualquer meio podem ser adicionalmente purificados, se desejado, usando-se filtração, centrifugação e vários métodos cromatográficos tais como HPLC ou cromatografia de afinidade. Os fragmentos dos anticorpos monoclonais

da invenção podem ser obtidos a partir dos anticorpos monoclonais assim produzidos pelos métodos que incluem digestão com enzimas, tais como pepsina ou papaína, e/ou por clivagem de ligações de dissulfeto por redução química. Alternativamente, os fragmentos de anticorpo monoclonal envolvidos pela presente invenção podem ser sintetizados usando-se um sintetizador de peptídeo automático.

[000249] É também contemplado que uma aproximação de clonagem molecular pode ser usada para gerar monoclonais. Em uma concretização, bibliotecas de fagemid de imunoglobulina combinatorial são preparadas de RNA isolado de baço do animal imunizado, e fagemids que expressam anticorpos apropriados são selecionados por garimpar usando-se células que expressam o antígeno e células de controle. As vantagens desta aproximação sobre técnicas de hibridoma convencionais são que aproximadamente 10^4 vezes conforme muitos anticorpos podem ser produzidos e classificados em uma etapa simples, e que novas especificidades são geradas por combinação de cadeia H e L que adicionalmente aumenta a chance de descobrir anticorpos apropriados. Em outro exemplo, LEEs ou CEEs podem ser usados para produzir抗ígenos *in vitro* com um sistema livre de célula. Estes podem ser usados como alvos para escaneamento de bibliotecas de anticorpo de cadeia simples. Isto capacitaria muitos anticorpos diferentes de serem identificados muito rapidamente sem o uso de animais.

[000250] Outra concretização da invenção para produção de anticorpos de acordo com a presente invenção é encontrada na Patente U.S. Nº 6.091.001, que descreve métodos para produzir uma célula que expressa um anticorpo de uma sequência genômica da célula compreendendo um sítio de imunoglobulina modificada usando recombinação sítio específica mediada por Cre é descrito. O método envolve primeiro transfectar uma célula de produção de anticorpo com um vetor de direcionamento de homologia compreendendo um sítio lox

e uma sequência de direcionamento homóloga a uma primeira sequência de DNA adjacente à região dos sítios de imunoglobulina da sequência genômica que é para ser convertida a uma região modificada, de modo que o primeiro sítio lox é inserido na sequência genômica *via* recombinação homóloga específica de local. Em seguida a célula é transfetada com um vetor de direcionamento de lox compreendendo um segundo sítio de lox adequado para recombinação mediada por Cre com o sítio de lox integrado e uma sequência de modificação para converter a região dos sítios de imunoglobulina para a região modificada. Esta conversão é realizada por interação dos sítios de lox com Cre *in vivo*, de modo que a sequência de modificação se insere na sequência genômica *via* recombinação sítio específica mediada por Cre dos sítios de lox.

[000251] Alternativamente, os fragmentos de anticorpo monoclonal envolvidos pela presente invenção podem ser sintetizados usando-se um sintetizador de peptídeo automático, ou por expressão de gene de comprimento total ou de fragmentos de gene em *E. coli*.

F. Conjugados de Anticorpo

[000252] A presente invenção proporciona adicionalmente anticorpos contra proteínas de VLPT, polipeptídeos e peptídeos, geralmente do tipo monoclonal, que são ligados a pelo menos um agente para formar um conjugado de anticorpo. De modo a aumentar a eficiência de moléculas de anticorpo como agentes de diagnóstico ou terapêutico, é convencional ligar ou se ligar covalentemente ou complexar pelo menos uma molécula desejada ou porção. Tal molécula ou porção pode ser, mas não é limitado a, pelo menos uma molécula efetuadora ou relatora. Moléculas efetuadoras compreendem moléculas tendo uma atividade desejada, *por exemplo*, atividade citotóxica. Exemplos não limitativos de moléculas efetuadoras que foram fixadas a anticorpos incluem toxinas, agentes antitumor, enzimas terapêuticas, nucleotídeos raiomarcados,

agentes antivirais, agentes de quelatação, citoquinas, fatores de crescimento, e oligo- ou polinucleotídeos. Por contraste, uma molécula relatora é definida como qualquer porção que pode ser detectada usando-se um ensaio. Exemplos não limitativos de moléculas relatoras que foram conjugadas em anticorpos incluem enzimas, radiomarcadores, haptenos, marcações fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimiluminescentes, cromóforos, moléculas luminescentes, moléculas de fotoafinidade, partículas coloridas ou ligantes, tal como biotina.

[000253] Qualquer anticorpo de seletividade suficiente, especificidade ou afinidade pode ser empregado como a base para um conjugado de anticorpo. Tais propriedades podem ser avaliadas usando-se metodologia de classificação imunológica convencional conhecida àquele versado na técnica. Locais de ligação a moléculas biológicas ativas na molécula de anticorpo, em adição aos locais de ligação de antígeno canônico, incluem locais que residem no domínio variável que pode se ligar a patogenias, superantígenos de célula B, o correceptor de célula T CD4 e o envelope de HIV-1 (Sasso *et al.*, 1989; Shorki *et al.*, 1991; Silvermann *et al.*, 1995; Cleary *et al.*, 1994; Lenert *et al.*, 1990; Berberian *et al.*, 1993; Kreier *et al.*, 1991). Além disso, o domínio variável é envolvido em autoligação de anticorpo (Kang *et al.*, 1988), e contém epítópos (idiotópos) reconhecidos por antianticorpos (Kohler *et al.*, 1989).

[000254] Certos exemplos de conjugados de anticorpo são aqueles conjugados em que o anticorpo é ligado a uma marcação detectável. "Marcações detectáveis" são compostos e/ou elementos que podem ser detectados devido a suas propriedades funcionais específicas, e/ou características químicas, o uso do qual permite que o anticorpo ao qual eles são fixados a serem detectados, e/ou adicionalmente quantificados se desejado. Outro tal exemplo é a formação de um conjugado

compreendendo um anticorpo ligado a um agente citotóxico ou anti celular, e podem ser denominados "imunotoxinas".

[000255] Os conjugados de anticorpo são geralmente preferidos para uso como agentes de diagnóstico. Os diagnósticos de anticorpo caem geralmente dentro de duas classes, aquelas para uso em diagnósticos *vitro*, tais como em uma variedade de imunoensaios, e/ou aquelas para uso de protocolos de diagnóstico *in vivo*, geralmente conhecidas como "imagem direcionada de anticorpo".

[000256] Muitos agentes de imagem apropriados são conhecidos na técnica, como são métodos para sua fixação a anticorpos (vide, *for por exemplo*, Patentes US N^{os} 5.021.236; 4.938.948; e 4.472.509, cada uma incorporada aqui por referência). As porções de imagem usadas podem ser íons paramagnéticos; isótopos radioativos; fluorocromos; substâncias detectáveis por RMN; imagem de raio-X.

[000257] No caso de íons paramagnéticos, pode-se mencionar por meio de exemplo íons tais como cromo (III), manganês (II), ferro (III), ferro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodímio (III), samário (III), itérbio (III), gadolínio (III), vanádio (II), térbio (III), disproprio (III), holmio (III) e/ou érbio (III), com gadolínio sendo particularmente preferido. Íons úteis em outros contextos, tais como imagem de raio-X, incluem, mas não estão limitados a, lantânio (III), ouro (III), chumbo (II), e especialmente bismuto (III).

[000258] No caso de isótopos radioativos para aplicação terapêutica e/ou diagnóstica, pode-se mencionar astatina²¹¹, ¹⁴carbono, ⁵¹cromo, ³⁶cloro, ⁵⁷cobalto, ⁵⁸cobalto, cobre⁶⁷, ¹⁵²Eu, gálio⁶⁷, ³hidrogênio, iodo¹²³, iodo¹²⁵, iodo¹³¹, índio¹¹¹, ⁵⁹ferro, ³²fósforo, rênio 186, rênio 188, ⁷⁵selênio, ³⁵enxofre, tecnício 99m e/ou ítrio⁹⁰. ¹²⁵I está frequentemente sendo preferido para uso em certas concretizações, e tecnécio^{99m} e/ou índio¹¹¹ são também frequentemente preferidos devido a sua baixa energia e adequabilidade para detecção de faixa longa. Os anticorpos

monoclonais radioativamente marcados da presente invenção podem ser produzidos de acordo com métodos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, anticorpos monoclonais podem ser iodinatados por contato com iodeto de sódio e/ou potássio e um agente de oxidação química tal como hipoclorito de sódio, ou um agente de oxidação enzimático, tal como lactoperoxidase. Os anticorpos monoclonais de acordo com a invenção podem ser marcados com tecnécio por processo de troca de ligante, por exemplo, por redução de pertecnato com solução estanhosa, quelatação do tecnécio reduzido em uma coluna de Sephadex e aplicação do anticorpo a esta coluna. Alternativamente, técnicas de etiquetação direta podem ser usadas, *por exemplo*, por incubação de pertecnato, um agente de redução tal como SNCl_2 , uma solução de tampão tal como solução de sódio-potássio ftalato, e o anticorpo. Grupos funcionais intermediários que são frequentemente usados para se ligar a radioisótopos que existem como íons metálicos a anticorpo são ácido dietilenotriaminopenta-acético (DTPA) ou ácido etileno diaminatetracártico (EDTA).

[000259] Entre as marcações fluorescentes contempladas para uso como conjugados incluem Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, Fluorescein Isothiocyanate, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Renographin, ROX, TAMRA, TET, Tetrametilrodamina, e/ou Texas Red.

[000260] Outro tipo de conjugados de anticorpo contemplados na presente invenção são aqueles pretendidos principalmente para uso *in vitro*, onde o anticorpo é ligado a um ligante de ligação secundário e/ou a uma enzima (uma marcação de enzima) que gerará um produto colorido após contato com um substrato cromogênico. Exemplos de enzimas adequadas incluem urease, fosfatase alcalina, (rábano

silvestre) hidrogênio peroxidase ou glicose oxidase. Ligantes de ligação secundários preferidos são biotina e/ou avidina, e compostos de streptavidina. O uso de tais marcações é bem conhecido àqueles versados na técnica e são descritos, por exemplo, nas Patentes US 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 e 4.366.241; cada uma incorporada aqui por referência.

[000261] Ainda outro método conhecido de fixação sítio específica de moléculas a anticorpos comprehende a reação de anticorpos com tags de afinidade baseadas em hapteno. Essencialmente, tags de afinidade baseadas em hapteno reagem com aminoácidos no sítio de ligação de antígeno, destruindo, desse modo, este sítio e bloqueando reação de antígeno específica. Contudo, isto não pode ser vantajoso, visto que resulta na perda de ligação de antígeno pelo conjugado de anticorpo.

[000262] Moléculas contendo grupos azido podem também serem usadas para formar ligações covalentes a proteínas através de intermediários de nitreno reativos que são gerados por luz ultravioleta de baixa intensidade (Potter & Haley, 1983). Em particular, análogos de 2- e 8-azido de nucleotídeos de purina foram usados como fotosondas direcionadas de sítio para identificar proteínas de ligação de nucleotídeo em extratos de célula crus (Owens & Haley, 1987; Atherton *et al.*, 1985). Os nucleotídeos 2- e 8-azido foram também usados para mapear domínios de ligação de nucleotídeo de proteínas purificadas (Khatoon *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; e Dholakia *et al.*, 1989) e podem ser usadas como agentes de ligação de anticorpo.

[000263] Vários métodos são conhecidos na técnica para a fixação ou conjugação de um anticorpo a sua porção de conjugado. Alguns métodos de fixação envolvem o uso de um complexo de quelato de metal empregando, por exemplo, um agente de quelatação orgânico tal como ácido dietilenotriaminopenta-acético anidrido (DTPA); ácido etilenotriaminotetra-acético; N-cloro-p-toluenosulfonamida; e/ou

tetracloro-3 α -6 \square α -difenilglicouril-3 fixado ao anticorpo (Patentes US N^{os} 4.472.509 e 4.938.948, cada uma incorporada aqui por referência). Os anticorpos monoclonais podem também serem reagidos com uma enzima na presença de um agente de acoplamento tal como glutaraldeído ou periodato. Os conjugados com marcadores de fluoresceína são preparados na presença destes agentes de acoplamento ou pela reação com um isocianato. Na Patente U.S. N^º 4.938.948, imagem de tumores de seio é alcançada usando-se anticorpos monoclonais e as porções de imagem detectáveis são ligadas ao anticorpo usando-se ligadores tais como metil-p-hidroxibenzimidato ou N-succinimidil-3-(4-hidroxifenil)propionato.

[000264] Em outras concretizações, derivatização de imunoglobulinas por introdução seletivamente de grupos sulfidrila na região Fc de uma imunoglobulina, usando-se condições de reação que não alteram o sítio de combinação de anticorpo são contemplados. Os conjugados de anticorpo produzidos de acordo com esta metodologia são descritos para exibir longevidade aperfeiçoada, especificidade e sensibilidade (Patente U.S. N^º 5.196.066, incorporada aqui por referência). A fixação sítio específica de moléculas efetuadoras ou relatoras, no qual a molécula relatora ou efetuadora é conjugada a um resíduo de carboidrato na região Fc foi também descrita na literatura (O'Shannessy *et al.*, 1987). Esta aproximação foi reportada para produzir anticorpos diagnosticamente e terapeuticamente promissores que estão atualmente na avaliação clínica.

[000265] Em outra concretização da invenção, os anticorpos anti-gp36 são ligados a nanocristais semicondutores tais como aqueles descritos nas patentes dos Estados Unidos N^{os} 6.048.616; 5.990.479; 5.690.807; 5.505.928; 5.262.357 (todas das quais são incorporada aqui em suas totalidades); bem como Publicação PCT N^º 99/26299 (publicada em 27 de maio de 1999). Em particular, materiais exemplares para uso como

nanocristais semicondutores nos ensaios biológicos e químicos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a aqueles descritos acima, incluindo semicondutores de grupo II-VI, III-V e grupo IV tais como ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, GaN, GaP, GaAs, GaSb, InP, InAs, InSb, AIS, AIP, AlSb, PbS, PbSe, Ge e Si, e misturas ternárias e quaternárias destes. Os métodos para ligação de nanocristais semicondutores a anticorpos são descritos nas Patentes US N^{os} 6.630.307 e 6.274.323.

G. Métodos de Imunodetecção

[000266] Em ainda outras concretizações, a presente invenção se refere a métodos de imunodetecção para ligação, purificação, remoção, quantificação e/ou, de outro modo, geralmente detecção de componentes biológicos tais como polipeptídeos imunorreativos. Os anticorpos preparados de acordo com a presente invenção podem ser empregados para detectar proteínas tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeos e/ou peptídeos. O uso de anticorpos tipo selvagem e/ou mutante é contemplado. Alguns métodos de imunodetecção incluem ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), ensaio imunoradiométrico, fluoroimunoensaio, ensaio quimiluminescente, ensaio bioluminescente, e mancha de Western para mencionar uns poucos. As etapas de vários métodos de imunodetecção úteis foram descritos na literatura científica, tal como, *por exemplo*, Doolittle MH e Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B e Galand P, 1993; De Jager R *et al.*, 1993; e Nakamura *et al.*, 1987, cada incorporado aqui por referência.

[000267] Em geral, os métodos de imunoligação incluem obtenção de uma amostra suspeitada de compreender proteína, polipeptídeo e/ou peptídeo, e contactar a amostra com um primeiro anticorpo anti-gp19 de acordo com a presente invenção, conforme o caso pode ser, sob condições eficazes para permitir a formação de imunocomplexos.

[000268] Estes métodos incluem métodos para purificação de proteínas tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeos e/ou peptídeos conforme podem ser empregados na purificação de proteínas tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeos e/ou peptídeos de amostras de pacientes e/ou para purificação de proteínas recombinantemente expressas tipo selvagem ou mutante, polipeptídeos e/ou peptídeos. Nestes exemplos, o anticorpo remove a proteína tipo selvagem antigênica e/ou mutante, componente de polipeptídeo e/ou peptídeo de uma amostra. O anticorpo preferivelmente estará ligado a um suporte sólido, tal como na forma de uma matriz de coluna, e a amostra suspeitada de conter um componente antigênico de proteína tipo selvagem ou mutante será aplicado ao anticorpo imobilizado. Os componentes indesejados serão lavados da coluna, deixando o antígeno imunocomplexado ao anticorpo imobilizado, cujo antígeno de proteína tipo selvagem ou mutante é então coletado pela remoção da proteína tipo selvagem ou mutante e/ou peptídeo a partir da coluna.

[000269] Os métodos de imunoligação também incluem métodos para detecção e quantificação da quantidade de um componente reativo de proteína tipo selvagem ou mutante em uma amostra e a detecção e quantificação de quaisquer complexos imunes formados durante o processo de ligação. Aqui, obtém-se uma amostra suspeitada de compreender uma proteína tipo selvagem ou mutante e/ou peptídeo ou suspeitada de compreender um organismo de *E. canis*, e contactar a amostra com um anticorpo contra tipo selvagem ou mutante, e, então, detectar e quantificar a quantidade de complexos imunes formados sob as condições específicas.

[000270] Em termos de detecção de antígeno, a amostra biológica analisada pode ser qualquer amostra que é suspeitada de conter um antígeno específico de proteína tipo selvagem ou mutante, tal como um espectro, um extrato de tecido homogeneizado, uma célula, formas

separadas e/ou purificadas de qualquer das composições contendo proteína tipo selvagem ou mutante acima, ou mesmo qualquer fluido biológico que entra em contato com um organismo de *E. canis* após infecção.

[000271] O contato da amostra biológica escolhida com o anticorpo sob condições eficazes e por um período de tempo suficiente para permitir a formação de complexos imunes (complexos imunes primários) é geralmente uma matéria de adicionar simplesmente a composição de anticorpo para a amostra e incubação da mistura por um período de tempo longo bastante para os anticorpos formarem complexos imunes com, *isto é*, para se ligar a, quaisquer抗ígenos de proteína presentes. Após este tempo, a composição de amostra de anticorpo, tal como uma seção de tecido, placa de ELISA, dot blot ou western blot, geralmente será lavada para remover qualquer espécie de anticorpo especificamente ligada, permitindo que somente aqueles anticorpos especificamente ligados dentro dos complexos imunes primários a serem detectados.

[000272] Em geral, a detecção de formação de imunocomplexo é bem-conhecida na técnica e pode ser alcançada através da aplicação de numerosas aproximações. Estes métodos são geralmente baseados na detecção de um etiqueta ou marcador, tal como qualquer daqueles marcadores radioativos, fluorescentes, biológicos e enzimáticos. As Patentes US concernente ao uso de tais marcadores incluem 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 e 4.366.241, cada uma incorporada aqui por referência. Naturalmente, pode-se encontrar vantagens adicionais através do uso de um ligante de ligação secundário tal como um segundo anticorpo e/ou um arranjo de ligação de ligante de biotina/avidina, conforme é conhecido na técnica.

[000273] O anticorpo empregado na detecção pode ser ligado a uma marcação detectável, no qual então simplesmente se detectaria esta

marcação, permitindo que, desse modo, a quantidade dos complexos imunes primários na composição seja determinada. Alternativamente, o primeiro anticorpo que se torna ligado dentro dos complexos imunes primários pode ser detectado por meio de um segundo ligante de ligação que tem afinidade de ligação para o anticorpo. Nestes casos, o segundo ligante de ligação pode estar ligado a uma marcação detectável. O Segundo ligante de ligação é frequentemente um anticorpo, que pode, desse modo, ser denominado um anticorpo "secundário". Os complexos imunes primários são contactados com o ligante de ligação secundário marcado, ou anticorpo, sob condições eficazes e por um período de tempo suficiente para permitir a formação de complexos imunes secundários. Os complexos imunes secundários são então geralmente lavados para remover quaisquer anticorpos secundários não especificamente ligados ou ligantes, e a marcação remanescente nos complexos imunes secundários é então detectada.

[000274] Métodos adicionais incluem a detecção de complexos imunes primários por uma aproximação de duas etapas. Um segundo ligante de ligação, tal como um anticorpo, que tem afinidade de ligação para o anticorpo é usado para formar complexos imunes secundários, conforme descrito acima. Após lavagem, os complexos imunes secundários são contactados com um terceiro ligante de ligação ou anticorpo que tem afinidade de ligação para o segundo anticorpo, novamente sob condições eficazes e por um período de tempo suficiente para permitir a formação de complexos imunes (complexos imunes terciários). O terceiro ligante ou anticorpo é ligado a uma marcação detectável, permitindo detecção dos complexos imunes terciários assim formados. Este sistema pode proporcionar amplificação de sinal se isto é desejado.

[000275] Um método de imunodetecção usa dois anticorpos diferentes. Um anticorpo A da primeira etapa biotinilatada, anticorpo

monoclonal ou anticorpo policlonal é usado para detectar o(s) antígeno(s)-alvo(s), e um anticorpo de segunda etapa é então usado para detectar o biotin fixado ao biotin complexado. Neste método a amostra a ser testada é primeiro incubada em uma solução contendo o anticorpo da primeira etapa. Se o antígeno-alvo está presente, algum do anticorpo se liga ao antígeno para formar um anticorpo biotinilatado/complexo de antígeno. O complexo de anticorpo/antígeno é então amplificado por incubação em soluções sucessivas de streptavidin (ou avidin), DNA biotinilatado, e/ou DNA complementar biotinilatado, com cada etapa adicionando locais de biotin adicionais ao complexo de anticorpo/antígeno. As etapas de amplificação são repetidas até que um nível de amplificação seja alcançado, em cujo ponto a amostra é incubada em uma solução contendo o anticorpo da segunda etapa contra biotin. Este anticorpo de segunda etapa é marcado, como, por exemplo, com uma enzima que pode ser usado para detectar a presença do complexo anticorpo/antígeno por histoenzimologia usando-se um substrato de cromogen. Com amplificação adequada, um conjugado pode ser produzido que é macroscopicamente visível.

[000276] Outro método conhecido de imunodetecção leva vantagem da metodologia de imuno-PCR (Reação de cadeia de Polimerase). O método de PCR é similar ao método Cantor até a incubação com DNA biotinilatado, contudo, ao invés de usar etapas múltiplas de streptavidin e incubação de DNA biotinilatado, o complexo de DNA/biotin/streptavidin/anticorpo é lavado com um baixo pH ou tampão de sal alto que libera o anticorpo. A solução de lavagem resultante é então usada para efetuar uma reação de PCR com primers adequados com controles apropriados. Pelo menos na teoria, a capacidade enorme de amplificação e especificidade de PCR podem ser utilizadas para detectar uma molécula de antígeno simples.

[000277] Os métodos de imunodetecção da presente invenção têm utilidade evidente na diagnose e prognose de condições tais como várias formas de doenças hiperproliferativas, tais como câncer, incluindo leucemia, por exemplo. Aqui, uma amostra biológica e/ou clínica suspeita de conter uma proteína tipo selvagem ou mutante, polipeptídeo, peptídeo e/ou mutante é usada. Contudo, estas concretizações também têm aplicações a amostras não clínicas, tais como na titulação de antígeno ou amostras de anticorpo, por exemplo, na seleção de hibridomas.

H. ELISAs

[000278] Conforme detalhado acima, imunoensaios, em seu sentido mais simples e/ou sentido direto, são ensaios de ligação. Certos imunoensaios preferidos são os vários tipos de ensaios imunoabsorventes ligados por enzima (ELISAs) e/ou radioimunoensaios (RIA) conhecidos na técnica. A detecção imunohistoquímica usando seções de tecido é também particularmente útil. Contudo, será prontamente apreciado que detecção não é limitada a tais técnicas, e/ou marcação por western (Western blotting), dot blot, análise de FACS, e/ou similares podem também serem usados.

[000279] Em um ELISA exemplar, os anticorpos da invenção são imobilizados em uma afinidade de proteína que exibe superfície selecionada, tal como um poço em uma placa de microtitulação de poliestireno. Então, a composição de teste suspeita de conter o antígeno de proteína tipo selvagem e/ou mutante, tal como uma amostra clínica, é adicionada aos poços. Após ligação e/ou lavagem para remover complexos imunes não especificamente ligados, o antígeno de proteína ligado tipo selvagem e/ou mutante pode ser detectado. A detecção é geralmente alcançada pela adição de outro anticorpo que é ligado a uma marcação detectável. Este tipo de ELISA é um "ELISA intercalado" simples. A detecção pode também ser alcançada pela adição de um

segundo anticorpo, seguido pela adição de um terceiro anticorpo que tem afinidade de ligação para o segundo anticorpo, com o terceiro anticorpo sendo ligado a uma marcação detectável.

[000280] Em outro ELISA exemplar, as amostras suspeitas contendo o antígeno de proteína tipo selvagem e/ou mutante são immobilizadas na superfície da cavidade e/ou então contactada com os anticorpos da invenção. Após ligação e/ou lavagem para remover complexos imunes não especificamente ligados, os anticorpos ligados são detectados. Onde os anticorpos iniciais são ligados a uma marcação detectável, os complexos imunes podem ser detectados diretamente. Novamente, os complexos imunes podem ser detectados usando-se um segundo anticorpo que tem afinidade de ligação para o primeiro anticorpo, com o segundo anticorpo sendo ligado a uma marcação detectável.

[000281] Outro ELISA em que as proteínas tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeos e/ou peptídeos são immobilizados, envolve o uso de competição de anticorpo na detecção. Neste ELISA, anticorpos marcados contra proteína tipo selvagem ou mutante são adicionados aos poços, permitidos se ligarem, e/ou detectados por meio de sua etiqueta. A quantidade de antígeno de proteína tipo selvagem ou mutante em uma amostra não conhecida é então determinada por mistura da amostra com os anticorpos marcados contra tipo selvagem e/ou mutante antes e/ou durante incubação com cavidades revestidas. A presença de proteína tipo selvagem e/ou mutante na amostra age para reduzir a quantidade de anticorpo contra proteína tipo selvagem ou mutante disponível para ligação ao poço e, desse modo, reduz o último sinal. Isto é também apropriado para detecção de anticorpos contra proteína tipo selvagem ou mutante em uma amostra não conhecida, onde os anticorpos não marcados se ligam aos poços revestidos de antígeno e também reduzem a quantidade de antígeno disponível para ligar os anticorpos marcados.

[000282] Indiferente do formato empregado, ELISAs têm certas características em comum, tal como revestimento, incubação e ligação, lavagem para remover espécie não especificamente ligada, e detecção dos complexos imunes ligados. Estes são descritos abaixo.

[000283] No revestimento de uma placa com ou antígeno ou anticorpo, geralmente se incubará aos poços da placa com uma solução do antígeno ou anticorpo, ou durante a noite ou por um período especificado de horas. Os poços da placa então serão lavados para remover material incompletamente adsorvido. Quaisquer superfícies disponíveis remanescentes dos poços são então "revestidos" com uma proteína não específica que é antigenicamente neutra com relação ao antissoro de teste. Estas incluem albumina de soro bovino (BSA), caseína ou soluções de leite em pó. O revestimento permite bloqueio de locais de adsorção não específicos na superfície de imobilização e, desse modo, reduz o problema causado por ligação não específica de antissoro na superfície.

[000284] Em ELISAs, é provavelmente mais costumeiro usar um meio de detecção secundário ou terciário preferivelmente do que um procedimento direto. Desse modo, após ligação de uma proteína ou anticorpo ao poço, revestimento com um material não reativo para reduzir o problema, e lavagem para remover material não ligado, a superfície de imobilização é contactada com a amostra biológica a ser testada sob condições eficazes para permitir formação de complexo imune (antígeno/anticorpo). A detecção do complexo imune então requer um ligante de ligação secundário marcado ou anticorpo, e um ligante de ligação secundário ou anticorpo em conjunto com um anticorpo terciário marcado ou um terceiro ligante de ligação.

[000285] "Sob condições eficazes para permitir formação de complexo imune (antígeno/anticorpo)" significa que as condições preferivelmente incluem diluir os antígenos e/ou anticorpos com soluções tais como

BSA, gama globulina bovina (BGG), ou salina tamponada por fosfato (PBS)/Tween). Estes agentes adicionados também tendem a auxiliar na redução de problema não específico.

[000286] As condições "adequadas" também significam que a incubação é a uma temperatura ou por um período de tempo suficiente para permitir ligação eficaz. As etapas de incubação são tipicamente de cerca de 1 a 2 a 4 horas ou, desse modo, a temperaturas preferivelmente na ordem de 25°C a 27°C, ou podem ser durante a noite a cerca de 4°C ou desse modo.

[000287] Em seguida a todas as etapas de incubação em um ELISA, a superfície contactada é lavada de modo a remover material não complexado. Um procedimento de lavagem preferido inclui lavagem com uma solução tal como PBS/Tween, ou antes do tampão. Em seguida a formação de complexos imunes específicos entre a amostra de teste e o material originalmente ligado, e lavagem subsequente, a ocorrência de ainda quantidades minutas de complexos imunes pode ser determinada.

[000288] Para proporcionar um meio de detecção, o segundo ou terceiro anticorpo terá uma marcação associada para permitir detecção. Preferivelmente, esta será uma enzima que gerará desenvolvimento de cor após incubação com um substrato cromogênico apropriado. Desse modo, por exemplo, será desejado contactar ou incubar o primeiro e segundo complexo imune com uma urease, glicose oxidase, fosfatase alcalina ou hidrogênio peroxidase-anticorpo conjugado por um período de tempo e sob condições que favorecem o desenvolvimento de formação de complexo imune adicional (*por exemplo*, incubação por 2 horas à temperatura ambiente em uma solução contendo PBS tal como PBS-Tween).

[000289] Após incubação com o anticorpo marcado, e subsequente para lavagem para remover material não ligado, a quantidade de

marcação é quantificada, *por exemplo*, por incubação com um substrato cromogênico tal como ureia, ou bromocresol púrpura, ou 2,2'-azino-di-(3-etyl-benztiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), ou H₂O₂, no caso de peroxidase como a marcação de enzima. A quantificação é então alcançada por medição do grau de cor gerada, *por exemplo*, usando-se um espectrofotômetro de espectro visível.

I. Imunohistoquímica

[000290] Os anticorpos da presente invenção podem também serem usados em conjunto com ambos blocos de tecido embutidos de parafina, congelados frescos e/ou fixados com formalina preparados para estudo por imuno-histoquímica (IHC). O método de preparação de blocos de tecido destas espécimes particuladas foi bem sucedidamente usado em estudos prévios de IHC de vários fatores de prognóstico, e/ou é bem conhecido àqueles versados na técnica (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

[000291] Brevemente, seções congeladas podem ser preparadas por re-hidratação de 50 ng de tecido congelado "pulverizado" à temperatura ambiente em salina tamponada com fosfato (PBS) em cápsulas plásticas pequenas; pelotização das partículas por centrifugação; ressuspensão das mesmas em um meio de embutimento viscoso (OCT); inversão da cápsula e/ou pelotização novamente por centrifugação; congelamento por estalo em 70°C de isopentano; corte da cápsula plástica e/ou remoção do cilindro congelado de tecido; seguramento do cilindro de tecido em uma bucha de micrótomo de criostato; e/ou corte de 25-50 seções em série.

[000292] Seções permanentes podem ser preparadas por um método similar envolvendo re-hidratação da amostra de 50 mg em um tubo de microfuga plástico; pelotização; ressuspensão em 10% de formalin por 4 horas de fixação; lavagem/pelotização; ressuspensão no Agar quente 2,5%; pelotização; resfriamento em água gelada para endurecer o agar;

remoção do tecido/bloco de agar a partir do tubo; infiltração e/ou embebimento do bloco na parafina; e/ou corte até 50 seções em série permanentes.

J. Microscopia Imunoelétrônica

[000293] Os anticorpos da presente invenção podem também serem usados em conjunto com microscopia de elétron para identificar componentes de tecido intracelular. Brevemente, um marcação densa de elétron é conjugada diretamente ou indiretamente ao anticorpo. Exemplos de marcações densas de elétron de acordo com a invenção são ferritina e ouro. A marcação densa de elétron absorve os elétrons e pode ser visualizada pelo microscópio eletrônico.

K. Kits de Imunodetectação

[000294] Em ainda outras concretizações, a presente invenção se refere a kits de imunodetectação para uso com os métodos de imunodetectação acima descritos. À medida que os anticorpos são geralmente usados para detectar proteínas tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeos e/ou peptídeos, os anticorpos preferivelmente serão incluídos no kit. Contudo, kits incluindo ambos tais componentes podem ser providos. Os kits de imunodetectação desse modo compreenderão, em meios de recipiente adequados, um primeiro anticorpo que se liga a uma proteína tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeo e/ou peptídeo, e/ou opcionalmente, um reagente de imunodetectação e/ou adicionalmente opcionalmente, uma proteína tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeo e/ou peptídeo.

[000295] Em concretizações preferidas, anticorpos monoclonais serão usados. Em certas concretizações, o primeiro anticorpo que se liga à proteína tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeo e/ou peptídeo pode estar pré-ligado a um suporte sólido, tal como uma matriz de coluna e/ou cavidade de uma placa de microtitulação.

[000296] Os reagentes de imunodetectação do kit podem tomar

qualquer uma de uma variedade de formas, incluindo aquelas marcações detectáveis que são associadas com e/ou ligadas ao dado anticorpo. As marcações detectáveis que são associadas com e/ou fixadas a um ligante de ligação secundário são também contempladas. Ligantes secundários exemplares são aqueles anticorpos secundários que têm afinidade de ligação para o primeiro anticorpo.

[000297] Reagentes de inunodetecção adicionalmente adequados para uso nos presentes kits incluem o reagente de dois componentes que compreende um anticorpo secundário que tem afinidade de ligação para o primeiro anticorpo, junto com um terceiro anticorpo que tem afinidade de ligação para o segundo anticorpo, o terceiro anticorpo sendo ligado a uma marcação detectável. Conforme notado acima, um número de marcadores exemplares são conhecidos na técnica e/ou todas tais marcações podem ser empregadas em conjunto com a presente invenção.

[000298] Os kits podem adicionalmente compreender uma composição aliquotada adequadamente da proteína tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeo e/ou polipeptídeo, se marcados e/ou não marcados, conforme podem ser usados para preparar uma curva-padrão para um ensaio de detecção. Os kits podem conter conjugados de anticorpo- marcação ou na forma totalmente conjugada, na forma de intermediários, e/ou como porções separadas a serem conjugadas pelo usuário do kit. Os componentes dos kits podem ser acondicionados ou em meio aquoso e/ou na forma liofilizada.

[000299] O meio de recipiente dos kits será adequadamente alojado e geralmente incluirá pelo menos um frasco, tubo de teste, frasco, garrafa, seringa e/ou outros meios de recipiente, em que o anticorpo pode ser colocado, e/ou preferivelmente, adequadamente aliquotado. Onde proteína gp19 tipo selvagem e/ou mutante, polipeptídeo e/ou peptídeo, e/ou um segundo e/ou terceiro ligante de ligação e/ou componente

adicional é provido, o kit também geralmente conterá um segundo, terceiro e/ou outro recipiente adicional em que este ligante e/ou componente pode ser colocado. Os kits da presente invenção também tipicamente incluirão um meio para contenção de um meio para contenção do anticorpo, antígeno, e/ou quaisquer outros recipientes de reagente em confinamento próximo para venda comercial. Tais recipientes podem incluir recipientes plásticos moldados por injeção e/ou sopro em que os frascos desejados são retidos.

VIII. Preparações Farmacêuticas

[000300] É também contemplado que composições farmacêuticas podem ser preparadas usando-se as novas composições da presente invenção. Em tal caso, a composição farmacêutica compreende a nova composição ativa da presente invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável. Uma pessoa versada na técnica prontamente capaz de determinar, sem experimentação indevida, as dosagens apropriadas e rotas de administração do componente ativo da presente invenção.

[000301] A frase "farmacologicamente aceitável" se refere a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação alérgica ou similar quando administrada a um indivíduo. A preparação de uma composição aquosa que contém uma proteína como um ingrediente ativo é bem compreendida na técnica. Tipicamente, tais composições são preparadas como injetáveis, ou como soluções líquidas ou suspensões; formas sólidas adequadas para solução ou suspensão líquida antes da injeção poder também a ser preparada. A preparação pode também ser emulsificada.

[000302] Em geral, uma composição farmacêutica da presente invenção pode compreender um polipeptídeo de VLPT de *E. chaffeensi*, polinucleotídeo, ou anticorpo e/ou misturas destes.

[000303] Uma proteína pode ser formulada em uma composição em uma forma neutra ou sal. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem os

sais de adição ácidos (formados com os grupos amino livres da proteína) e que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácidos hidroclórico ou fosfórico, ou tais ácidos orgânicos tais como acético, oxálico, tartárico, mandélico, e similares. Os sais formados com os grupos carboxila livres podem também serem derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, sódio, potássio, amônia, cálcio, ou hidróxidos férricos, e tais bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína e similares.

[000304] Sob formulação, soluções serão administradas em uma maneira compatível à formulação de dosagem e em tal quantidade conforme é terapeuticamente eficaz. As formulações são facilmente administradas em uma variedade de formas de dosagem tais como soluções injetáveis.

[000305] Para administração parenteral em uma solução aquosa, por exemplo, a solução deve ser adequadamente tamponada se necessário e o diluente líquido primeiro tornou-se isotônico com solução salina ou glicose suficiente. Estas soluções aquosas particulares são especialmente adequadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Neste particular, meio aquoso estérila, que pode ser empregado, será conhecido àqueles versados na técnica à luz da presente revelação. Por exemplo, uma dosagem pode ser dissolvida em 1 mL de solução isotônica de NaCl e ou adicionado a 1000 mL de fluido hipodermóclises ou injetada no local proposto de infusão, (vide, por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15^a Edição, páginas 1035-1038 e 1570-1580). Alguma variação na dosagem ocorrerá necessariamente dependendo da condição do indivíduo sendo tratado. A pessoa responsável pela administração determinará, em qualquer evento, a dose apropriada para o indivíduo objeto.

[000306] As composições farmacêuticas da presente invenção compreenderão uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que tem

como alvo um polipeptídeo ou a secreção deste ou agente adicional dissolvido ou disperso em um veículo farmaceuticamente aceitável. A frase "farmacêutica", "farmaceuticamente aceitável", ou "farmacológicamente aceitável" se refere a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação adversa, alérgica ou outra reação não desejada quando administrada a um animal, tal como, por exemplo, um ser humano, conforme apropriado. A preparação de uma composição farmacêutica que contém pelo menos um agente que tem como alvo o polipeptídeo ou a secreção deste e/ou ingrediente ativo adicional será conhecida àquele versado na técnica à luz da presente revelação, conforme exemplificado por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição Mack Printing Company, 1990, incorporada aqui por referência. Além disso, para administração em animal (*por exemplo*, ser humano), será compreendido que preparações devem encontrar esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e padrões de pureza conforme requerido pelo FDA Office of Biological Standards.

[000307] Conforme aqui usado, "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (*por exemplo*, agentes antibacteriais, agentes fungais), agentes isotônicos, agentes de retardamento de absorção, sais, conservantes, fármacos, estabilizadores, géis, ligantes, excipientes, agentes de desintegração, lubrificantes, agentes de adoçamento, agentes aromatizantes, corantes, tais materiais similares e combinações destes, conforme seria conhecido a um versado na técnica (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, incorporada aqui por referência). Exceto devido a qualquer veículo convencional ser incompatível ao ingrediente ativo, seu uso nas composições terapêuticas ou farmacêuticas é contemplado.

[000308] A invenção pode compreender tipos diferentes de veículo dependendo se é para ser administrada na forma sólida, líquida ou aerossol, e se é necessária para ser estéril para tais rotas de administração como injeção. A presente invenção pode ser administrada intravenosamente, intradermalmente, intra-arterialmente, intraperitonealmente, intralesionalmente, intracranialmente, intra-articularmente, intraprostaticamente, intrapleuralmente, intratraquealmente, intranasalmente, intravitrealmente, intravaginalmente, intraretalmente, topicalmente, intratumoralmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, subcutaneamente, subconjuntival, intravesicularmente, mucosamente, intrapericardialmente, intraumbilicalmente, intraocularmente, oralmente, topicalmente, localmente, inalação (*por exemplo*, inalação de aerossol), injeção, infusão, infusão contínua, células-alvo de perfusão localizada, *via* um cateter, *via* uma lavagem, em cremes, em composições de lipídeo (*por exemplo*, lipossomos), ou por outro método ou qualquer combinação do precedente conforme seria conhecido a um versado na técnica (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição Mack Printing Company, 1990, incorporada aqui por referência).

[000309] A quantidade de dosagem atual de uma composição da presente invenção administrada a um paciente animal pode ser determinada por fatores físicos e fisiológicos tais como peso corpóreo, severidade de condição, o tipo de doença sendo tratada, intervenções terapêuticas prévias ou concorrente, idiopatia do paciente e na rota de administração. O praticante responsável pela administração determinará, em qualquer evento, a concentração de ingrediente(s) ativo(s) em uma composição e dose(s) apropriada(s) para o indivíduo objeto.

[000310] Em certas concretizações, as composições farmacêuticas podem compreender, por exemplo, pelo menos cerca de 0,1% de um composto ativo. Em outras concretizações, um composto ativo pode

compreender entre cerca de 2% a cerca de 75% do peso da unidade, ou entre cerca de 25% a cerca de 60%, por exemplo, e qualquer faixa derivável deste. Em outros exemplos não limitativos, uma dose pode também compreender de cerca de 1 micrograma/kg/peso corpóreo, cerca de 5 microgramas/kg/peso corpóreo, cerca de 10 microgramas/kg/peso corpóreo, cerca de 50 microgramas/kg/peso corpóreo, cerca de 100 microgramas/kg/peso corpóreo, cerca de 200 microgramas/kg/peso corpóreo, cerca de 350 microgramas/kg/peso corpóreo, cerca de 500 microgramas/kg/peso corpóreo, cerca de 1 miligrama/kg/peso corpóreo, cerca de 5 miligrama/kg/peso corpóreo, cerca de 10 miligrama/kg/peso corpóreo, cerca de 50 miligrama/kg/peso corpóreo, cerca de 100 miligrama/kg/peso corpóreo, cerca de 200 miligrama/kg/peso corpóreo, cerca de 350 miligrama/kg/peso corpóreo, cerca de 500 miligrama/kg/peso corpóreo, a cerca de 1000 mg/kg/peso corpóreo ou mais por administração, e qualquer faixa derivável. Em exemplos não limitativos de uma faixa derivável a partir dos números listados acima aqui, uma faixa de cerca de 5 mg/kg/peso corpóreo a cerca de 100 mg/kg/peso corpóreo, cerca de 5 microgramas/kg/peso corpóreo a cerca de 500 miligramas/kg/peso corpóreo, etc., podem ser administrados, baseado nos números descritos acima.

[000311] Em qualquer caso, a composição pode compreender vários antioxidantes para retardar oxidação de um ou mais componentes. Adicionalmente, a prevenção da ação de micro-organismos pode ser determinada por conservantes tais como agentes antibacteriais e antifungais, incluindo, mas não limitados a talvez (*por exemplo*, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal ou combinações destes.

[000312] A invenção pode ser formulada em uma composição em uma base livre, forma neutra ou sal. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais de adição ácidos, *por exemplo*, aqueles formados com

os grupos amino livres de uma composição proteinácea, ou que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácidos hidroclóricos ou fosfóricos, ou tais ácidos orgânicos como ácidos acético, oxálico, tartárico ou mandélico. Os sais formados com os grupos carboxil livres podem também serem derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, sódio, potássio, amônia, cálcio ou hidróxidos férricos; ou tais bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina ou procaína.

[000313] Em concretizações onde a composição está em uma forma líquida, um veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão compreendendo, mas não limitado a, água, etanol, poliol (*por exemplo*, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido, etc), lipídeos (*por exemplo*, triglicerídeos, óleos vegetais, lipossomos) e combinações destes. A fluidez correta pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lecithin; pela manutenção do tamanho de partícula requerido pela dispersão em veículos tais como, por exemplo, poliol líquido ou lipídeos; pelo uso de surfactantes tais como, por exemplo, hidroxiropilcelulose; ou combinações destes tais métodos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, tais como, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio ou combinações destes.

[000314] Em outras concretizações, pode-se usar gotas no olho, soluções nasais ou sprays, aerosóis ou inalantes na presente invenção. Tais composições são geralmente designadas para serem compatíveis com ao tipo de tecido-alvo. Em um exemplo não limitativo, soluções nasais são usualmente soluções aquosas designadas para serem administradas para as passagens nasais em gotas ou sprays. Soluções nasais são preparadas de modo que elas são similares em muitos casos a secreções nasais, de modo que ação ciliar normal é mantida. Desse modo, em concretizações preferidas as soluções nasais aquosas são usualmente isotônicas ou levemente tamponadas para manter um pH

de cerca de 5,5 a cerca de 6,5. Em adição, conservantes antimicrobianos, similares àqueles usados em preparações oftálmicas, fármacos, ou estabilizadores de fármaco apropriados, se requeridos, podem ser incluídos na formulação. Por exemplo, várias preparações nasais comerciais são conhecidas e incluem fármacos tais como antibióticos ou anti-histaminas.

[000315] Em certas concretizações a composição é preparada para administração por tais rotas como ingestão oral. Nestas concretizações, a composição sólida pode compreender, por exemplo, soluções, suspensões, emulsões, comprimidos, pílulas, cápsulas (*por exemplo*, cápsulas de gelatina com casca dura ou macia), formulações de liberação sustentada, composições bucais, elixires, suspensões, xaropes, wafers, ou combinações destes. Composições orais podem ser incorporadas diretamente com a alimentação da dieta. Veículos preferidos para administração oral compreendem diluentes, veículos comestíveis assimiláveis ou combinações destes. Em outros aspectos da invenção, a composição oral pode ser preparada como um xarope ou elixir. Um xarope ou elixir, e pode compreender, por exemplo, pelo menos um agente ativo, um agente de adoçamento, um conservante, um agente aromatizante, um corante, um conservante, ou combinações destes.

[000316] Em certas concretizações preferidas uma composição oral pode compreender um ou mais ligantes, excipientes, agentes de desintegração, lubrificantes, agentes aromatizantes, e combinações destes. Em certas concretizações, uma composição pode compreender um ou mais dos seguintes: um ligante, tal como, por exemplo, goma de tragacanto, acácia, amido de milho, gelatina ou combinações destes; um excipiente, tais como, por exemplo, fosfato de dicálcio, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio ou combinações destes; um agente de

desintegração, tais como, por exemplo, amido de milho, amido de batata, ácido algínico ou combinações destes; um lubrificante, tal como, por exemplo, estearato de magnésio; um agente de adoçamento, tais como, por exemplo, sacarose, lactose, sacarina ou combinações destes; um agente aromatizante, tais como, por exemplo, óleo de hortelã-pimenta, óleo de gualtária, aromatizante de cereja, aromatizante de laranja, *etc.*; ou combinações destes. Quando a forma de unidade de dosagem é uma cápsula, ela pode conter, em adição a materiais do tipo acima, veículos tal como um veículo líquido. Vários outros materiais podem estar presentes como revestimentos ou para, de outro modo, modificar a forma física da unidade de dosagem. Por exemplo, comprimidos, pílulas, ou cápsulas podem ser revestidos com verniz, açúcar ou ambos.

[000317] Formulações adicionais que são adequadas para outros modos de administração incluem supositórios. Os supositórios são formas de dosagem sólidas de vários pesos e formas, usualmente medicados para inserção no reto, vagina ou uretra. Após inserção, os supositórios amolecem, derretem ou dissolvem nos fluidos da cavidade. Em geral, para os supositórios, veículos tradicionais podem incluir, por exemplo, polialquileno glicóis, triglicerídeos ou combinações destes. Em certas concretizações, supositórios podem ser formados de misturas contendo, por exemplo, o ingrediente ativo na faixa de cerca de 0,5% a cerca de 10%, e preferivelmente cerca de 1% a cerca de 2%.

[000318] Soluções injetáveis estéreis são preparadas por incorporação dos compostos ativos na quantidade requerida no solvente apropriado dos outros ingredientes enumerados acima, conforme requerido, seguido por esterilização filtrada. Geralmente, disperses são preparadas por incorporação dos vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril contém o meio de dispersão básico e/ou os outros ingredientes. No caso de pós estéreis para a preparação

de soluções injetáveis estéreis, suspensões ou emulsão, os métodos preferidos de preparação são técnicas de secagem à vácuo ou de secagem-congelamento que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de um meio líquido filtrado previamente estéril deste. O meio líquido deve ser adequadamente tamponado se necessário e o diluente líquido primeiro tornado isotônico antes da injeção com salina suficiente ou glicose. A preparação de composições altamente concentradas para injeção direta é também contemplada, onde o uso de DMSO como solvente é considerado para resultar em penetração extremamente rápida, distribuindo altas concentrações dos agentes ativos a uma pequena área.

[000319] A composição deve ser estável sob as condições de manufatura e armazenagem, e preservada contra ação contaminante de micro-organismos, tais como bactéria e fungos. Será apreciado que contaminação de endotoxina deve ser mantida minimamente a um nível seguro, por exemplo, menos do que 0,5 ng/mg de proteína.

[000320] Em concretizações particulares, absorção prolongada de uma composição injetável pode ser determinada pelo uso nas composições de agentes de retardamento de absorção, tal como, por exemplo, monoestearato de alumínio, gelatina ou combinações destes.

IX. Kits Exemplares da Invenção

[000321] Em concretizações particulares da invenção, existe um kit alojado em um recipiente adequado. O kit pode ser adequado para diagnose, tratamento e/ou proteção para um indivíduo de *Ehrlichia*, tal como *Ehrlichia chaffeensis*. Em concretizações particulares, o kit compreende em um recipiente adequado um agente que tem como alvo um antígeno de VLPT de *E. chaffeensis*. O agente pode ser um anticorpo, uma molécula pequena, um polinucleotídeo, um polipeptídeo, um peptídeo, ou uma mistura destes. O agente pode ser provido no kit em uma forma adequada, tal como estérila, liofilizada, ou ambos, por

exemplo. Em concretizações particulares, o kit compreende um anticorpo contra uma ou mais de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, ou SEQ ID NO:15; e/ou proteínas relacionadas destas. Outras composições relacionadas imunogênicas relacionadas a VLPT de *E. chaffeensis* (incluindo polipeptídeos, peptídeos ou anticorpos) não apresentados especificamente aqui podem também estarem incluídas.

[000322] O kit pode adicionalmente compreender um ou mais aparelhos para distribuição de uma composição a um indivíduo em necessidade deste. Os aparelhos podem incluir uma seringa, conta-gotas, agulha, ferramenta de biópsia, cateter, e assim por diante, por exemplo.

[000323] Em concretizações no qual o kit é empregado para uma proposta de diagnóstico, o kit pode adicionalmente proporcionar uma ou mais composições de detecção e/ou aparelhos para identificação de um antígeno de *E. canis* gp19. Tais concretização podem empregar uma marcação detectável, tal como para um anticorpo, por exemplo, e a marcação pode ser fluorescente, radioativa, quimiluminescente, ou colorimétrica, por exemplo.

EXEMPLOS

[000324] Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar concretizações preferidas da invenção. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que se seguem representam técnicas descobertas pelos inventores para funcionar bem na prática da invenção, e, desse modo, podem ser consideradas para constituir modos preferidos para esta prática. Contudo, aqueles versados na técnica devem, à luz da presente descrição, apreciarem que muitas mudanças podem ser feitas nas concretizações específicas que são reveladas e ainda obtém um resultado semelhante ou similar sem fugir do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLO 1

MATERIAIS EXEMPLARES E MÉTODOS

[000325] **Cultura e purificação de *ehrlichiae*.** *E. canis* (Jake strain) e *E. chaffeensis* (Arkansas strain) foram propagados conforme anteriormente descrito (McBride *et al.*, 2001). *Ehrlichiae* foram purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho sobre Sephadryl S-1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.) conforme anteriormente descrito (Rikihisa *et al.*, 1992). As frações contendo bactéria foram congeladas e utilizadas como antígeno e fontes de DNA.

[000326] **Preparação de DNA genômico e antígeno de *E. chaffeensis*.** DNA genômico e antígeno foram purificados de *E. chaffeensis* (cepa Arkansas) conforme anteriormente descrito (McBride *et al.*, 1996).

[000327] **Amplificação de PCR dos fragmentos de gene de VLPT de *E. chaffeensis*.** Prímeres de oligonucleotídeo para a amplificação dos fragmentos de gene de VLPT de *E. chaffeensis* foram designados manualmente ou pelo uso Iniciador Select (Lasergene v5.08, DNASTar, Madison, WI) de acordo com a sequência em GenBank (número de acesso AF121232) e sintetizados (Sigma-Genosys, Woodlands, TX) (Tabela 2). Sete fragmentos de gene correspondendo as quatro TRs simples (VLPT-R4, VLPT-R3, VLPT-R2, e VLPT-R1), o C-terminus (VLPT-C), a combinação de repetições R3 e R2 (VLPT-R32), e a VLPT de comprimento total (VLPT-R4321-C) contendo repetições múltiplas (R4, R3, R2, e R1) e C-terminus de gene de VLPT de *E. chaffeensis* foram amplificados usando-as um PCR HotMaster Mix (Eppendorf, Westbury, NY) e DNA genômico de *E. chaffeensis* (Arkansas strain) como o gabarito (Tabelas 2 e 3). O perfil de ciclização térmico foi: 95° C por 4 min, 35 ciclos de 94° C por 30 s, temperatura de anelamento (3° C menor do que o iniciador mais baixo T_m) por 30 s, e 72° C para o tempo de extensão apropriado (30 s/500 pares bases), seguido por uma

extensão a 72° C por 7 min e mantido a 4° C.

[000328] **Expressão e purificação das proteínas de VLPT de *E. chaffeensis* recombinante.** Os produtos de PCR amplificados foram克隆ados diretamente no pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) ou vetor de expressão pTriEx-6 3C/LIC (Novagen, Madison, WI). Células de *Escherichia coli* (TOP10; Invitrogen) foram transformadas com o plasmídeo contendo os fragmentos de gene de VLPT de *E. chaffeensis*, e transformantes positivos foram classificados por PCR para a presença do inserto e orientação correta, e foram sequenciados com um sequenciador de ABI Prism 377XL DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the University of Texas Medical Branch Proteína Chemistry Core Laboratory. A expressão de proteína recombinante foi realizada por 4 horas após indução com 0,2% de arabinose (pBAD/Thio-TOPO) ou isopropil-β-D-tiogalactopiranose 0,5 mM (IPTG; pTriEx-6 3C/LIC). As proteínas recombinantes foram purificadas sob as condições nativas usando colunas HisSelect® (para pBAD/Thio-TOPO; Sigma, St. Louis, MO) ou colunas Strep•Tactin® Superflow (para pTriEx-6 3C/LIC; Novagen) e quantificadas com o ensaio dce proteína de BCA (Pierce, Rockford, IL), de acordo com as instruções do fabricante.

[000329] ***E. Peptídeos sintéticos de VLPT de *E. chaffeensis*.*** Cinco peptídeos sintéticos correspondendo ao fragmento N-terminal (VLPT-N; 17 aminoácidos) e quatro unidades TR individuais (R4, R3, R2, e R1; 30 aminoácidos cada) de proteína de VLPT de *E. chaffeensis*, bem como sete peptídeos de sobreposição correspondendo às regiões diferentes de R3 (R3-1 a R3-7) e um peptídeo N-terminal de 20 aminoácidos de R4 (R4-N) foram sintetizados (Bio-Synthesis, Lewisville, TX) (tabela 3). O pó liofilizado foi ressuspenso na água de grau de biologia molecular (1 mg/ml). Tabela 2. Sequência de codificação genômica de *E. chaffeensis* (Arkansas) e uma sequência de proteína ; ambos disponíveis sob o

GenBank® Accession AF121232, incorporada por referência aqui

[000330] **Antissoro.** UM soro de cão de anti-*E. chaffeensis* convalescente foi derivado de cão experimentalmente infectado (Nº 2251). Os soros de pacientes de HME foram um tipo doação de Focus Technologies (Cypress, CA). Antissoro anti-VLPT-R3 de coelho foi gerado contra o peptídeo conjugado sintético de *E. chaffeensis* VLPT-R3 KLH-conjugado por um vendedor comercial (Bio-Synthesis).

[000331] **Eletroforese de gel e imunomarcação por western (Western blotting).** Lisatos de célula inteira total purificados de *E. chaffeensis* ou *E. canis* ou proteínas recombinantes foram separados por eletroforese de gel de sódio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidos para nitrocelulose, e imunomarcação por western (Western blotting) realizado conforme anteriormente descrito (McBride *et al.*, 2003), exceto que soros humanos e de cão primários foram diluídos 1:100 e antissoro de coelho anti-VLPT-R3 foi diluído 1:2.000.

[000332] **Detecção de carboidrato.** A detecção de Glican no VLPT de proteína recombinante foi realizada com um kit de detecção de digoxigenin glican (Roche, Indianapolis, IN) conforme anteriormente descrito (McBride *et al.*, 2000).

[000333] **ELISA.** Placas de ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) (MaxiSorp; NUNC, Roskilde, Denmark) foram revestidas (0,5 µg/cavidade; 50 µl) com proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos

em salina tamponada com fosfato (pH 7,4). Proteínas e peptídeos foram adsorvidos nas placas de ELISA durante a noite a 4°C com agitação branda, subsequentemente lavadas duas vezes com 200 µl de salina tamponada contendo 0,2% de Tween 20 TBST) e bloqueadas com 100 µl de 3% de albumina de soro bovino (BSA) em TBST por 1 hora à temperatura ambiente com agitação, lavadas novamente. Soros humanos ou de cão convalescente anti-*E. chaffeensis* diluído (1:100) em 3% de BSA-TBST foram adicionados a cada cavidade (50 µl) e incubados à temperatura ambiente por 1 hora com agitação branda. As placas foram lavadas quatro vezes, e 50 µl de anticorpo secundário de fosfatase alcalina- marcado cabra anti-cão ou IgG humano (H+L) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) diluído (1:5,000) em 3% de BSA-TBST foi adicionado e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas quatro vezes, e substrato (100 µl, BluePhos; Kirkegaard & Perry Laboratories) foi adicionado à cada poço. As placas foram incubadas por 30 min no escuro com agitação, e desenvolvimento de cor foi lido em uma leitora de microplaca (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a A₆₅₀, e os dados foram analisados por SoftmaxPro v4,0 (Molecular Devices). As leituras de densidade ótica (OD) representam a média para três cavidades (\pm desvios padrões) com o OD das cavidades somente tampão subtraídas.

[000334] **Microscopia de imunoelétron.** Microscopia de elétron de imuno-ouro foi realizada em células de DH82 infectadas com *E. chaffeensis* conforme anteriormente descrito (McBride *et al.* 2005), exceto que soro de peptídeo anti-VLPT-R3 de **coelho** primário foi diluído 1:10,000. Células de DH82 não infectadas foram usadas como um controle negativo.

[000335] **Espectrometria de massa.** A espectrometria de massa foi realizada usando-se espectrômetro de massa (**MS**) de dessorção/ionização de laser auxiliada por matriz (MALDI) de tempo de

vôo (TOF) (Voyager-DE STR; Applied Biosystems) na University of Texas Medical Branch Mass Spectrometry Core Laboratory.

[000336] **Análise de proteína de VLPT secretada.** Sobre nadantes de cultura de célula DH82 infectados de *E. chaffeensis* (1 ml) foram coletados todo dia sem distúrbio da monocamada de célula e centrifugadas a alta velocidade (10.000 x g por 5 min) para pelotar células e bactéria. Os sobre nadantes foram subsequentemente concentrados 10 vezes (Centricon ultra centrifugal filter, 10-kDa cutoff; Millipore, Billerica, MA) por eletroforeses de gel e imunomarcação usando **anticorpo** policlonal específico de anti-VLPT-R3.

[000337] Análise de Sequência. O VLPT de *E. chaffeensis* foi avaliado para glicosilação O-ligada potencial e fosforilação com os algoritmos computacionais do programa YinOYang v1.2 por Julenius *et al.*, 2005, e programa NetPhos v2.0 por Blom *et al.*, 1999. A sequência de sinal potencial ou secreção não clássica foi identificada com os algoritmos computacionais dos programas SignalP 3.0 e SecretomeP 2.0 por Bendtsen *et al.*, 2004, treinada em bactéria gram-negativa. Alinhamentos de ácido nucleico e aminoácido foram realizados com MegAlign (Lasergene v5.08, DNASTar). Epítocos de VLPT de *E. chaffeensis* foram examinados para homologia para outras proteínas de espécie *Ehrlichia* (incluindo ortólogos de VLPT) usando-se o proteína-proteína Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Tabela 3. Polipeptídeos sintéticos de VLPT exemplares de *E. chaffeensis*

Peptídeo	Sequência	Aminoácidos	SEQ ID NO:
N	MSQFSEDNMGNIQMPFD	17	2
R4	SDSHEPSHLELPSLSEEVIQLESSDLQQSSN	30	3
R3	SDLHGSFSVELPDFKEAVQLGNDLQQSSD	30	4
R2	SDLHGSFSVELDPSKEEVQLESSDLQQSSN	30	5
R1	SDLHESSFVELPGPSKEEVQFEDDAKNVYY	30	6
R3-1	SDLHGSFSVELFDP	14	7

Peptídeo	Sequência	Aminoácidos	SEQ ID NO:
R3-2	SDLHGSFSVELDFDPFKE	17	8
R3-3	HGSFSVELDFDPFKE	14	9
R3-4	HGSFSVELDFDPFKEAVQ	17	10
R3-5	HGSFSVELDFDPFKEAVQLGN	20	11
R3-6	VELDFDPFKEAVQLGND	16	12
R3-7	FKEAVQLGNDLQQSSD	16	13
R4-N	HEPSHLELPSLSEEVIQLES	20	14
C	GQDHVSLSELGLLGGVFSTMNYLSGYTPY YYHHYCCYNPYYFDYVTPDYCHHCSESSLE	61	15

Tabela 4. Prímeres de oligonucleotídeo para amplificação dos fragmentos de gene de VLPT de *E. chaffeensis*

Fragmento	Iniciador de Avanço	Sequência	Iniciador Reverso	Sequência	Tamanho do Amplicon
R4	4F	TCTGATTACACATGAGCCT TC (SEQ ID NO:17)	4(2)R	ATTAGAAGATTGTTGT AGATCACTC (SEQ ID NO:18)	90
R3	3(2)F	TCTGATTACACGGGTCT T (SEQ ID NO:19)	3R	ATCAGAAGATTGTTGT AGATCAT (SEQ ID NO:20)	90
R2	3(2)F	TCTGATTACACGGGTCT T (SEQ ID NO:21)	4(2)R	ATTAGAAGATTGTTGT AGATCACTC (SEQ ID NO:22)	90
R1	1F	TCTGATTACACGAGTCT TCT (SEQ ID NO:23)	1R	ATATACTACATTTA GCATCATCTTC (SEQ ID NO:24)	90
C	CF	GGACAAGACCATGTTAGT TT (SEQ ID NO:25)	CR	CTCTAAACTACTTCA CTACAGTG (SEQ ID NO:26)	183
R4321-C	4F	TCTGATTACACATGAGCCT TC (SEQ ID NO:27)	CR	CTCTAAACTACTTCA CTACAGTG (SEQ ID NO:28)	543
R32	3(2)F	TCTGATTACACGGGTCT T (SEQ ID NO:29)	4(2)R	ATTAGAAGATTGTTGT AGATCACTC (SEQ ID NO:30)	180
R32a	3F-lic	CAGGGACCCGGTTCTTCT AATTCTGATTACACGG (SEQ ID NO:31)	2R-lic	GGCACCAAGAGCGTT TAATTAGAAGATTGTT GTAGATCACTC (SEQ ID NO:32)	213

EXEMPLO 2

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE VLPT DE *E. CHAFFEENSIS*

[000338] **Composição e características de proteína de VLPT de *E. chaffeensis*.** Serina (33 resíduos; 16,7%), leucina (22; 11,1%), glutamato (20; 10,1%), e aspartato (17; 8,6%) foram os aminoácidos que ocorrem mais frequentemente na proteína de VLPT de *E. chaffeensis*, considerando-se 46,5% do teor de aminoácido total (Fig. 1A). Além disso, na região de repetição de proteína de VLPT, as ocorrências destes quatro resíduos tornaram-se mais frequentes com uma composição de 20%, 12,5%, 13,3% e 10%, respectivamente, que considerou 55,8% do teor de aminoácido de região de repetição total. Quatro resíduos de cisteína associados com ligações de dissulfeto estavam presentes no domínio carboxil-terminal da proteína, mas este domínio foi dominado por resíduos de torosina (19,7%). Devido a grande proporção de resíduos fortemente acídicos glutamato e aspartato, a proteína de VLPT foi altamente acídica (pl 3,8). A região N-terminal (17 aminoácidos) e o domínio maior, a região de TR (120 aminoácidos), foram altamente acídicos (pl 3,2 e 3,8, respectivamente, e domínio carboxil-terminal (61 aminoácidos) o menos acídico (pl 4,7).

[000339] As TRs de VLPT foram não idênticas, mas R3 e R2 tinha a identidade de aminoácido mais alta (83%) e R4 e R1 tinha 53% e 49% de identidade com R3, respectivamente (Fig. 1B). Uma pesquisa BLAST com sequências de aminoácido de VLPT-R3 e VLPT-R4 não encontram homologia entre as repetições de VLPT e outras proteínas ehrlichiais ou proteínas de organismos nos gêneros proximamente relacionados.

[000340] **Identificação de proteína de VLPT nativa.** demarcação por western (Western blotting) identificou uma proteína nativa com uma massa molecular de ~32 kDa (~6,2 kDa maior do que a massa prognosticada de 25,8 kDa) e cinco proteínas menos predominantes (22~30 kDa) em lisatos e sobrenadantes de célula de *E. chaffeensis* de células infectadas de *E. chaffeensis* que reagiram com antissoro de coelho monoespecífico contra o peptídeo de VLPT-R3 sintético (Fig.

2A). Além disso, anticorpo anti-VLPT-R3 não reagiu com lisato de célula total de *E. canis* (Fig. 2A). Uma proteína de tamanho similar (~32 kDa) em lisatos de célula total de *E. chaffeensis* e sobrenadantes de culturas infectadas também reagiram com soro de cão de anti-*E. chaffeensis* (Fig. 2B). Os controles de soro de cão ou soro de coelho de pré-imunização não reconhecem lisatos ou sobrenadantes de célula total de *E. chaffeensis* ou (dados não mostrados).

[000341] **Epítopo contendo regiões de VLPT.** Para determinar as regiões maiores contendo epítopo de VLPT, proteínas recombinantes correspondendo a domínios de VLPT distintos (R4321-C, R32, R1, R2, R3 R4, e C; Fig. 3) foram expressas. Todas as proteínas de VLPT recombinantes expressas em pBAD/Thio-TOPO exibiram massas moleculares que foram substancialmente maiores por SDS-PAGE do que prognosticado por sequência de aminoácido, exceto para VLPT-R3 e VLPT-C. O VLPT-R32 expresso em um vetor alternativa pTriEx6 3C/LIC com proteínas de fusão N-terminal substancialmente maior (2,4 kDa comparado a 13,1 kDa para pBAD/Thio) também exibiu uma massa molecular diminuída (3,7 kDa maior do que prognosticado), mas menor do que de VLPT-R32 expresso em pBAD/Thio (5,2 kDa maior do que prognosticado). A massa molecular aumentada exibida por proteínas de VLPT recombinantes indicaram que a proteína foi pós-traducionalmente modificada; além disso, vários locais de glicosilação prognosticados foram identificados em VLPT por algoritmo computacional. Contudo, carboidrato não foi detectado em qualquer polipeptídeos de VLPT recombinantes de *E. chaffeensis* (dados não mostrados). Para confirmar adicionalmente a massa molecular atual de uma proteína de VLPT recombinante, a massa das duas repetições contendo VLPT-R32 expresso em pTriEx6 3C/LIC foi terminada por MALDI-TOF. A massa de VLPT-R32 foi 9,206 Da, levemente menor do que a massa (9,325 Da) prognosticada pela sequência de aminoácido (excluindo os 2,4 kDa

de expressão tag), demonstrando modificações pós-translacionais não estavam presentes.

[000342] Por Western imunoblot, as proteínas maiores contendo TR R4321-C e R32 e unidades de repetição individuais R2 e R3 reagiram fortemente com soro de cão anti-*E. chaffeensis*, mas fragmentos recombinantes representando o domínio de carbóxi terminal (C) e unidades de repetição R1 e R4 não foram reativas com soro de cão anti-*E. chaffeensis* (Fig. 4A). A reatividade do VLPT (polipeptídeos sintéticos e proteínas recombinantes correspondentes) com soro de cão anti-*E. chaffeensis* foi também examinada por ELISA para identificar epítópos potenciais conformacionais (Fig. 4B). Os polipeptídeos de VLPT-N (sintético), VLPT-C (recombinante), ou VLPT-R1 (sintético e recombinante) não reagiram com soro de cão anti-*E. chaffeensis*. Similar aos resultados por imunomarcação de western (Western blotting), peptídeos de VLPT-R3 ou R2 (sintéticos e recombinantes) reagiram fortemente com soro de cão anti-*E. chaffeensis*; contudo, o VLPT-R3 (sintético) foi mais imunorreativo do que VLPT-R2 (sintético). Inversamente, o VLPT-R4 recombinante, que não era imunorreativa por Western imunoblot, reagiu (sintético e recombinante) fortemente com soro de cão anti-*E. chaffeensis* por ELISA, indicando que um epítopo conformacional estava presente em VLPT-R4 (Fig. 4A e B).

[000343] **Identificação de imunodeterminantes de VLPT maiores.** Para localizar adicionalmente os epítópos maiores de proteína de VLPT de *E. chaffeensis* VLPT, sete peptídeos de sobreposição (designados R3-1 to R3-7) correspondendo à localizações diferentes dentro de VLPT-R3 foram reagidos com soro de cão anti-*E. chaffeensis* (Figs. 3 e 5A). Peptídeos R3-6 e R3-7 (região C-terminal) não foram imunorreativos, mas R3-2, R3-3, R3-4 e R3-5 correspondendo a região N-terminal foram encontrados para reagir similarmente e fortemente com soro de cão anti-*E. chaffeensis* por ELISA (Fig. 4B), indicando a região N-terminal (23

aminoácidos; SDLHGSFSVELFDPFKEAVQLGN de VLPT-R3 continha um epítopo de anticorpo maior. O peptídeo R3-3 (14 aminoácidos; HGSFSVELFDPFKE) foi o menor peptídeo que reagiu fortemente com soro de cão anti-*E. chaffeensis* (Figs 5A e B). Os peptídeos R3-1 e R3-6, que diferem por três (C-terminal) e cinco aminoácidos (N-terminal), respectivamente, não foram reativos (Figs. 5A e B).

[000344] Para examinar e comparar o imunodeterminante em VLPT-R4, um peptídeo de 20 aminoácidos (HEPSHLELPSLSEEVIQLES) correspondendo ao R3-5 em VLPT-R3 (Fig. 4A) não era imunorreativo com ou soro de cão ou soro do paciente (dados não mostrados), indicando que o terceiro epítopo de VLPT no R4 foi molecularmente distinto, e é consistente com a divergência notada nas sequências de aminoácido de R4 comparada a R3 e R2 (Fig 1B).

[000345] **Imunorreatividade de peptídeos de VLPT-R3 com soro de paciente de HME.** Três soros de paciente de HME (N^{os} 1, 4 e 12) que tinham anticorpos detectáveis de *E. chaffeensis* por ensaio de imunofluorescência (IFA) foram usados para examinar a imunorreatividade de VLPT-R4, R3, e R2 (sintético e recombinante) por ELISA (Fig. 6A-C, respectivamente). Consistente com a imunorreatividade exibida com soro de cão anti-*E. chaffeensis*, VLPT-R3 e R2 também exibiram a imunorreatividade mais forte com soros de paciente de HME, e dois pacientes (N^{os} 1 e 12) exibiram uma forte resposta a anticorpo para VLPT-R4 (Figs 6A-C).

[000346] A imunorreatividade dos três soros de pacientes de HME com os sete peptídeos sintéticos de sobreposição (R3-1 a R3-7) de VLPT-R3 foi determinada por ELISA (Figs. 6A-C). Os peptídeos R3-4 (17 aminoácidos) e R3-5 (20 aminoácidos) que continham sequências de aminoácido similares (vide Fig. 5A) reagidas fortemente e consistentemente com todos os soros de paciente de HME testados (Figs. 6A-C). Comparando os peptídeos de sobreposição, a sequência

de peptídeo mínima para este imunodeterminante foi 17 aminoácidos (peptídeo R3-5). Anticorpos de pacientes de HME e o cão experimentalmente infectados com *E. chaffeensis* reagiram similarmente a VLPT-R3 (Figs. 4B e 6A-C). Contudo, anticorpos em soros humanos foram direcionados principalmente contra peptídeos R3-4 e R3-5 dentro de VLPT-R3 (Figs. 6A-C). Soros humanos normais não reconhecem estes peptídeos e proteínas (dados não mostrados).

[000347] A reatividade de VLPT-R3 com um painel maior de soros de paciente de HME (14 pacientes) que tinha anticorpos detectáveis de *E. chaffeensis* anticorpos foi determinada. Todos os soros do paciente reagiram com VLPT-R3 (sintético) (Fig. 6D), indicando que este epítopo é consistentemente reconhecido pelos humanos e a reatividade de anticorpos em soros de paciente com este epítopo completamente correlacionado com IFA. O soro humano normal não reconheceu VLPT-R3 (Fig. 6D, raia 16)

[000348] **Secreção temporal de VLPT de *E. chaffeensis*.** VLPT foi detectado em sobrenadantes de células infectadas, mais cedo do que 1 dia pós-infecção e aumentado em quantidade através de 6 dias pós-infecção (Fig. 7). A proteína de VLPT não foi observada em sobrenadante de cultura de célula DH82 não infectada.

[000349] **Localização celular e extracelular de VLPT.** Várias proteínas ehrlichiais caracterizadas são diferencialmente expressas no ehrlichiae de núcleo denso (gp120, gp36, e gp47). Contudo, similar a seu ortólogo gp19 de *E. canis*, a proteína de VLPT de *E. chaffeensis* foi observada na membrana de mórula e superfície de ambos ehrlichiae reticulado e de núcleo denso, mas foi também detectado na matriz fibrilar de mórula por microscopia de imunoelétron (Fig. 8A). O anticorpo anti-VLPT-R3 não reagiu com células DH82 não infectadas (Fig. 8B).

EXEMPLO 3

SIGNIFICÂNCIA DA PRESENTE INVENÇÃO

[000350] A descrição inicial do gene de VLPT de *E. chaffeensis* se focalizou nas aplicações do gene para diagnósticos moleculares e epidemiologia. Consequentemente, o gene de VLPT foi frequentemente utilizado para diferenciar isolados baseados em diferenças no número de unidades de TRs e variação de sequência presente no gene (Sumner *et al.*, 1999; Yabsley *et al.*, 2003). Embora um estudo prévio demonstrasse que VLPT recombinante reagiu com anticorpos em soro de paciente de HME, as propriedades imunológicas da proteína de VLPT não foram totalmente definidas (Popov *et al.*, 2000). Notavelmente, a proteína de VLPT nunca foi conclusivamente identificada em lisatos de célula total nativa de *E. chaffeensis*, e proteínas imunorreativas maiores correspondendo a sua massa molecular reportada de 44-kDa (dobra o tamanho prognosticado) nunca foram identificadas. Consequentemente, a identidade de VLPT e extensão da resposta de hospedeiro direcionada contra ele permaneceu não determinada. Recentemente, foi descrito que a identificação e caracterização de uma proteína de 19-kDa imunorreativa maior fortemente acídica, conservada (gp19) em *E. canis* que induz uma resposta de anticorpo (McBride *et al.*, 2003). Foi também concluído baseado na análise genômica e de proteína que a proteína de VLPT de *E. chaffeensis* foi ortólogo de gp19. O papel da proteína de VLPT de *E. chaffeensis* na patobiologia ehrlichial é também não conhecido, e sua falta de relacionamento com outras proteínas bacteriais conhecidas não proporciona indícios relacionados a sua função potencial. Uma característica remarcável de VLPT e *E. canis* gp19 é o domínio homólogo de carboxi-terminal dominado por tirosina, indicando que é um domínio conservado funcionalmente importante.

[000351] A discrepância na massa molecular aparente da proteína de VLPT de *E. chaffeensis* (Arkansas strain) observada na invenção (~32 kDa) e que da VLPT recombinante (~44 kDa) reportada anteriormente foi

notado, e é conhecido que o VLPT nativo nunca foi identificado em um estudo prévio. Não obstante, a proteína de VLPT nativa (~32 kDa) identificada a partir do lisato ehrlichial por anticorpo anti-VLPT-R3, e a massa da proteína de VLPT recombinante (sem tag de fusão) estavam em acordo. Consequentemente, a evidência gerada pela invenção indicou que a massa do VLPT (recombinante e nativo) é ~32-kDa, que é maior do que a massa prognosticada (25,7-kDa), mas substancialmente menor do que anteriormente reportado (Sumner *et al.*, 1999).

[000352] Quatro pares (gp200s, gp120/gp140, gp47/gp36, e VLPT/gp19) de ortólogos de proteína imunorreativa em *E. chaffeensis* e *E. canis* foram identificados. Dois pares ortólogos são proteínas contendo TR, e o VLPT/gp19 também parece ser similar. Embora o *E. canis* gp19 careça de repetições múltiplas encontradas no VLPT de *E. chaffeensis*, ele tem um remendo rico em Ser/Thr/Glu que é similar no tamanho e composição aquele de uma unidade de repetição simples rica e, serina de VLPT, e o imunodeterminante maior do gp19 foi mapeado para o remendo rico em STE. Similarmente, epítotos de anticorpo foram identificados em outros ortólogos ehrlichial contendo TR rica em serina incluindo gp36/47 e gp120/140 (Doyle *et al.*, 2006; Yu *et al.* 1996).

[000353] Exceto para p28/p30, todas as proteínas imunorreativas maiores de *E. chaffeensis* e *E. canis* que foram caracterizadas são altamente acídicas devido a uma predominância de glutamato e aspartato, mas eles também têm uma grande proporção de aminoácidos polares, tal como serina, que estão presentes em frequência mais alta dentro das TRs encontradas nestas proteínas. Além disso, epítotos de anticorpo maiores destas proteínas foram mapeados para estes domínios acídicos ou de TRs acídicas ricas em serina (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000; Nethery *et al.*, 2007). A composição de aminoácido de *E. canis*

gp19 consiste predominantemente em três aminoácidos, serina, glutamato e aspartato. Consistente com outras proteínas imunorreativas maiores incluindo gp19, VLPT tem predominância similar de serina, glutamato e aspartato que são mais pronunciados na região de TRs. A alta frequência do amino polar e acídico indica um relacionamento direto entre a resposta imune de hospedeiro e sequências repetitivas ricas em serina acídica e domínios.

[000354] Previamente, foi reportado que a detecção de carboidrato nas proteínas contendo TR ehrlichial recombinante que exibiu massas maiores do que as massas prognosticadas similares a suas contrapartes nativas. Além disso, VLPT foi reportado para exibir uma massa prognosticada maior do que a massa por eletroforese de gel, uma descoberta que foi também observada na invenção com proteínas de VLPT nativas e recombinantes (Sumner *et al.*, 1999). Desse modo, a possibilidade que glicosilação foi responsável por esta diferença foi considerada. Resíduos de serina e treonina são locais de ligação para O-glicans e alguns destes aminoácidos foram prognosticados para serem locais de fixação de glican no VLPT. Contudo, diferente de outras proteínas ehrlichiais, o carboidrato no VLPT não foi detectado, e a massa (conforme determinada por MALDI-TOF) de um recombinante duas repetições contendo fragmento (VLPT-R32) foi consistente com sua massa prognosticada confirmado que a migração anormal não foi devido a modificação pós-traducional de repetições em tandem de VLPT. Em uma concretização, o aumento na mobilidade eletroforética é porque VLPT é uma proteína altamente acídica. Outros tem reportado que proteínas altamente acídicas tal como ribonuclease U2 e caldesmon exibem comportamento eletroforético anômalo que pode ser normalizado após neutralização (Garcia-Ortega *et al.*, 2005; Graceffa *et al.*, 1992; Moussa *et al.*, 2004). Em concretizações específicas da invenção, o teor de aminoácido acídico alto total pl (3,8) de VLPT

explana seu comportamento eletroforético e contribui para o comportamento anômalo de outras proteínas ehrlichiais contendo TR altamente acídicas.

[000355] Três regiões contendo epítopo maiores foram identificadas em proteína de VLPT de *E. chaffeensis* nas unidades de repetição ricas em serina não idênticas R2, R3 e R4, respectivamente, que é consistente com a localização de epítopos em outras proteínas contendo TR ehrlichial (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000). O epítopo de anticorpo em R3, que exibiu a reatividade de anticorpo mais forte com ambos soros humanos foi localizado em uma região de 17 aminoácidos N-terminais que foi altamente homóloga com R2 (duas mudanças de aminoácido). Desse modo, anticorpos direcionados contra R3 provavelmente reagiria cruzado com R2. Portanto, o epítopo R3 parece ser o imunodeterminante primário para ambos anticorpos anti-VLPT de cão e humano. Interessantemente, o imunodeterminante R3 pareceu ser altamente dependente de três aminoácidos terminais (AVQ) em peptídeo R3-4 quando detectado por anticorpos humanos, pelo que os anticorpos reativos em soro canino parecem ser mais dependentes em três aminoácidos (FKE) diretamente a montante. Desse modo, R3-3 foi a sequência de epítopo mínima (14 aminoácidos) para reconhecimento por anticorpos de cão, e R3-4 (17 aminoácidos) contendo três aminoácidos C-terminais adicionais é essencial para reatividade de anticorpo com soros humanos. Interessantemente, R4 foi a repetição mais divergente, e não foi reativo por imunomarcação por western (Western blotting), mas foi reativo com anticorpo em ELISA. Isto indica que um epítopo conformacional distinto estava presente em R4. Epítopos conformacionais foram descritos em espécies *Ehrlichia* e *Anaplasma* (Chen *et al.*, 1996; Munodzana *et al.*, 1998). Desse modo, R4 contribui para a imunorreatividade de VLPT independente de R3. O peptídeo R4 menor (20 aminoácidos) que

corresponde a R3-5 em VLPT-R3 não foi imunorretrativo; contudo, a repetição total (30 aminoácidos) foi imunorretrativa, que suporta a conclusão que este epítopo é descontínuo e requer a sequência de repetição total para criar o epítopo.

[000356] Os epítopos identificados nas unidades de repetição de VLPT parecem ser específicos de espécie, conforme o anticorpo anti-VLPT-R3 não reage cruzado com *E. canis* proximamente relacionado e homologia de aminoácido não foi observada entre VLPT-R2, R3 e R4, e proteínas de outra espécie de *Ehrlichia* ou patogenias proximamente relacionadas. Isto é consistente com o epítopo de anticorpo previamente reportado identificado em *E. canis* gp19 (ortólogo de VLPT), que foi também específico de espécie (McBride *et al.*, 2006). Além disso, epítopos específicos de espécie similares em ortólogos de proteína de *E. chaffeensis* e *E. canis* incluindo o gp120/gp140, gp47/gp36, gp200s foram identificados (Doyle *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000). As descobertas atuais suportam adicionalmente a concretização que anticorpos gerados contra *E. chaffeensis* são direcionados principalmente em epítopos específicos de espécie. Consequentemente, os anticorpos gerados contra uma espécie *Ehrlichia* pode proporcionar pouca ou nenhuma proteção contra uma patogenia proximamente relacionada, tal como *E. canis* neste caso. Contudo,抗ígenos específicos de espécie tais como VLPT são excelentes candidatos para o desenvolvimento de imunodiagnósticos sensíveis específicos de espécie e são úteis para estudos epidemiológicos.

[000357] Existe evidência que proteínas contendo TR ehrlichiais tais como *E. chaffeensis* gp120 e gp47 são secretadas (Doyle *et al.*, 2006; Popov *et al.*, 2000). Na invenção, é demonstrado que a proteína de VLPT é também secretada. O mecanismo de secreção parece ser sec-independent porque VLPT não tem uma sequência de sinal

aminoterminal. VLPT foi prognosticado por SecretomeP 2.0 a ser secretado por um sistema de secreção não clássico e não líder; portanto, a secreção de VLPT e outras proteínas contendo TR pode ocorrer por um mecanismo similar, incluindo *E. chaffeensis* gp120 e gp47, que também carece de uma sequência de sinal N-terminal, mas são encontradas fora da bactéria na mórula e nos sobrenadantes de cultura de célula infectada. Os genes que codificam componentes de sistema de secreção IV foram reportados em ambos *Ehrlichia* e *Anaplasma* (Dunning Hotopp *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 2002), e AnkA of *A. phagocytophilum* parece ser secretado por este sistema (Lin *et al.*, 2007). Contudo, o VLPT não parece conter uma sequência de consenso efetuadora tipo IV (R-X₇-R-X-R-X-R-X-X_n) e pode ser um substrato de outros sistemas de secreção (sec-dependente e sec-independente) que foram identificados em espécie *Ehrlichia* (Dunning Hotopp *et al.*, 2006). [000358] Distinto da expressão diferencial (na ehrlichiae de núcleo denso) de *E. chaffeensis* gp120 e gp47, mas consistente com a localização de *E. canis* gp19 (Doyle *et al.*, 2006; Popov *et al.*, 2000), proteína de VLPT de *E. chaffeensis* foi detectada em ambas formas morfológicas, ehrlichiae reticulado e de núcleo denso, mas foi principalmente encontrado extracelularmente associado com os fibrilos de mórula e membrana de mórula. Desse modo, a proteína de VLPT não parece ser uma proteína de superfície maior e não é associada especificamente com a forma infecciosa de ehrlichiae (núcleo denso). A secreção de VLPT no espaço de mórula e membrana indica um papel potencialmente importante na manutenção da mórula ou como um fator de virulência.

[000359] A maioria das proteínas imunorreativas maiores caracterizadas de espécie *Ehrlichia* são proteínas contendo TR acídicas que têm uso de aminoácido comum e induzem fortes respostas imunes humorais direcionadas nas TRs. A resposta imune de hospedeiro

parece ser principalmente direcionada nos epítopos dentro das TRs, que indicam que todas estas proteínas interagem similarmente com a resposta imune de hospedeiro. Em concretizações específicas da invenção, anticorpos direcionados em epítopos específicos em proteínas de TR são protetores.

EXEMPLO 4

VACINAS DA INVENÇÃO

[000360] Em aspectos particulares da invenção, as composições imunogênicas da presente invenção são adequadas como uma vacina, tal como uma vacina de subunidade. Em outros aspectos da invenção, as composições imunogênicas são referidas como imunoprotetoras.

[000361] Especificamente, uma ou mais composições da invenção, tais como aquelas compreendendo um epítopo de VLPT de *E. chaffeensis*, por exemplo, são administradas a um mamífero, tal como um humano, canino, bovino, ou animal equino, por exemplo. O soro a partir do mamífero pode ser ensaiado para uma resposta imune, tal como por detecção de anticorpos no soro. O mamífero é então individualizado para provação subsequente com o organismo patogênico, tal como o organismo *E. canis* organismo, ou outra composição apropriada, e imunoproteção é determinada. Os controles podem ser empregados, tal como imunização com, por exemplo, um epítopo que sofreu mutação que não compreende uma porção de carboidrato. Proteção completa ou parcial contra a provação subsequente demonstra a natureza imunoprotetora da composição, e a composição é uma vacina. A proteção parcial pode ser definida como protetora do desenvolvimento ou retardamento de desenvolvimento pelo menos no sintoma da infecção ou proteção de pelo menos um sintoma que se torna pior.

REFERÊNCIAS

[000362] Todas as patentes e publicações mencionadas no relatório

descritivo são indicativas do nível daquele versado na técnica ao qual a invenção pertence. Todas as patentes e publicações são aqui incorporadas por referência para mesma extensão como se cada publicação objeto fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

PATENTE E PEDIDOS DE PATENTE

- [000363] Patente U.S. 5.440.013
- [000364] Patente U.S. 5.618.914
- [000365] Patente U.S. 5.670.155
- [000366] Patente U.S. 5.446.128
- [000367] Patente U.S. 5.710.245
- [000368] Patente U.S. 5.840.833
- [000369] Patente U.S. 5.859.184
- [000370] Patente U.S. 5.929.237
- [000371] Patente U.S. 5.475.085
- [000372] Patente U.S. 5.672.681
- [000373] Patente U.S. 5.674.976
- [000374] Patente U.S. 4.554.101

PCT/US07/75343

PUBLICAÇÕES

Bendtsen, J. D., H. Nielsen, H. G. von, and S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:783-795.

Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294:1351-1362.

Bzymek, M. and S. T. Lovett. 2001. Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:8319-8325.

Chen, S. M., X. J. Yu, V. L. Popov, E. L. Westerman, F. G.

Hamilton, and D. H. Walker. 1997. Genetic and antigenic diversity of *Ehrlichia chaffeensis*: comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains. *J. Infect. Dis.* 175:856-863.

Chen, S. M., V. L. Popov, H. M. Feng, and D. H. Walker. 1996. Analysis and ultrastructural localization of *Ehrlichia chaffeensis* proteins with monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54:405-412.

Collins, N. E., J. Liebenberg, E. P. de Villiers, K. A. Brayton, E. Louw, A. Pretorius, F. E. Faber, H. H. van, A. Josemans, K. M. van, H. C. Steyn, M. F. van Strijp, E. Zweygarth, F. Jongejan, J. C. Maillard, D. Berthier, M. Botha, F. Joubert, C. H. Corton, N. R. Thomson, M. T. Allsopp, and B. A. Allsopp. 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:838-843.

Doyle, C. K., A. M. Cardenas, D. M. Aguiar, M. B. Labruna, L. M. Ndip, X. J. Yu, and McBride J.W. 2006. Molecular characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 tandem repeats among different geographic locations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063.

Doyle, C. K., K. A. Nethery, V. L. Popov, and J. W. McBride. 2006. Differentially expressed and secreted major immunoreactive protein orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* elicit early antibody responses to epitopes on glycosylated tandem repeats. *Infect. Immun.* 74:711-720.

Dunning Hotopp, J. C., M. Lin, R. Madupu, J. Crabtree, S. V. Angiuoli, J. Eisen, R. Seshadri, Q. Ren, M. Wu, T. R. Utterback, S. Smith, M. Lewis, H. Khouri, C. Zhang, H. Niu, Q. Lin, N. Ohashi, N. Zhi, W. Nelson, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, J. Sundaram, S. C. Daugherty, T. Davidsen, A. S. Durkin, M. Gwinn, D. H. Haft, J. D. Selengut, S. A. Sullivan, N. Zafar, L. Zhou, F. Benahmed, H. Forberger, R. Halpin, S. Mulligan, J. Robinson, O. White, Y. Rikihisa, and H. Tettelin. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis

agents. PLoS Genet. 2:e21.

Frutos, R., A. Viari, C. Ferraz, A. Morgat, S. Eychenie, Y. Kandassamy, I. Chantal, A. Bensaid, E. Coissac, N. Vachiery, J. Demaille, and D. Martinez. 2006. Comparative genomic analysis of three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. J Bacteriol 188:2533-2542.

Garcia-Ortega, L., I. R. De, V, A. Martinez-Ruiz, M. Onaderra, J. Lacadena, P. A. Martinez del, and J. G. Gavilanes. 2005. Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: ribonuclease U2. Electrophoresis 26:3407-3413.

Graceffa, P., A. Jancso, and K. Mabuchi. 1992. Modification of acidic residues normalizes sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of caldesmon and other proteins that migrate anomalously. Arch. Biochem. Biophys. 297:46-51.

Johannesson *et al.*, 1999, "Bicyclic tripeptide mimetics with reverse turn inducing properties." J. Med. Chem. 42:601-608.

Julenius, K., A. Molgaard, R. Gupta, and S. Brunak. 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. Glycobiology 15:153-164.

Lin, M., A. den Dulk-Ras, P. J. Hooykaas, and Y. Rikihisa. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. Cell Microbiol. 9:2644-2657.

Mavromatis, K., C. K. Doyle, A. Lykidis, N. Ivanova, M. P. Francino, P. Chain, M. Shin, S. Malfatti, F. Larimer, A. Copeland, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, X. J. Yu, D. H. Walker, J. W. McBride, and N. C. Kyrpides. 2006. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. J Bacteriol 188:4015-4023.

McBride J.W., C. K. Doyle, X. F. Zhang, A. M. Cardenas, V. L. Popov, K. A. Nethery, and M. E. Woods. 2006. *Ehrlichia canis* 19-kDa glycoprotein ortholog of *E. chaffeensis* variable length PCR target contains a single serine-rich epitope defined by a carbohydrate immunodeterminant. *Infect. Immun.*

McBride JW, R. E. Corstvet, S. D. Gaunt, C. Boudreault, T. Guedry, and D. H. Walker. 2003. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect. Immun.* 71:2516-2524.

McBride, J. W., J. E. Comer, and D. H. Walker. 2003. Novel immunoreactive glycoprotein orthologs of *Ehrlichia* spp. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990:678-684.

McBride, J. W., L. M. Ndip, V. L. Popov, and D. H. Walker. 2002. Identification and functional analysis of an immunoreactive DsbA-like thio-disulfide oxidoreductase of *Ehrlichia* spp. *Infect. Immun.* 70:2700-2703.

McBride, J. W., R. E. Corstvet, E. B. Breitschwerdt, and D. H. Walker. 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. *J.Clin.Microbiol.* 39:315-322.

McBride, J. W., X. J. Yu, and D. H. Walker. 1999. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 6:392-399.

McBride, J. W., X. J. Yu, and D. H. Walker. 2000. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *E. canis*. *Infect. Immun.* 68:13-18.

McBride, J. W., X. Yu, and D. H. Walker. 2000. A conserved, transcriptionally active p28 multigene locus of *Ehrlichia canis*. *Gene* 254:245-252.

Munodzana, D., T. F. McElwain, D. P. Knowles, and G. H. Palmer. 1998. Conformational dependence of *Anaplasma marginale*

major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infection & Immunity* 66:2619-2624.

Nethery, K. A., C. K. Doyle, B. L. Elsom, N. K. Herzog, V. L. Popov, and J. W. McBride. 2005. Ankyrin repeat containing immunoreactive 200 kD glycoprotein (gp200) orthologs of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis* are translocated to the nuclei of infected monocytes, p. O-60. In 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Longrono, Spain.

Nethery, K. A., C. K. Doyle, X. Zhang, and J. W. McBride. 2007. *Ehrlichia canis* gp200 contains dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. *Infect. Immun.* 75:4900-4908.

Ohashi, N., N. Zhi, Q. Lin, and Y. Rikihisa. 2002. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infect. Immun.* 70:2128-2138.

Paddock, C. D. and J. E. Childs. 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:37-64..

Popov, V. L., X. J. Yu, and D. H. Walker. 2000. The 120-kDa outer membrane protein of *Ehrlichia chaffeensis*: preferential expression on dense-core cells and gene expression in *Escherichia coli* associated with attachment and entry. *Microb. Path.* 28:71-80..

Rikihisa, Y., S. A. Ewing, J. C. Fox, A. G. Siregar, F. H. Pasaribu, and M. B. Malole. 1992. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J. Clin. Microbiol.* 30:143-148.

Singu, V., H. Liu, C. Cheng, and R. R. Ganta. 2005. *Ehrlichia chaffeensis* expresses macrophage- and tick cell-specific 28-kilodalton outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 73:79-87.

Sumner, J. W., J. E. Childs, and C. D. Paddock. 1999. Molecular cloning and characterization of the *Ehrlichia chaffeensis* variable-length PCR target: an antigen-expressing gene that exhibits

interstrain variation. *J. Clin. Microbiol.* 37:1447-1453.

Vita *et al.*, 1998, "Novel miniproteins engineered by the transfer of active sites to small natural scaffolds." *Biopolymers* 47:93-100.

Weisshoff *et al.*, 1999, "Mimicry of beta II'-turns of proteins in cyclic pentapeptides with one and without D-amino acids." *Eur. J. Biochem.* 259:776-788.

Yabsley, M. J., S. E. Little, E. J. Sims, V. G. Dugan, D. E. Stallknecht, and W. R. Davidson. 2003. Molecular variation in the variable-length PCR target and 120-kilodalton antigen genes of *Ehrlichia chaffeensis* from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Clin. Microbiol.* 41:5202-5206.

Yu, X. J., J. W. McBride, C. M. Diaz, and D. H. Walker. 2000. Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. *J.Clin.Microbiol.* 38:369-374.

Yu, X. J., J. W. McBride, X. F. Zhang, and D. H. Walker. 2000. Characterization of the complete transcriptionally active *Ehrlichia chaffeensis* 28 kDa outer membrane protein multigene family. *Gene* 248:59-68.

Yu, X. J., P. A. Croquet-Valdes, L. C. Cullman, V. L. Popov, and D. H. Walker. 1999. Comparison of *Ehrlichia chaffeensis* recombinant proteins for serologic diagnosis of human monocytotropic ehrlichiosis. *J.Clin.Microbiol.* 37:2568-2575.

Yu, X. J., P. Croquet-Valdes, and D. H. Walker. 1997. Cloning and sequencing of the gene for a 120-kDa immunodominant protein of *Ehrlichia chaffeensis*. *Gene* 184:149-154.

Yu, X. J., P. Croquet-Valdes, L. C. Cullman, and D. H. Walker. 1996. The recombinant 120-kilodalton protein of *Ehrlichia chaffeensis*, a potential diagnostic tool. *J.Clin.Microbiol.* 34:2853-2855.

Yu, X., J. F. Piesman, J. G. Olson, and D. H. Walker. 1997. Short report: geographic distribution of different genetic types of *Ehrlichia chaffeensis*. Am.J Trop.Med Hyg. 56:679-680.

[000375] Embora a presente invenção e suas vantagens tenham sido descritas em detalhes, deve ser compreendido que várias mudanças, substituições e alterações podem ser feitas na mesma sem fugir do espírito e escopo da invenção conforme definido pelas reivindicações em anexo. Além disso, o escopo do presente pedido não é pretendido para estar limitado às concretizações particulares do processo, máquina, fabricação, composição de matéria, meios, métodos e etapas descritas no relatório descritivo. Conforme um versado na técnica apreciará prontamente a partir da descrição da presente invenção, processos, máquinas, fabricação, composições de matéria, meios, métodos, ou etapas, existentes atualmente ou mais tarde, serão desenvolvidos, que realizarão substancialmente a mesma função, ou alcançarão substancialmente o mesmo resultado conforme as concretizações correspondentes aqui descritas podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção. Consequentemente, as reivindicações em anexo são pretendidas para incluírem dentro de seu escopo tais processos, máquinas, fabricação, composições de matéria, meios, métodos ou etapas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de identificação de uma infecção por *E. chaffeensis* em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de ensaiar uma amostra do indivíduo:

(a) usar um polipeptídeo sintético consistindo na sequência de aminoácido de SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:11; ou

(b) detectar um anticorpo que reage imunologicamente com uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nos polipeptídeos de (a).

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o ensaio é por ELISA para o anticorpo de (b).

3. Uso de um ou mais de um polipeptídeo sintético consistindo em uma sequência de aminoácidos selecionada de um grupo consistindo em SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, caracterizado pelo fato de que é para o preparo de uma composição imunogênica para indução de uma resposta imunológica contra infecção por *E. chaffeensis*.

4. Kit, alojado em um recipiente adequado, caracterizado pelo fato de que compreende uma ou mais composições de polipeptídeo compreendendo um ou mais polipeptídeo sintético consistindo em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11.

N (17) MSQFSEDNMGNIQMPFD
R4 (30) SDSHEPSHLELPSLSEEVIQLESIDLQQSSN
R3 (30) SDLHGSFSVELFDPFKEAVQLGNDLQQSSD
R2 (30) SDLHGSFSVELFDPSKEEVQLESIDLQQSSN
R1 (30) SDLHESSFVELPGPSKEEVQFEDDAKNVY
C (61) GQDHVSLSELGLLGGVFSTMNYLSGYTPY
YYHHYCCYNPYYYFDYVTPDYCHHCSESSLE

FIG. 1A

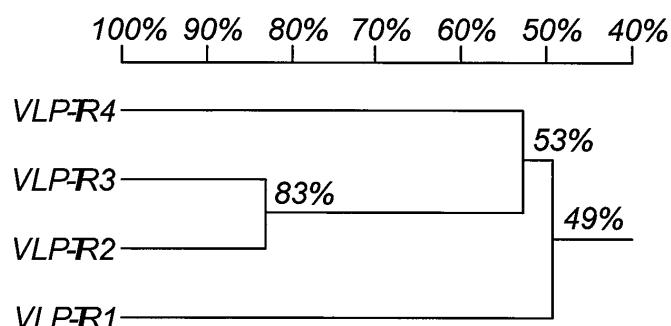


FIG. 1B

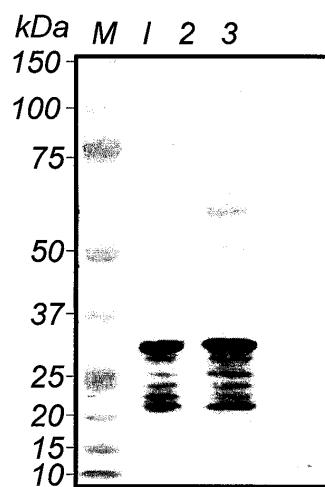


FIG. 2A

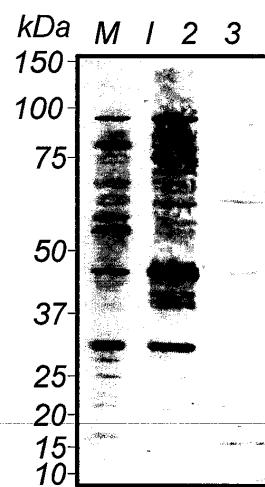


FIG. 2B

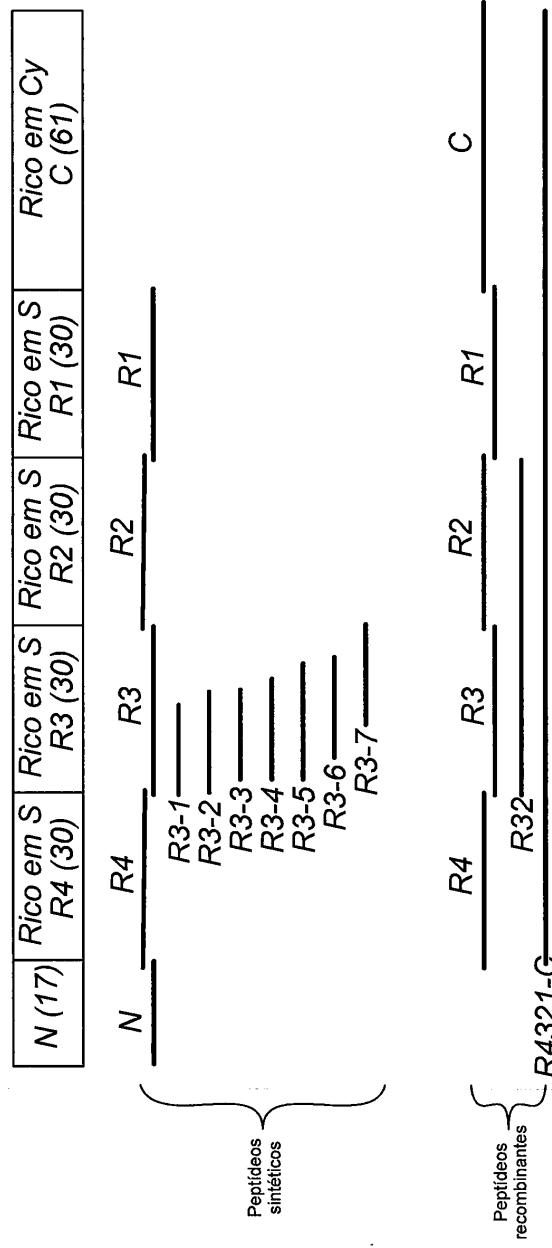


FIG. 3

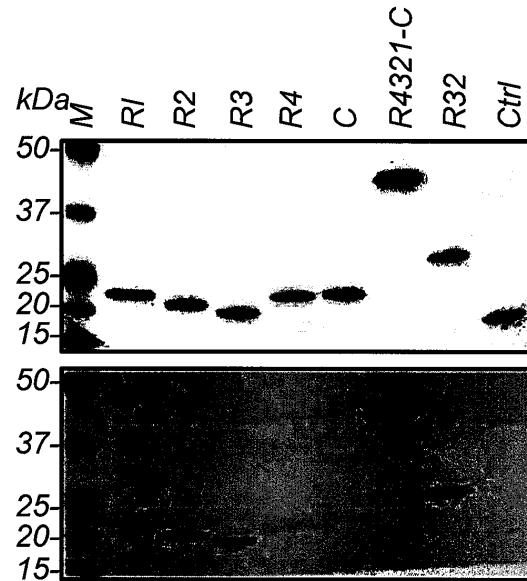


FIG. 4A

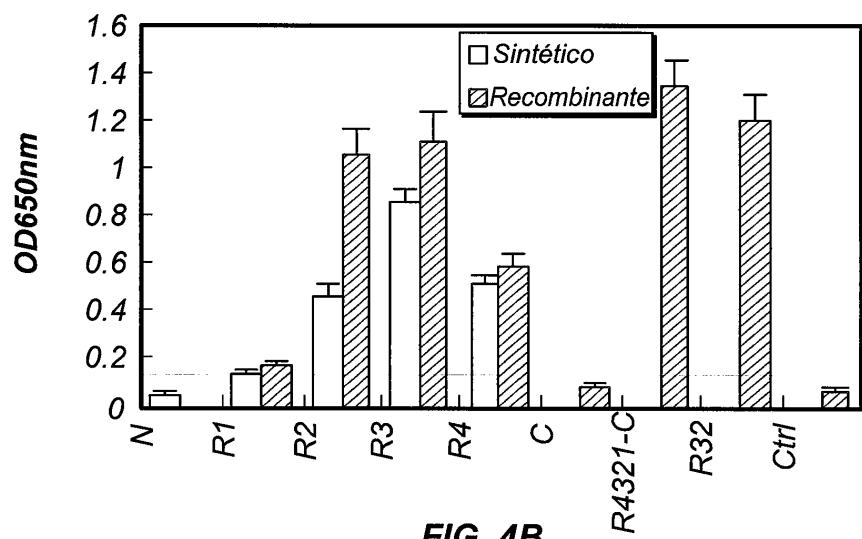


FIG. 4B

R3 (30) **SDLHGSFSVELFDPFKEAVQLGNDLQQSSD**
R3-1 (14) **SDLHGSFSVELFDP**
R3-2 (17) **SDLHGSFSVELFDPFKE**
R3-3 (14) **HGSFSVELFDPFKE**
R3-4 (17) **HGSFSVELFDPFKEAVQ**
R3-5 (20) **HGSFSVELFDPFKEAVQLGN**
R3-6 (16) **VELFDPFKEAVQLGND**
R3-7 (16) **FKEAVQLGNDLQQS**

FIG. 5A

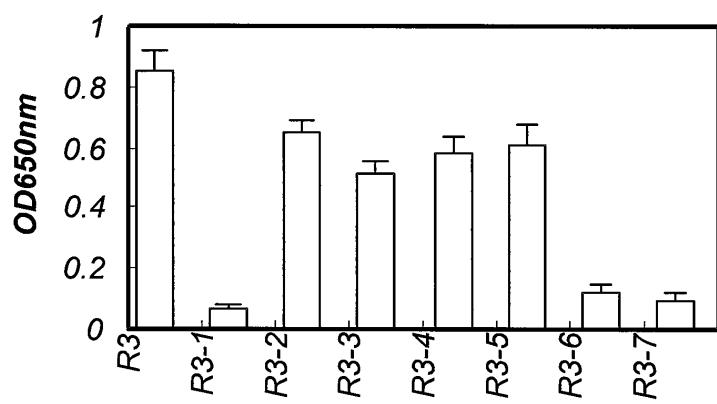


FIG. 5B

6/8

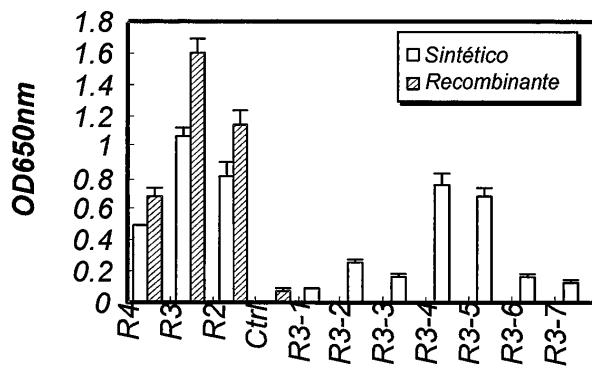


FIG. 6A

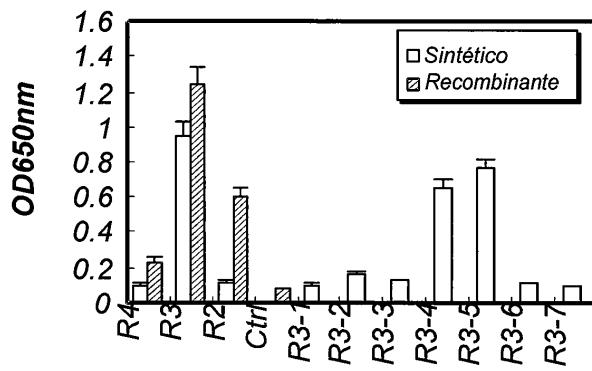


FIG. 6B

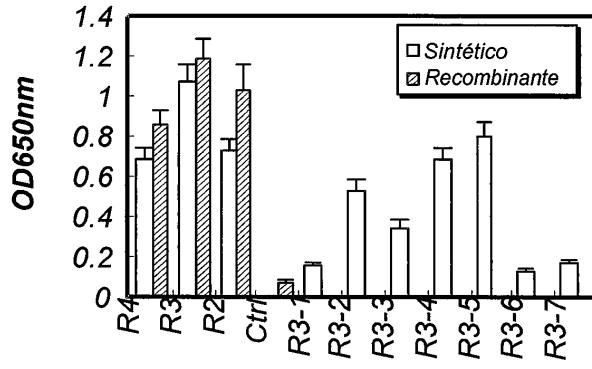


FIG. 6C

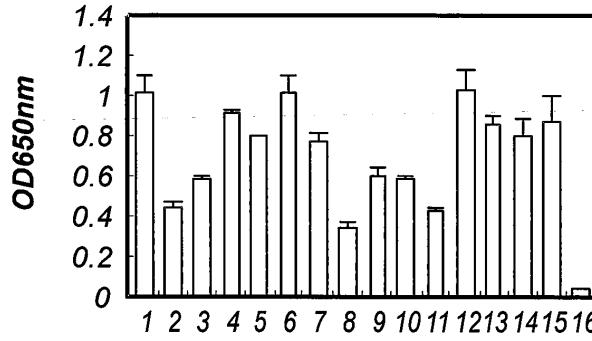


FIG. 6D

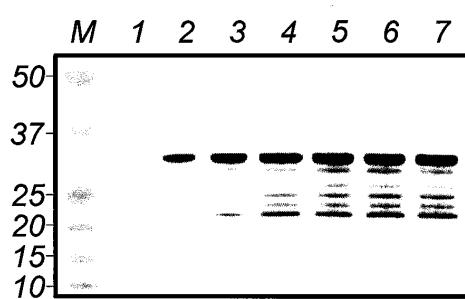


FIG. 7

8/8



FIG. 8A

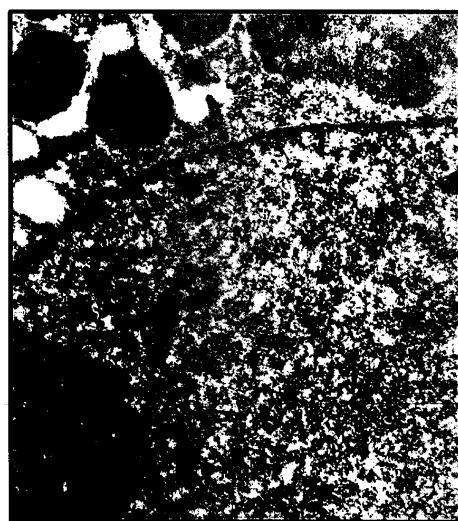


FIG. 8B