(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 397 548**

(51) Int. CI.:

C07K 14/29 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2007 E 07873953 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2064231**

(54) Título: **Glicoproteína inmunorreactiva gp19 de Ehrlichia canis**

(30) Prioridad:

31.08.2006 US 841465 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2013

(73) Titular/es:

RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION (100.0%)
402 NORTH DIVISION STREET
CARSON CITY, NV 89703

(72) Inventor/es:

MCBRIDE, JERE, W. y
DOYLE, CHRISTOPHER, KUYLER

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Glicoproteína inmunorreactiva gp19 de Ehrlichia canis

La presente invención se hizo con aportes del National Institutes of Health R01 AI 071145-01 y 1 P41 RR018502-01. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona al menos con los campos de la biología molecular, biología celular, patología y medicina, incluyendo medicina veterinaria. En otros aspectos, la presente invención se relaciona con composiciones inmunorreactivas de gp19 en *E. canis*.

Antecedentes de la invención

La *Ehrlichia canis* es una bacteria intracelular obligadamente transmitida por garrapatas o piojos que produce enfermedades moderadas a severas y algunas veces fatales en cánidos salvajes y domésticos. Los genomas de *E. canis* y otros organismos del género, incluyendo *E. chaffeensis* y *E. ruminantium*, exigen un alto grado de sintonía genómica, familias proteínicas parálogas, una gran proporción de proteínas con hélices transmembrana y/o otras secuencias de señales, y una desviación única serina-treonina asociada con el potencial para la O-glicosilación y fosforilación, y tienen repeticiones en tándem y los dominios de ankirina en proteínas asociadas con interacciones huésped-patógeno (Collins et al., 2005; Hotopp et al., 2006; Frutos et al., 2006; Mavromatis et al., 2006). Un pequeño subconjunto de más de 900 proteínas codificadas por cada uno de estos genomas es reconocido por anticuerpos (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2003; McBride et al., 2000; Sumner et al., 2000). Varias de las principales proteínas inmunorreactivas identificadas y caracterizadas molecularmente son glicoproteínas ricas en serina que son secretadas. Muchas de estas glicoproteínas tienen repeticiones en tándem; sin embargo, una tiene numerosos dominios de ankirina similares a los de eucariotes (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2003; McBride et al., 2000; Nethery et al., 2005; Singu et al., 2005; Yu et al., 2000).

Se han identificado numerosas proteínas en *E. canis* (n=12) y *E. ruminantium* (n=31) que contiene repeticiones en tándem. De manera notable, se han identificado tres proteínas inmunorreactivas con repeticiones en tándem y se han caracterizado molecularmente en *E. chaffeensis* (gp120, gp47, y VLPT) así como dos ortólogos en *E. canis* (gp140 y gp36, respectivamente). El ortólogo del gen vlpt de *E. chaffeensis* no ha sido identificado en *E. canis* y se ha reportado que este gen no está presente en otros genomas erliquiales (Hotopp et al., 2006). Una variabilidad extensa en el número y/o secuencia de repeticiones en tándem en las proteínas inmunorreactivas de *E. chaffeensis* (gp120, gp47 y VLPT) así como en el gp36 de *E. canis* está bien documentada (Chen et al., 1997; Doyle et al., 2006; Sumner et al., 1999). La presencia de repeticiones en tándem tanto en regiones de codificación como de no codificación de genoma se ha relacionado con un proceso activo de expansión y reducción de los genomas en erliquiales (Frutos et al., 2006) y se considera una fuente principal de cambio e inestabilidad genómicos (Bzymek y Lovett 2001). Adicionalmente, una proteína de 137 aminoácidos de EVLPT de *E. canis* ha sido definida como una proteína de membrana externa principal p19 (uni Prot Database, 2005).

Aunque el VLPT de *E. chaffeensis* es inmunorreactivo, se sabe poco con respecto a su localización celular, función y papel en el desarrollo de inmunidad protectora. El gen vlpt de *E. chaffeensis* exhibe variaciones en el número de repeticiones en tándem de 90 bp (3 a5) y se ha utilizado como objetivo de diagnóstico molecular y para la diferenciación de aislados (Sumner et al., 1999; Yabsley et al., 2003). El VLPT de *E .chaffeensis* Arkansas en una proteína de 198 aminoácidos que tiene cuatro repeticiones (30 aminoácidos) y tiene una masa molecular de aproximadamente el doble de la predicha por su secuencia de aminoácidos (Sumner et al., 1999). La proteína VLPT de *E. chaffeensis* parece tener una modificación postranslacional consistente con otras glicoproteínas erliquiales descritas, pero la presencia de carbohidratos en VLPT no ha sido demostrado.

La presente invención satisface una necesidad en la técnica proveyendo novedosos métodos y composiciones concernientes a las infecciones erliquiales en mamíferos, y en particular provee métodos y composiciones en un ortólogo de *E. canis* de VLPT de *E. chaffeensis*.

Resumen de la invención

La erliquiosis monocítica canina es una enfermedad producida por garrapatas distribuida globalmente causada por la bacteria intracelular obligada *E. canis* y es un modelo útil para entender los mecanismos inmunes y patogénicos de *E. chaffeensis*, el agente causante de la erliquiosis monocitotrópica en humanos. En general, la presente invención se relaciona con composiciones inmunogénicas erliquiales, incluyendo, por ejemplo, antígenos inmunoprotectores tales como vacunas para enfermedades erliquiales, tales como vacunas en subunidades, por ejemplo. La composición

inmunológica puede ser empleada para cualquier mamífero, incluyendo, por ejemplo, humanos, perros, gatos, caballos, cerdos, cabras u ovejas.

En ciertos aspectos de la invención, hay identificación y caracterización de glicoproteína inmunorreactiva (gp19) principal de 19 kDa altamente conservada en *E. canis*, el ortólogo del VLPT de *E. chaffeensis*. La gp19 de *E. canis* carece de repeticiones en tándem presentes en el VLPT de *E*. *chaffeensis*, pero las dos proteínas exhiben una similitud en aminoácidos sustancial (59%) en una región terminal en carboxilo rica en cisteína/tirosina, y ambos genes tienen la misma localización cromosómica relativa. Se detectaron carbohidratos en el gp19 recombinante y se mapeo un epítopo de anticuerpo principal individual en un parche rico en serina/treonina/glutamato (STE). Este epítopo fue sensible al tratamiento con peryodato, y una proteína recombinante de ejemplo fue sustancialmente más inmunorreactiva que un péptido sintético de ejemplo, demostrando un papel para los carbohidratos como inmunodeterminante, en ciertas realizaciones de la invención. El gp19 fue encontrado en ambas células reticuladas y de núcleo denso y también estuvo presente en la matriz extracelular y asociado con la membrana mórula, indicando que la proteína es secretada.

En aspectos específicos de la presente invención, hay composiciones de polipéptido gp19 erliquial (o composiciones de polinucleótidos que codifican todo o parte de ellas con una o más de las siguientes características: 1) comprende una o más unidades estructurales de carbohidrato, los cuales en realizaciones específicas comprenden parte de un determinante epítopo; 2) comprende una o más unidades estructurales, tales como un epítopo, que son inmunológicamente específicas de la especie; 3) se libera extracelularmente, por ejemplo mediante secreción; 4) comprende epítopos principales de células B; 5) se expone en la superficie; 6) está asociado con las formas infecciosas de núcleo denso de Ehrlichiae, tales como la superficie, por ejemplo; y 7) está asociada con membranas mórula (organismos Ehrlichiae de microcolonias dentro de las vacuolas celulares (mórulas) que alojan muchas Ehrlichiae individuales) que comprenden formas de núcleo denso. En aspectos adicionales, las composiciones de polipéptidos recombinantes de la presente invención son capaces de ser glicosiladas en una célula para la cual no son nativas, tales como una célula de *E. coli*, por ejemplo. El polipéptido recombinante puede ser empleado entonces como una composición inmunogénica, incluyendo, por ejemplo, una vacuna.

En realizaciones particulares de la invención, hay composiciones inmunogénicas de gp19 de *E*. *canis* que comprenden una secuencia de aminoácidos que es inmunogénica y en realizaciones particulares adicionales, la inmunogenicidad está caracterizada por ser al menos parte de un epítopo. En realizaciones adicionales, la secuencia de aminoácidos comprende al menos parte de una composición de vacuna contra un organismo erliquial, tal como *E. canis*. La secuencia de aminoácidos puede comprender serinas, treoninas o, opcionalmente, alanina, prolina, valina y/o ácido glutámico. En realizaciones adicionales, la secuencia de aminoácidos es glicosilada. En realizaciones adicionales específicas, la secuencia de aminoácidos comprende parte o todo de la siguiente secuencia de ejemplo: HFTGPTSFEVNLSEEEKMELQEVS (SEQ ID NO: 13). Adicionalmente el epítopo puede comprender aminoácidos adicionales en el terminal C, tales como los que son inmediatamente terminales a C de la secuencia de SEQ ID NO: 13 en el gp19 de origen natural, tal como se ejemplifica por SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. Puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos adicionales en el terminal C de SEQ ID NO: 13. En realizaciones adicionales, la secuencia de aminoácidos está comprendida en un excipiente farmacéuticamente aceptable, el cual en algunos aspectos de la invención comprende un adyuvante. En ciertos aspectos de la invención, hay un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 20 (CATTTTACTGGTCCTACTAGTTTTGAAGTTAATCTTTCTGAAGAAGAAAAAA TGGAGTTACAAGAAGTATCT) que codifica la secuencia de péptidos de SEQ ID NO: 13.

Las secuencias de *E. canis* pueden ser identificadas siguiendo el secuenciamiento de gp19 en otras cepas. Se prueban cepas adicionales de *E. canis*, incluyendo North Carolina (Jake), Oklahoma, North Carolina (Demon), North Carolina (DJ), North Carolina (Fuzzy), Louisiana, Florida, Sao Paulo, Camerún, Israelí y México. En realizaciones adicionales, la secuencia de aminoácidos está comprendida en un excipiente farmacéuticamente aceptable, el cual en algunos aspectos de la invención comprende un adyuvante.

En ciertas realizaciones de la presente invención, hay composiciones inmunogénicas de gp19 de *E. canis*, y secuencias particulares de las composiciones de gp19 pueden impartir su inmunogenicidad. Por ejemplo, una región de la composición de gp19 puede comprender un epítopo. Pueden localizarse uno o más epítopos sobre una composición de gp19 en el terminal C o en el terminal N de un polipéptido de gp19. El terminal C puede comprender los últimos 60 aminoácidos SEQ ID NO: 17 o SEQ IDE NO: 19, por ejemplo. Adicionalmente el terminal C puede comprender los últimos 60 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ IDE NO: 19, y preferiblemente el terminal C puede comprender los últimos 55, los últimos 50, los últimos 45, los últimos 40, los últimos 35, los últimos 30, los últimos 25, los últimos 20, los últimos 15, los últimos 10 o los últimos 5 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. Preferiblemente el terminal C comprende no más de los últimos 60 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, y más preferiblemente el terminal C comprende no más de los últimos 55, los últimos 50, los últimos 45, los últimos 40, los últimos 35, los últimos 30, los últimos 25, los últimos 20, los últimos 15, los últimos 10 o los últimos 5 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. El terminal N puede también comprender los primeros 74 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. El terminal N puede comprender los primeros 74 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, y en particular el terminal N puede comprender los primeros 70, los primeros 65, los primeros 60, los primeros 55, los primeros 50, los primeros 45, los primeros 40, los primeros 35, los primeros 30, los primeros 25, los primeros 20, los primeros 15, los primeros 10 o los primeros 5 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. El terminal N puede comprender no

más que los primeros 74 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, y en particular el terminal N puede comprender no más que los primeros 70, los primeros 65, los primeros 60, los primeros 55, los primeros 50, los primeros 45, los primeros 40, los primeros 35, los primeros 30, los primeros 25, los primeros 20, los primeros 15, los primeros 10 o los primeros 5 aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.

Diferentes cepas múltiples de *E. canis* pueden comprender composiciones de gp19 inmunogénicas, y puede haber una identidad de secuencia significativa entre las cepas en regiones de las composiciones de gp19 que comprenden el epítopo (tales como mayor de aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, o 98%, por ejemplo). Sin embargo, en algunas realizaciones, puede haber una identidad de secuencia significativa entre las cepas de las regiones de las composiciones de gp19 que no comprenden el epítopo. Puede haber una composición de gp19 que es inmunogénica para más de una cepa de *E. canis,* incluyendo por ejemplo, North Carolina (Jake), Oklahoma, North Carolina (Demon), North Carolina (DJ), North Carolina (Fuzzy), Louisiana, Florida, y en particular el epítopo de las otras cepas SEQ ID NO: 13, aunque pueden identificarse también otros epítopos. Cuando un epítopo alternativo de gp19 de *E. canis* de SEQ ID NO: 13 se identifica, puede proveerse una composición inmunogénica que comprende una mezcla de epítopos de gp19 de *E. canis*, tal como una mezcla que incluye SEQ ID NO: 13, por ejemplo.

En ciertas realizaciones de la invención, las composiciones inmunogénicas de *E. canis* comprenden una o más unidades estructurales de carbohidratos. En aspectos particulares, las unidades estructurales de carbohidratos facilitan la naturaleza inmunogénica de la composición. En realizaciones específicas, la unidad estructural carbohidrato se requiere para la inmunogenicidad, mientras que alternativamente la unidad estructural carbohidrato también puede generar inmunogenicidad. La unidad estructural carbohidrato puede ser de cualquier clase, en tanto sea adecuada para permitir o potenciar la inmunogenicidad. La identidad de una unidad estructural carbohidrato puede determinarse por cualquier medio adecuado en la técnica, aunque, en particular, puede utilizarse una enzima que escinda carbohidratos particulares a partir de polipéptidos o péptidos, seguido por análisis de los carbohidratos escindidos, por ejemplo con espectroscopia de masas. En otros medios, el carbohidrato es retirado y probado con una variedad de lecitinas, de las cuales se sabe que se enlazan a azúcares específicos. El carbohidrato puede comprender glucosa, galactosa y/o xilosa. Pueden identificarse una o más unidades estructurales carbohidrato sobre la glicoproteína por métodos adecuados en la técnica, por ejemplo, cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Puede haber una glicoproteína inmunogénica gp19 de *E. canis*. En una realización de la invención, hay una composición que comprende la SEQ ID NO: 13 de *E. canis*. En realizaciones específicas de la invención, la composición comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede ser definida adicionalmente por comprender uno o más unidades estructurales carbohidrato, por comprende parte o todo de un epítopo, y/o como una vacuna, tal como una subunidad de vacuna.

Adicionalmente puede haber una composición de *E. canis* que comprende un polipéptido codificado por al menos parte del polinucleótido de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18 y/o una composición de *E. canis* que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. Puede haber una composición aislada que comprenda una glicoproteína gp19 de *Ehrlichia*, que comprende: (a) una secuencia seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; o (b) una secuencia que es al menos 70% idéntica a una o más secuencias en (a). La composición puede ser definida adicionalmente como una secuencia que es al menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95% idéntica a una o más secuencias en (a). La composición puede ser definida adicionalmente por estar comprendida en un excipiente farmacéuticamente aceptable, por comprender una o más unidades estructurales carbohidrato y/o estar comprendida en una composición farmacéutica adecuada como una vacuna.

Preferiblemente, puede haber un polinucleótido aislado que codifica SEQ ID NO: 17, un polinucleótido aislado que codifica SEQ ID NO: 19, un polinucleótido aislado que codifica SEQ ID NO: 13, o una mezcla de los mismos.

Preferiblemente puede haber un polinucleótido aislado, que comprende: a) un polinucleótido que codifica SEQ ID NO: 17; o b) un polinucleótido que es al menos aproximadamente 90% idéntico al polinucleótido de a) y que codifica un polipéptido gp19 inmunorreactivo de *E. canis*. Preferiblemente el polinucleótido puede definirse adicionalmente como SEQ ID NO: 16.

Adicionalmente puede haber un polinucleótido aislado, que comprende: a) un polinucleótido que codifica SEQ ID NO: 19; o b) un polinucleótido que es al menos 90% idéntico al polinucleótido de a) y que codifica un polipéptido gp19 de *E. canis* inmunorreactivo. Adicionalmente el polinucleótido puede ser definido adicionalmente como SEQ ID NO: 18.

Adicionalmente puede haber un polinucleótido aislado, que comprende: a) un polinucleótido que codifica SEQ ID NO: 17; o b) un polinucleótido que es al menos aproximadamente 90% idéntico al polinucleótido de a) y que codifica un polipéptido gp19 inmunorreactivo de *E. canis*. Preferiblemente, el polinucleótido puede definirse adicionalmente como SEQ ID NO: 16. Adicionalmente puede ser un polinucleótido aislado, que comprende: a) un polinucleótido que codifica SEQ ID NO: 19; o b) un polinucleótido que es al menos aproximadamente 90% idéntico al polinucleótido de a) y que codifica un polipéptido gp19 inmunorreactivo de *E. canis*. Preferiblemente el polinucleótido puede ser definido adicionalmente como SEQ ID NO: 18.

Adicionalmente puede haber un polipéptido aislado que comprende: a) SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 19; o b) un polipéptido de gp19 que es al menos aproximadamente 70% idéntico a SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 19 que comprende actividad inmunogénica. El polipéptido está comprendido en un excipiente farmacéuticamente aceptable, y/o puede ser definido adicionalmente por estar comprendido en una composición farmacéutica adecuada como una vacuna.

Puede haber polinucleótidos que son amplificables por uno o más de los cebadores de ejemplos 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; o SEQ ID NO: 15.

En aspectos específicos de la invención, hay un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 13 y en realizaciones específicas el polinucleótido comprende SEQ ID NO: 20. Alternativamente puede ser un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 20. Alternativamente puede haber un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 19.

En otro aspecto de la invención, hay anticuerpos aislados que enlazan uno o más polipéptidos de la invención. Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo. En realizaciones particulares, el anticuerpo se enlaza selectivamente a un epítopo de gp19, por ejemplo uno que comprende SEQ ID NO: 13. En realizaciones específicas, el anticuerpo puede ser denominado como reaccionante inmunológicamente con uno o más polipéptidos de la invención.

Adicionalmente puede haber un péptido o polipéptido que comprende SEQ ID NO: 13 o tiene una secuencia que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 sustituciones con respecto a SEQ ID NO: 13, y en aspectos específicos las sustituciones son sustituciones conservadoras.

Adicionalmente, la composición de la invención puede ser utilizada en un método que provee resistencia a la infección con *E. canis*, que comprende la etapa de suministrar una cantidad terapéuticamente efectiva y una composición de la invención, tal como un anticuerpo, polipéptido y/o polinucleótido de gp19, al individuo.

Adicionalmente, la composición puede ser utilizada en un método para inducir una respuesta inmune en un individuo, que comprende la etapa de administrar a los individuos una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de gp19 de la invención. Además, el polipéptido, anticuerpo y/o polinucleótido de la presente invención puede ser utilizado en un método para inhibir o prevenir la infección por *E. canis* en un sujeto que comprende las etapas de: identificar un sujeto antes de la exposición o del que se sospecha de estar expuesto a o infectado con *E. canis*; y administrar un polipéptido, anticuerpo y/o polinucleótido de la invención en una cantidad efectiva para inhibir la infección por *E. canis*.

En algunos aspectos de la invención, la composición comprende un polipéptido aislado codificado por un polinucleótido que comprende: (a) un polinucleótido seleccionado del grupo consistente de SEQ ID NO: 20; o (b) un polinucleótido que es capaz de hibridar al polinucleótido de (a) bajo condiciones restrictivas, en donde el polipéptido tiene al menos 75% de identidad con SEQ ID NO: 13 y va de 24 a 50 aminoácidos de longitud. En realizaciones específicas de la invención, el polinucleótido (b) es al menos aproximadamente 70% idéntico, al menos aproximadamente 75% idéntico, al menos aproximadamente 80% idéntico, al menos aproximadamente 85% idéntico, al menos aproximadamente 90% idéntico, o al menos aproximadamente 95% idéntico al polinucleótido de (a) o (b) y codifica un polipéptido gp19 inmunorreactivo de *E. canis*.

Alternativamente, la composición puede ser codificada por un polinucleótido que comprende: (a) un polinucleótido seleccionado del grupo consistente de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20; o (b) un polinucleótido que es al menos aproximadamente 70% idéntico a un polinucleótido de (a) y codifica un polipéptido de gp19 inmunorreactivo de *E. canis*; o (c) un polinucleótido que hibrida a uno o más polinucleótidos de (a) o (b) bajo condiciones restrictivas. En realizaciones específicas de la invención, el polinucleótido de (c) es al menos aproximadamente 70% idéntico, al menos aproximadamente 75% idéntico, al menos aproximadamente 80% idéntico, al menos aproximadamente 85% idéntico, al menos aproximadamente 90% idéntico, o al menos aproximadamente 95% idéntico a un polinucleótido de (a) o (b) y codifica un polipéptido gp19 inmunorreactivo de *E. canis*.

Un polinucleótido aislado de SEQ ID NO: 20; o un polinucleótido que es capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas a dicho polinucleótido y que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 13 y que va de 24 a 50 aminoácidos de longitud, en donde dicha molécula de ácido nucleico está enlazada de manera operativa a un promotor heterólogo.

En realizaciones específicas, se define adicionalmente como un polinucleótido que codifica un polipéptido que es al menos 75%, o al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95% idéntico a SEQ ID NO: 13.

Los polinucleótidos de la invención pueden estar comprendidos en un vector, en particular donde dicho vector es un vector viral o un vector no viral, más en particular en donde el vector viral comprende un vector adenoviral, un vector

retroviral, un vector adenoasociado. Alternativamente, el vector viral puede ser un vector lentiviral, un vector del virus del herpes, o un vector de virus de vacuna, y el vector no viral puede ser un plásmido. En una realización adicional de la invención, el vector comprende un promotor enlazado operativamente al polinucleótido en donde el promotor es operable en una procariota, una eucariota o ambos. El polinucleótido de la invención puede estar comprendido en un liposoma y/o comprendido en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En ciertos aspectos de la invención, hay un anticuerpo aislado que reacciona inmunológicamente a un polipéptido de la invención, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o es un fragmento de anticuerpo. Alternativamente, el anticuerpo puede estar comprendido en antisueros policlonales.

En otras realizaciones, la composición de la invención puede ser utilizada en un método para inducir una respuesta inmune en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la invención, tal como un polipéptido, anticuerpo y/o polinucleótido.

Adicionalmente, puede haber un método para inhibir infección por *E. canis* en un sujeto que comprende las etapas de: identificar un sujeto antes de la exposición o del que se sospecha que está expuesto a o infectado con *E. canis*; y administrar el polipéptido de la invención en una cantidad efectiva para inhibir la infección con *E. canis*. En realizaciones adicionales de la invención, hay un método para identificar una infección por *E. canis* en un individuo, que comprende la etapa de ensayar una muestra del individuo en cuanto a un anticuerpo, polipéptido y/o polinucleótido de la invención.

En una realización de la invención, y una composición farmacéutica, que comprende uno o más de los siguientes: (a) un polipéptido aislado que comprende SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; (b) un polipéptido aislado que es al menos 70% idéntico a un polipéptido de (a); (c) un polipéptido aislado que comprende SEQ ID NO: 13; o (d) un polipéptido aislado que es al menos 70% idéntico a SEQ ID NO: 13, en donde dicho polipéptido se dispersa en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Además, (b) puede ser definido adicionalmente como un polipéptido que es al menos 75% idéntico a un polipéptido de (a); como un polipéptido que es al menos 80% idéntico a un polipéptido (a); como un polipéptido que es al menos 85% idéntico a un polipéptido (a); como un polipéptido que es al menos 90% idéntico a un polipéptido (a); o como un polipéptido que es al menos 95% idéntico a un polipéptido (a). La composición farmacéutica puede ser definida adicionalmente como una composición de vacuna.

En realizaciones específicas, un polipéptido de una composición farmacéutica se define adicionalmente por comprender una o más unidades estructurales carbohidrato. El polipéptido puede comprender SEQ ID NO: 17 o el polipéptido puede comprender SEQ ID NO: 19.

Un polipéptido puede ser definido adicionalmente por tener de 24 a 30 aminoácidos de longitud, de 24 a 35 aminoácidos de longitud, de 24 a 40 aminoácidos de longitud, de 24 a 45 aminoácidos de longitud, de 24 a 50 aminoácidos de longitud, de 24 a 55 aminoácidos de longitud, de 24 a 60 aminoácidos de longitud, de 24 a 65 aminoácidos de longitud, de 24 a 70 aminoácidos de longitud, de 24 a 75 aminoácidos de longitud, de 24 a 80 aminoácidos de longitud, de 24 a 85 aminoácidos de longitud, de 24 a 90 aminoácidos de longitud, de 24 a 95 aminoácidos de longitud, o de 24 a 100 aminoácidos de longitud, por ejemplo.

Pueden definirse variantes de polipéptidos que comprende SEQ ID NO: 13 por ser al menos 80% idénticas a SEQ ID NO: 13; por ser al menos 85% idénticas a SEQ ID NO: 13; por ser al menos 90% idénticas a SEQ ID NO: 13; o por ser al menos 95% idénticas a SEQ ID NO: 13.

Adicionalmente, puede haber una composición farmacéutica que comprende un polipéptido aislado codificado por una molécula aislada de ácido nucleico, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico: (a) un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; o (b) un polinucleótido que es capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas al polinucleótido de (a) en donde el polipéptido tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19 y en donde el polipéptido está dispersado en un diluyente farmacéuticamente aceptable. El polipéptido puede ser al menos 75% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; al menos 80% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; al menos 85% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; o al menos 95% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.

La invención puede relacionarse con una composición, que comprende (a) un polipéptido o péptido aislados que comprenden más de 15, tal como más de 20, tal como más de 23, pero no más de 130 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; o (b) un polipéptido o péptido que son aproximadamente 70% ; aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% o aproximadamente 95% idénticos a una secuencia que no tiene más de 130 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.

Adicionalmente, puede haber un polipéptido definido adicionalmente por ser codificado por un polinucleótido que no tiene más de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18.

En un aspecto, hay una composición que comprende uno o más de los siguientes: (a) un polipéptido aislado que tiene SEQ ID NO: 13 aislado o una parte inmunogénica del mismo, o (b) un polipéptido aislado que es al menos 75% idéntico a SEQ ID NO: 13, y que es un péptido de 24 a 50 aminoácidos de longitud. En una realización específica, el polipéptido de (b) está definido adicionalmente por ser al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% idéntico a SEQ ID NO: 13.

Una composición de la invención puede ser definida por tener actividad que provea inmunidad contra *Ehrlichia canis* para un individuo. Una composición de la invención puede ser definida por tener actividad que induzca una reacción inmune contra *Ehrlichia canis* para un individuo. Las composiciones de la invención incluyen cualquier polipéptido, péptido, polinucleótido, y/o anticuerpo provisto aquí.

Adicionalmente, puede haber una molécula de ácido nucleico aislada, que comprende: (a) un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; o (b) un polinucleótido que es capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas al polinucleótido de (a) y que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, en donde dicha molécula de ácido nucleico esta enlazada de manera operativa a un promotor heterólogo, tal como un promotor que es activo en células eucariotas o que es activo en una célula procariota. Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico puede ser definida adicionalmente como un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 16 o como el polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 18. El polinucleótido de (b) puede ser definido adicionalmente como el polinucleótido que codifica un polipéptido que es al menos 75% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; que es al menos 80% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; que es al menos 85% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; que es al menos 90% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; o que es al menos 95% idéntico a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19.

Adicionalmente, puede haber un ADN aislado, que comprende: (a) una secuencia que es no menor de 75% pero no más de 98% idéntica a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; o (b) una secuencia que es complementaria a la secuencia en (a). (a) puede ser definida adicionalmente como una secuencia que no es menos de 80%, pero no más de 98% idéntica a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; como una secuencia que no es menos de 85% pero no más de 98% idéntica a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; como una secuencia que no es menos de 90% pero no más de 98% idéntica a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; como una secuencia que no es menos de 95% pero no más de 98% idéntica a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; como una secuencia que no es menos de 80% pero no más de 95% idéntica a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; como una secuencia que no es menos de 80% pero no más de 90% idéntica a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; o como una secuencia que es no menos de 80% pero no más de 85% idéntica a SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18:

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser definidas adicionalmente por estar comprendidas en un vector tal como un vector viral o un vector no viral, en donde el vector viral puede comprender un vector adenovírico, un vector retroviral o un vector viral adenoasociado. La molécula de ácido nucleico puede estar comprendida en un liposoma.

En realizaciones específicas, hay un anticuerpo aislado que reacciona inmunológicamente con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. Alternativamente, un anticuerpo aislado puede reaccionar inmunológicamente con una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19. En realizaciones específicas adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, está comprendido en antisueros policlonales, o es un fragmento de anticuerpo. Alternativamente el anticuerpo está comprendido en antisueros policlonales.

En una realización adicional, hay un método para producir un polipéptido que comprende: proveer una célula huésped que comprende un polinucleótido de la invención y cultivar la célula bajo condiciones adecuadas para la célula huésped de manera que exprese el polinucleótido para producir el polipéptido codificado. El método puede comprender adicionalmente aislar el polipéptido.

Adicionalmente, puede haber un método para producir un polinucleótido, que comprende: hibridar SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18 a ADN genómico bajo condiciones restrictivas; y aislar el polinucleótido detectado con SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18. Puede haber un ADN aislado preparado de acuerdo con el método.

En una realización adicional de la invención, hay una composición para uso en un método de inducción de una respuesta inmune en un individuo, que comprende la etapa de suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la invención.

En una realización adicional de la invención, hay una composición para uso en un método para inhibir la infección por *E. canis* en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto antes de la exposición o de sospechar que está expuesto a o infectado con *E. canis*, una cantidad efectiva de una composición de la invención.

En una realización adicional de la invención, hay un método para identificar una infección por *E. canis* en un individuo, que comprende la etapa de ensayar una muestra del individuo para uno o ambos de los siguientes: (a) un polipéptido de

SEQ ID NO: 19; o (b) un anticuerpo que reacciona inmunológicamente con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. Alternativamente, el polipéptido de (a) puede ser SEQ ID NO: 17. Alternativamente, el polipéptido de (a) puede ser SEQ ID NO: 19. Alternativamente, el polipéptido de (a) puede ser una mezcla de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19. Alternativamente, el anticuerpo de (b) puede reaccionar inmunológicamente con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. En realizaciones específicas, la prueba de una muestra para un anticuerpo se define adicionalmente como una prueba para el anticuerpo por ELISA. En particular cuando ELISA permite el ensayo de uno o más anticuerpos de *E. canis* diferentes al anticuerpo de (b) más en particular cuando los otros anticuerpos de *E. canis* son seleccionados del grupo consistente de anticuerpos para gp36, gp19, gp28/30 y gp200.

En una realización de la invención, hay un kit, que comprende una o más de las siguientes composiciones: (a) un polipéptido aislado que comprende SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; (b) un polipéptido aislado que es al menos 70% idéntico al polipéptido de (a); (c) un polipéptido aislado que comprende SEQ ID NO: 13, y que tiene de 24 a 50 aminoácidos de longitud; o (d) un polipéptido aislado que es al menos 70% idéntico a SEQ ID NO: 13; (e) un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; (f) un polinucleótido que es capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas al polinucleótido de (a) y que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; o (g) un anticuerpo aislado que reacciona inmunológicamente con una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente de SEQ ID NO: 13, en donde dicho anticuerpo es monoclonal o es un fragmento de anticuerpo. El kit puede ser definido adicionalmente por comprender dos o más de las composiciones.

Alternativamente, puede haber un kit, que comprende una o más de las siguientes composiciones: (a) un polipéptido aislado que comprende SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; (b) un polipéptido aislado que es al menos 70% idéntico a un polipéptido de (a); (c) un polipéptido aislado que comprende SEQ ID NO: 13; (d) un polipéptido aislado que es al menos 70% idéntico a SEQ ID NO: 13; (e) un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; (f) un polinucleótido que es capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas al polinucleótido de (a) y que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19; o (g) un anticuerpo aislado que reacciona inmunológicamente con una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19.

Lo anterior ha delineado de manera más bien amplia las características y ventajas técnicas de la presente invención con el fin de que la descripción detallada de la invención que sigue pueda ser mejor entendida. Se describirá de aquí en adelante características y ventajas adicionales de la invención las cuales forman el objetivo de las reivindicaciones de esta invención. Será apreciado por los experimentados en la técnica que la concepción y realización específica divulgada puede ser utilizada fácilmente como base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos propósitos de la presente invención. También debe entenderse por los experimentados en la técnica que tales construcciones equivalentes no se separan del espíritu y alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones anexas. Las características novedosas que se consideran características de la invención, tanto en su organización como método de operación, junto con los objetivos y ventajas adicionales serán entendidos mejor a partir de la siguiente descripción cuando se considere en conexión con las figuras acompañantes. Debe entenderse expresamente, sin embargo, que cada una de las figuras se provee para propósitos de ilustración y descripción solamente y no pretenden ser una definición de los límites de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Para un entendimiento más completo de la presente invención, se hace referencia ahora a las siguientes descripciones tomadas en conjunción con los dibujos acompañantes.

La figura 1 provee un esquema de localización cromosómica del gp19 de *E. canis* y genes adyacentes (tamaño en bp) y regiones intergénicas (tamaño en bp). El vlpt de *E. chaffeensis* tiene los mismos genes adyacentes.

La figura 2 se relaciona con proteína de tiofusión de gp19 (panel A), masa molecular de la proteína de tiofusión de pBAD gp19 de *E. canis* (aproximadamente 35 kDa) (línea 1) después de electroforesis en gel con poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE); marcador de peso molecular M-BioRad Precision. (Panel B) Inmunoprecipitación Western correspondiente de la proteína de tiofusión de gp19 recombinante (línea 1) y proteína de control de tiorredoxina (13-kDa) (línea 2) que ha reaccionado con suero de perro anti *E. canis* (#2995).

La figura 3 muestra la detección de carbohidratos de gp19 de *E. canis* (fragmento terminal amino) (línea 2) y proteína Dsb de *E. canis* (línea 1; control negativo). Estándares de proteína M=BioRad Precision; CCM=estándares de peso molecular de glicoproteína CCM=CandyCane que contienen una mezcla de proteínas glicosiladas y no glicosiladas (proteínas glicosiladas 42 y 18-kDa; proteínas no glicosiladas, 29 y 14 kDa).

La figura 4 muestra inmunoprecipitaciones relacionadas con gp19. (Panel A) inmunoprecipitación Western de lisados de célula entera de *E. canis* sondeados con suero de gp19 anti-*E. canis* (línea 1) y suero de perro anti *E. canis* (Línea 2). Los lisados de células DH82 infectadas sondeados con suero de perro anti *E. canis* (línea 3). (Panel B) lisados de

células enteras con *E. chaffeensis* sondeadas con gp19 anti *E. canis* (Línea 1) y suero de perro anti *E. chaffeensis* (línea 2).

La figura 5 provee (parte superior) un esquema de fragmentos de gp19 recombinante de *E. canis* que incluyen la región N1-C que comprende el epítopo. (Panel A) SDS-PAGE de fragmentos de gp19 recombinantes de *E. canis* (N1, línea 1; N2, Línea 2, terminal N, línea 3; y terminal C, línea 4; y control de tiorredoxina) y la inmunoprecipitación Western correspondiente sondeada con un suero de perro anti *E*. *canis* (Panel B).

La figura 6 muestra la inmunorreactividad de gp19 recombinante (epítopo N1-C; glicosilado) con suero canino anti- *E. canis* en comparación con el péptido sintético (aglicosilado) mediante ELISA (parte superior). La inmunorreactividad del gp19 *E. canis* (epítopo N1-C) con suero de perro anti *E.canis* después de tratamiento con peryodato según se determina mediante ELISA (parte inferior).

La figura 7 demuestra una fotomicrografía electrónica de ejemplo inmunomarcada con oro de la localización de gp19 de *E. canis* en mórulas que contienen *Ehrlichiae* tanto reticuladas como de núcleo denso.

La figura 8 muestra una fotomicrografía inmunofluorescente con focal de ejemplo de la expresión de gp19 de *E. canis*. Células de *E. canis* infectadas fueron sometidas s tinción de manera dual con gp19 de anti *E. canis* (rojo; izquierda) y con Dsb antiehrlichial (verde; centro) y se fusionaron las imágenes (derecha).

La figura 9 muestra la demostración de la cinética de las respuestas de anticuerpos de IgG a *E*. *canis* en tres perros infectados experimentalmente (A= perro 33; B= perro 34; y C= perro 44) frente a cinco glicoproteínas recombinantes de gp36 (◊); gp19 (□), gp28 (Δ), gp200N (x), gap 200C (○) y tiorredoxina de control (+) en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 posteriores a la inoculación según se determina mediante inmunoprecipitación Western (izquierda) y la ELISA correspondiente (derecha).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Para mantener la convención de la ley de patentes de larga duración, las palabras “un” y “uno” cuando se utilizan en la presente especificación en concierto con la palabra que comprenden, incluyendo las reivindicaciones, denotan “uno o más”. Algunas realizaciones de la invención pueden consistir o consistir esencialmente de uno o más elementos, etapas de métodos, y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición descritos aquí pueden ser implementados con respecto a cualquier otro método o composición descritos aquí.

El término “carbohidratos” tal como se utiliza aquí se refiere a una composición compuesta de carbono, hidrógeno y oxígeno, particularmente en la relación de 2H: 1C: 10. El término incluye azúcares, almidones y celulosas, por ejemplo. El término “epítopo” tal como se utiliza aquí se refiere a un sitio de una composición en el cual se enlaza un anticuerpo específico.

El término “glicano”, el cual también puede ser denominado como un “polisacárido”, tal como se utiliza aquí se refiere a un carbohidrato que puede ser descompuesto por hidrolisis en dos o más monosacáridos. En otras palabras, puede referirse a una cadena de azúcares sencillos (derivados de aldehído o cetona de un alcohol polihídrico).

El término “identidad” tal como es conocido en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptidos o dos o más moléculas de ácidos nucleicos, determinadas comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de secuencia entre moléculas de ácidos nucleicos o entre polipéptidos, como puede ser el caso, según se determina mediante el número de coincidencias entre hebras de dos o más residuos de nucleótidos o dos o más residuos de aminoácidos. “Identidad” amida el porcentaje de coincidencias idénticas entre las más pequeñas de dos o más secuencias con alineamientos con brechas (si hay alguna) direccionados por un modelo matemático particular o un programa de ordenador (esto es, “algoritmos”).

El término “inmunogénicos” tal como se utiliza aquí se refiere a una composición que es capaz de provocar una respuesta inmune contra él.

El término “respuesta inmune” tal como se utiliza aquí se refiere a la reacción del sistema inmune a la presencia de una antígeno fabricando anticuerpos para el antígeno. La inmunidad al antígeno puede desarrollarse a nivel celular, mediante el cuerpo como un todo, puede desarrollarse hipersensibilidad al antígeno, y/o puede desarrollarse tolerancia, tal como la que surge de una exposición subsecuente. Una respuesta inmune puede generar linfocitos que identifican una molécula antigénica como foránea e inducir la formación de anticuerpos y de linfocitos capaces de reaccionar con ella y hacerla menos nociva.

El término “inmunorreactivos” tal como se utiliza aquí se refiere a una composición que es reactiva con los anticuerpos del suero de un individuo. En realizaciones específicas, una composición es inmunorreactiva si un anticuerpo la reconoce, tal como por enlazamiento a la misma y/o reaccionando inmunológicamente con la misma.

El término “mucina” tal como se utiliza aquí se refiere a una o más glicoproteínas altamente glicosiladas con N-acetilgalactosamida (GaINAc).

El término “ortólogo” tal como se utiliza aquí se refiere a un polinucleótido de una especie que corresponde a un polinucleótido en otra especie. Los dos polinucleótidos están relacionados a través de una especie ancestral común (un polinucleótido homólogo). Sin embargo, el polinucleótido de una especie ha evolucionado para hacerse diferente del polinucleótido de la otra especie.

El término “similitud” es un concepto relacionado, pero en contraste con “identidad”, se refiere a una relación de secuencia que incluye coincidencias idénticas y coincidencias de sustitución conservadora. Si dos secuencias de polipéptidos tiene, por ejemplo, {fracción (10/20)} de aminoácidos idénticos, y el resto son sustituciones no conservativas, entonces el porcentaje de identidad y similitud serán ambos 50%. Si, en el mismo ejemplo, hay 5 posiciones más donde hay sustituciones conservativas, entonces el porcentaje de identidad sigue siendo 50%, pero el porcentaje de similitud será 75% ({fracción (15/20)}). Por lo tanto, en casos donde hay sustituciones conservadoras, el grado de similitud entre los dos polipéptidos será más alto que el porcentaje de identidad entre los dos polipéptidos.

El término “subunidad de vacuna” tal como se utiliza aquí se refiere a una vacuna en donde se emplea un polipéptido o fragmento del mismo, en oposición a un organismo completo.

El término “vacuna” tal como se utiliza aquí, se refiere a una composición que provee inmunidad a un individuo por exposición.

El término “factor de virulencia” tal como se utiliza aquí se refiere a uno o más productos genéticos que permiten que un organismo se establezca a sí mismo en o dentro de una especie huésped particular y potencia su patogenicidad. Factores de virulencia de ejemplo incluyen, por ejemplo, proteínas de la superficie celular que median en el enlazamiento bacteriano, carbohidratos de la superficie celular y proteínas que protegen una bacteria, toxinas bacterianas y enzimas hidrolíticas que contribuyen a la patogenicidad de la bacteria.

La práctica de la reciente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante y así sucesivamente que están dentro de la capacidad de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch, and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition (1989), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M. J. Gait Ed., 1984), ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, Ed., 1987), la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.M. Miller and M.P. Calos eds, 1987), HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (D.M.Weir and 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 and K. Struhl, eds., 1987), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (J.E. coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY; así como monografías en revistas tales como ADVANCES IN IMMUNOLOGY.

II. Realizaciones de la presente invención

La presente invención concierne a composiciones y métodos relacionados con proteínas de *Ehrlichia spp*. y los polinucleótidos que las codifican. Puede haber ortólogos de la proteína inmunorreactiva principal expresados diferencialmente y secretados de *E. canis* y *E. chaffeensis* que disparan respuestas de anticuerpos tempranas a epítopos sobre repeticiones glicosiladas en tándem. Específicamente, la presente invención se relaciona con una o más glicoproteínas de *Ehrlichia spp*, en realizaciones específicas. La presente invención se relaciona con una glicoproteína de *Ehrlichia spp*, que es una proteína gp19. En realizaciones adicionales, la proteína gp19 es de *E. canis*.

La *Ehrlichia canis* tiene un pequeño subconjunto de proteínas inmunorreactivas principales que incluyen una proteína de 19 kDa que dispara una respuesta anticuerpo específica erliquial temprana en perros infectados. La presente invención se relaciona con la identificación y caracterización molecular de esta glicoproteína (gp19) inmunorreactiva principal de 19 kDa altamente conservada ortóloga de la proteína objetivo por PCR de longitud variable (VLPT) de *E. chaffeensis*. La gp19 de *E. canis* tiene un homología sustancial en los aminoácidos de terminal carboxilo (59%) con el VLPT de *E. chaffeensis* y la misma localización cromosómica; sin embargo, el gen de VLPT de *E. chaffeensis* (954-bp) tienen repeticiones en tándem que no están presentes en el gp19 de *E. canis* (414-bp). Consistente con otras glicoproteínas erliquiales, la gp19 exhibe una masa más grande que la predicha (aproximadamente 3 kDa), los sitios de glicosilación con enlazamiento en O fueron predichos en un parche de amino terminal con serina/treonina/glutamato rico en STE (24 aminoácidos), los carbohidratos son detectados en el gp19 recombinante, y los azúcares neutros glucosa y xilosa fueron detectados en la región amino terminal recombinante. La composición de gp19 de *E. canis* comprende cinco

aminoácidos predominantes, cisteína, glutamato, tirosina, serina y treonina, concentrados en el parche rico en STE y dentro de una cola de carboxilo terminal predominada por cisteína y tirosina (55%). El parche rico en STE aminoterminal comprende un epítopo de anticuerpo principal específico para la especie fuertemente reconocido por el suero de un perro infectado con *E. canis*. Un epítopo de glicopéptido recombinante de ejemplo fue sustancialmente más reactivo con el anticuerpo que un péptido sintético de ejemplo (no glicosilado), y el tratamiento con peryodato del epítopo de glicopéptido recombinante redujo su inmunorreactividad, indicando que el carbohidrato es útil como parte de un inmunodeterminante. El gp19 estaba presente sobre células reticuladas y de núcleo denso y se encontró extracelularmente en la matriz fibrilar y asociado con la membrana de las mórulas.

La composición puede ser utilizada en un método para inhibir infección por *E. canis* en un sujeto que comprende las etapas de identificar un sujeto antes de la exposición o del que se sospecha que está expuesto a o infectado con *E. canis* y administrar una composición que comprende un antígeno de 19 kDa de *E. canis* en una cantidad efectiva para inhibir la infección por *E. canis*. La inhibición puede ocurrir a través de cualquier medio tal como, por ejemplo, la estimulación de las respuestas inmunes humorales o celulares del sujeto, o por otros medios tales como la inhibición de la función normal del antígeno de 19 kDa, o incluso compitiendo con el antígeno por interacción con algún agente en el cuerpo del sujeto, o una combinación de ambos de los mismos, por ejemplo.

La presente invención también está dirigida a un compuesto para uso en un método de terapia direccionada en un individuo, que comprende la etapa de administrar un compuesto a un individuo, en donde el compuesto tiene una unidad estructural direccionadora y una unidad estructural terapéutica, y en donde la unidad estructural direccionadora es específica para la proteína gp19. La unidad estructural direccionadora puede ser un anticuerpo específico para gp19 o un ligando o un dominio de enlace de ligando que en la gp19. De la misma forma, la unidad estructural terapéutica puede comprender un radioisótopo, una toxina, un agente quimioterapéutico, un estimulante inmune, un agente citotóxico o un antibiótico, por ejemplo.

La presente invención también se relaciona con el diagnóstico de la infección por *Ehrlichia* en un mamífero probando una muestra de mamífero, tal como sangre o suero, por ejemplo, en cuanto a anticuerpos con una composición de gp19 (para *E. canis*).

III. Composiciones de aminoácidos de gp19 de *E. canis*.

La presente invención se relaciona con un polipéptido o péptido que comprende gp19 de *E. canis*. En aras de la brevedad, la siguiente sección se referirá a las composiciones de aminoácidos de gp19 de *E. canis* de la presente invención, incluyendo polipéptidos y péptidos.

Un polipéptido puede ser un polipéptido recombinante o puede ser aislado y/o purificado a partir de la naturaleza, por ejemplo. En aspectos particulares, la secuencia de aminoácidos es codificada por una secuencia de ácidos nucleicos. El polipéptido es un útil como antígeno, en realizaciones específicas. Un péptido puede ser generado sintéticamente o codificado por un oligonucleótido, por ejemplo. El péptido es útil como un antígeno, en realizaciones específicas.

La presente invención también se dirige hacia un método para producir el polipéptido recombinante, que comprende las etapas de obtener un vector que comprende un constructo de expresión que comprende una secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos enlazada operativamente con un promotor; transfección del vector en una célula; y cultivo de la célula bajo condiciones selectivas para la expresión del constructo de expresión. La secuencia de aminoácidos también puede ser generada sintéticamente.

Por “una proteína sustancialmente pura” se entiende una proteína que ha sido separada de al menos algunos de los componentes que la acompañan de manera natural. Una composición inmunorreactiva sustancialmente pura puede obtenerse, por ejemplo, por extracción de una fuente natural; por expresión de ácidos nucleicos recombinantes que codifica una composición inmunorreactiva; o sintetizando químicamente la proteína, por ejemplo. De acuerdo con lo anterior, las proteínas sustancialmente puras incluyen proteínas sintetizadas en *E. coli* u otros procariotas, o en cualquier otro organismo en el cual no se presenten de manera natural.

Así, en ciertas realizaciones, la presente invención se relaciona con composiciones novedosas que comprenden al menos una molécula proteinácea. Tal como se utiliza aquí, una “molécula proteinácea”, “composición proteinácea”, “compuesto proteináceo”, “cadena proteinácea” o “material proteináceo” generalmente hace referencia, pero no se limita a, una proteína de más de 130 aminoácidos aproximadamente o a la secuencia endógena de longitud completa traducida de un gen; un polipéptido de más de aproximadamente 100 aminoácidos; y un péptido de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos. Todos los términos “proteináceos” descritos aquí pueden ser utilizados de manera intercambiable.

El tamaño de al menos una molécula proteinácea puede comprender, pero no se limita a, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11,

aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29 , aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59, aproximadamente 60, aproximadamente 61, aproximadamente 62, aproximadamente 63, aproximadamente 64, aproximadamente 65, aproximadamente 66, aproximadamente 67, aproximadamente 68, aproximadamente 69, aproximadamente 70, aproximadamente 71, aproximadamente 72, aproximadamente 73, aproximadamente 74, aproximadamente 75, aproximadamente 76, aproximadamente 77, aproximadamente 78, aproximadamente 79, aproximadamente 80, aproximadamente 81, aproximadamente 82, aproximadamente 83, aproximadamente 84, aproximadamente 85, aproximadamente 86, aproximadamente 87, aproximadamente 88, aproximadamente 89, aproximadamente 90, aproximadamente 91, aproximadamente 92, aproximadamente 93, aproximadamente 94, aproximadamente 95, aproximadamente 96, aproximadamente 97, aproximadamente 98, aproximadamente 99, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, o residuos de aminoácidos más grandes, y cualquier rango derivable entre ellos.

Tal como se utiliza aquí, una “molécula de aminoácido” se refiere a cualquier polipéptido, polipéptido derivado o polipéptido mimético que sería reconocible para una persona experimentada en la técnica. Los residuos de la molécula proteinácea pueden ser secuenciales, sin ninguna molécula de aminoácidos que interrumpa la secuencia de residuos de moléculas de aminoácidos. La secuencia también puede comprender una o más unidades estructurales de molécula no aminoácido. La secuencia de residuos de la molécula proteinácea puede ser interrumpida por una o más unidades estructurales de moléculas no amino.

De acuerdo con lo anterior, el término “composición proteinácea” abarca secuencias de aminoácidos que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en proteínas sintetizadas de forma natural, o al menos un aminoácido modificado o inusual, incluyendo pero no limitándose a los mostrados en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Aminoácidos modificados e inusuales

Abreviatura	Aminoácido	Abreviatura	Aminoácido
Aad	Ácido 2-aminoadípico	EtAsn	N-etilaspargina
Baad	Ácido 3-aminoadípico	Hyl	Hidroxilisina
Bala	B-alanina, ácido β-aminopropiónico	AHyl	Alo-hidroxilisina
Abu	Ácido 2-aminobutírico	3Hyp	3-hidroxiprolina
4Abu	Ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico	4Hyp	4-hidroxiprolina
Acp	Ácido 6 aminocaproico	Ide	Isodesmosina
Ahe	Ácido 2-aminoheptanoico	Alle	Alo-isoleucina
Aib	Ácido 2-aminoisobutírico	MeGly	N-metilglicina, sarcosina
Baib	Ácido 3-aminoisobutírico	Melle	N-metilisoleucina
Apm	Ácido 2-aminopimélico	Melys	6-N-metillisina

(continuación)

TABLA 1

Aminoácidos modificados e inusuales

Dbu	Ácido 2,4-diaminobutírico	MeVal	N-metilvalina
Des	Desmosina	Nva	Norvalina
Dpm	Ácido 2,2´-diaminopimélico	Nle	Norleucina
Dpr	Ácido 2,3-diaminopropiónico	Om	Ornitina
EtGly	N-etilglicina		

En ciertas realizaciones la composición proteinácea comprende al menos una proteína, polipéptido o péptido. En realizaciones adicionales, la composición proteinácea comprende una proteína, polipéptido o péptido biocompatible. Tal como se utiliza aquí, el término "biocompatible" se refiere a una sustancia que no produce efectos dirigidos no significativos cuando se aplica a, o se administra a, un organismo dado de acuerdo con los métodos y cantidades descritos aquí. Tales efectos no dirigidos o indeseables son aquellos tales como una toxicidad significativa o reacciones inmunológicas adversas.

Las composiciones proteináceas pueden ser hechas por cualquier técnica conocida para los experimentados en el arte, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas estándar de biología molecular, en aislamiento de compuestos proteináceos a partir de fuentes naturales, o la síntesis química de materiales proteináceos, por ejemplo. La secuencias de nucleótidos y proteínas, polipéptidos y péptidos para diversos genes han sido divulgadas previamente, y pueden ser encontradas en bases de datos computarizadas conocidas para las personas de experiencia normal en el arte. Dos de tales bases de datos son las bases de datos de la National Center Biotechnology Information´s GenBank® y GenPept, por ejemplo. Las regiones de codificación para estos genes conocidos pueden ser amplificadas y/o expresadas utilizando las técnicas divulgadas aquí o como es conocido para las personas experimentadas en la técnica. Alternativamente, diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos son conocidas para los experimentados en el arte.

Una composición proteinácea puede ser purificada. En general, "purificado" se refiere a una composición de proteína, polipéptido o péptido especifica que ha sido sometida a fraccionamiento para eliminar diversas otras proteínas, polipéptidos o péptidos, composición que sustancialmente retiene su actividad, como puede ser establecido, por ejemplo, mediante ensayos de proteína, tales como los que son conocidos para una persona de experiencia normal en la técnica para la proteína, polipéptido o péptidos específicos o deseados. Actividades de ejemplo que pueden ser establecidas para la retención en la composición proteinácea purificada son actividad de enlazamiento a hierro e inmunorreactividad.

Un polipéptido puede ser marcado, y cualquier marcador detectable puede ser utilizado en la invención. El marcador puede estar unido al polipéptido en el terminal N, en el terminal C, o en una cadena lateral de un residuo de aminoácido, por ejemplo. Pueden emplearse uno o más marcadores. Marcadores de ejemplo incluyen marcadores radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores colorimétricos y así sucesivamente. Un marcador puede estar enlazado covalentemente al polipéptido.

IV. Composiciones de ácidos nucleicos de gp19 de E. *canis*

Ciertas realizaciones de la presente invención se relacionan con ácidos nucleicos de gp19 de *E. canis*. En aras de la brevedad, la siguiente sección se referirá a cualquier composición de ácidos nucleicos de gp19 de *E. canis* de la presente invención.

Un ácido nucleico puede comprender un ácido nucleico tipo silvestre o un mutante. Un ácido nucleico puede codificar para o comprende un ácido nucleico transcrito. Un ácido nucleico puede comprender un segmento de ácido nucleico o un equivalente biológicamente funcional del mismo. En aspectos particulares, un ácido nucleico codifica una proteína, polipéptido, péptido.

El término “ácido nucleico” es bien conocido en el arte y puede ser utilizado de manera intercambiable aquí con el término “polinucleótido”. Un “ácido nucleico” tal como se utiliza aquí se referirá en general a una molécula (esto es, una cadena) de ADN, ARN o un derivado o análogo de los mismos, que comprende una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina de origen natural encontrada en ADN (por ejemplo, una adenina “A”, una guanina “G”, una timina “T” o una citosina “C”) o ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo “U” o una C). El término “ácido nucleico” abarca los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido”, cada uno como un subgénero de termino “ácido nucleico”. El término “oligonucleótido” se refiere a una molécula de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 nucleobases de longitud. El término “polinucleótido” se refiere a al menos una molécula de más de aproximadamente 100 nucleobases de longitud.

Estas definiciones se refieren en general a una molécula de cadena sencilla, pueden también abarcar una cadena adicional que sea parcial, sustancial o completamente complementaria a la molécula de cadena sencilla. Así un ácido nucleico puede abarcar una molécula de cadena doble, o una molécula de cadena triple que comprenda una o más cadenas complementarias o “complementos” de una secuencia particular que comprende una molécula. Tal como se utiliza aquí, un ácido nucleico de cadena sencilla puede ser denotado por el prefijo “ss”, un ácido nucleico de doble cadena por el prefijo “ds”, y un ácido nucleico de cadena triple por el prefijo “ts”.

A. Nucleobases

Tal como se utiliza aquí una “nucleobase” se refiere a una base heterocíclica, tal como por ejemplo una nucleobase de origen natural (esto es, una A, T, G, C o U) encontrada en al menos un ácido nucleico de origen natural (esto es, ADN y ARN), y derivados y análogos de origen natural y no natural tales como una nucleobase. Una nucleobase en general puede formar uno o más enlaces de hidrógeno (“templar” o “hibridar”) con al menos una nucleobase de origen natural de manera tal que pueda sustituir un apareamiento de nucleobases de origen natural (por ejemplo, el enlace de hidrógeno entre A y T, G y C y A y U).

Nucleobases de “purina” y/o “pirimidina” abarcan nucleobases de purina y/o pirimidina de origen natural y también derivados y análogos de los mismos, incluyendo pero no limitándose a, aquellos de una purina o pirimidina sustituidos por uno o más de unidades estructurales alquilo, carboxialquilo, amino, hidroxilo, halógeno (esto es flúor, cloro, bromo o yodo), tiol o alquiltiol. Las unidades estructurales preferidas alquilo (por ejemplo, alquilo, carboxialquilo, etc.) comprenden desde aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, hasta aproximadamente 6 átomos de carbono. Otros ejemplos no limitantes de una purina o pirimidina incluyen una deazapurina, una 2,6-diaminopurina, un 5-fluorouracilo, una xantina, una hipoxantina, una 8-bromoguanina, un 8-cloroguanina, una bromotimina, una 8-tosina, una 5-metilciosina, un 5-bromouracilo, un 5-etiluracilo, un 5-iodouracilo, un 5-clorouracilo, un 5-propiluracilo, un tiouracilo, una 2-metiladenina, un metiltioadenina, una N,N-diemetiladenina, una azaadenina, una 8-bromoadenina, una 8-hidroxiadenina, una 6-hidroxiaminopurina, una 6-tiopurina, una 4-(6-aminohexil/citosina), y similares.

Una nucleobase puede estar comprendida en un nucleósido o nucleótido, utilizando cualquier método de síntesis químico o natural descrito aquí o conocido por una persona experimentada en la técnica.

B. Nucleósidos

Tal como se utiliza aquí, un “nucleósido” se refiere a una unidad química individual que comprende una nucleobase enlazada de manera covalente a una unidad estructural enlazante de nucleobase. Un ejemplo no limitante de una “unidad estructural enlazante de nucleobase” es un azúcar que comprende 5 átomos de carbono (esto es, un “azúcar de 5 carbonos”), incluyendo pero no limitándose a desoxirribosa, una ribosa, una arabinosa o un derivado o un análogo de un azúcar de 5 carbonos. Ejemplos no limitantes de un derivado o un análogo de un azúcar de 5 carbonos incluye una 2´-fluor-2´-desoxirribosa o un azúcar carboxílico en donde un carbono es sustituido por un átomo de oxígeno en el anillo del azúcar.

Tipos diferentes de enlaces covalentes de una núcleo base a una unidad estructural enlazante de nucleobase son conocidos en la técnica. A manera de ejemplo no limitante, un nucleósido que comprende una purina (esto es, A o G) o una nucleobase de 7-desazapurina se enlaza típicamente por vía covalente a la posición 9 de una purina o una 7-desazapurina a la posición 1´ de un azúcar de 5 carbonos. En otro ejemplo no limitante, un nucleósido que comprende una nucleobase de pirimidina (esto es, C, T o U) enlaza típicamente de manera covalente la posición 1 de una pirimidina a una posición 1´ de un azúcar de 5 carbonos (Kornberg y Baker, 1992).

C. Nucleótidos

Tal como se utiliza aquí, un “nucleótido” se refiere a un nucleósido que comprende adicionalmente una “unidad estructural de esqueleto”. Una unidad estructural de esqueleto en general enlaza de forma covalente un nucleótido a otra molécula que comprende un nucleótido, o a otro nucleótido para formar un ácido nucleico. La “unidad estructural de esqueleto” en nucleótidos de origen natural comprende típicamente una unidad estructural fósforo, la cual está enlazada

de manera covalente a un azúcar de 5 carbonos. La unión de la unidad estructural de esqueleto se presenta típicamente bien en la posición 3´ o 5´del azúcar de 5 carbonos. Sin embargo, se conoce en la técnica otros tipos de enlaces, particularmente cuando un nucleótido comprende derivados o análogos de un azúcar de 5 carbonos o una unidad estructural fósforo de origen natural.

D. Análogos de ácidos nucleicos

Un ácido nucleico puede comprender, o estar compuesto completamente, de un derivado o análogo de una nucleobase, una unidad estructural enlazante de nucleobase y/o una unidad estructural de esqueleto que puede estar presente en un ácido nucleico de origen natural. Tal como se utiliza aquí un “derivado” se refiere a una forma modificada o alterada químicamente de una molécula de origen natural, mientras que el término “imitador” o “análogo” se refiere a una molécula que puede o no recordar estructuralmente a una molécula o unidad estructural de origen natural, pero que posee funciones similares. Tal como se utiliza aquí, una “unidad estructural” se refiere en general a un componente químico o molecular más pequeño de una estructura química o molecular más grande. Análogos o derivados de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos son bien conocidos en la técnica, y ya han sido descritos (véase, por ejemplo, Scheit, 1980).

Ejemplos adicionales no limitantes de nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos que comprenden azúcares de 5 carbonos y/o derivados o análogos de unidades estructurales de esqueleto incluyen los de la Patente de los Estados Unidos No. 5,681,947 la cual describe oligonucleótidos que comprenden derivados de purina que forman hélices triples y/o evitan la expresión de ADNds; las Patentes de los Estados Unidos No. 5,652,099 y 5,763,167 las cuales describen ácidos nucleicos que incorporan análogos fluorescentes de nucleósidos encontrados en ADN o ARN, particularmente para uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; la Patente de los Estados Unidos 5,614,617 la cual describe análogos de oligonucleótidos con sustituciones sobre anillos de pirimidina que poseen estabilidad potenciada a la nucleasa; las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,670,663, 5,872,232 y 5,859,221 que describe análogos de oligonucleótidos con azúcares modificados de 5 carbonos (por ejemplo, unidades estructurales 2´-desoxifuranosilo modificadas) usadas en la detección de ácidos nucleicos; la Patente de los Estados Unidos 5,446,137 que describe oligonucleótidos que comprenden al menos una unidad estructural de azúcar de 5 carbonos sustituida en la posición 4´con un sustituyente diferente a hidrógeno que puede ser utilizada en ensayos de hibridación; la Patente de los Estados Unidos 5,886,165 que describe oligonucleótidos con desoxirribonucleótidos con enlaces internucleótidos 3´-5´en donde un oxígeno en la posición 3´ del enlace internucleótido es reemplazado por un carbono para potenciar la resistencia a la nucleasa de los ácidos nucleicos; la Patente de los Estados Unidos 5,672,697 que describe oligonucleótidos que contienen uno o más enlaces internucleótidos de fosfato de metileno en 5´que potencia la resistencia a la nucleasa; las Patentes de los Estados Unidos 5,466,786 y 5,792,847 que describe el enlace de una unidad estructural sustituyente que puede comprender un fármaco o marcador al carbono 2´de un oligonucleótido para proveer una estabilidad incrementada a la nucleasa y capacidad para suministrar fármacos o detectar unidades estructurales; la Patente de los Estados Unidos 5,223,618 la cual describe análogos de oligonucleótidos con un enlace de esqueleto de 2 o 3 carbonos que enlaza la posición 4´y la posición 3´de la unidad estructural de azúcar de 5 carbonos adyacente para potenciar el consumo celular, la resistencia a las nucleasas y la hibridación al ARN objetivo; la Patente de los Estados Unidos 5,470,967, la cual describe oligonucleótidos que comprenden al menos un enlace internucleótidos de sulfamato o sulfamida que son útiles como sondas de hibridación para ácidos nucleicos; las Patentes de los Estados Unidos 5,378,825, 5,777,092, 5,623,070, 5, 610,289 y 5,602,240 las cuales describen oligonucleótidos con 3 o 4 unidades estructurales enlazantes de átomos que reemplazan la unidad estructural de esqueleto fosfodiéster utilizados para mejorar la resistencia a la nucleasa, el consumo celular y la regulación de la expresión de ARN; la Patente de los Estados Unidos 5,858,988 la cual describe un agente portador hidrófobo enlazado a la posición 2´-O de los oligonucleótidos para potenciar su permeabilidad de membrana y estabilidad; la Patente de los Estados Unidos 5,214,136 la cual describe oligonucleótidos conjugados con antraquinona en el terminal 5´que poseen hibridación potenciada a ADN o ARN; estabilidad potenciada de las nucleasas; la Patente de los Estados Unidos 5,700,922 que describe quimeras APN, ADN, APN en donde el ADN comprende 2 nucleótidos de 2´-desoxi-eritropentofuranosilo para resistencia potenciada a la nucleasa, afinidad de enlazamiento y capacidad para activar la RNasa H; y la Patente de los Estados Unidos 5,708,154 que describe ARN enlazado a ADN para formar un híbrido ADN-ARN.

E. Ácidos nucleicos de poliéteres y péptidos

Se contempla que un ácido nucleico que comprende un derivado o análogo de un nucleósido o nucleótido puede ser utilizado en los métodos y composiciones de la invención. Un ejemplo no limitante es un “ácido nucleico poliéter” descrito en la Patente de los Estados Unidos Serie No. 5, 908,845. En un ácido nucleico poliéter, una o más nucleobases están enlazadas a átomos de carbono quirales en un esqueleto de poliéter.

Otro ejemplo no limitante es un “ácido nucleico péptidico”, también conocido como “APN”, “un análogo de ácido nucleico basado en péptidos” o un “PENAM”, descrito en la Patente de los Estados Unidos Serie No. 5,786,461, 5,891,625, 5,773,571, 5,766,855, 5,736,336, 5,719,262, 5,714,331, 5,539,082 y WO 92/2070. Los ácido nucleicos peptídicos tienen en general especificidad a la secuencia, propiedades de enlazamiento y resistencia a degradación enzimáticas potenciadas en comparación con las moléculas tales como ADN y ARN (Egholin et al., 1993; PCT/EP/01219). Un ácido

nucleico péptidico en general comprende uno o más nucleótidos o nucleósidos que comprenden una unidad estructural de nucleobase, una unidad estructural enlazante de nucleobase que no es un azúcar de 5 carbonos, y/o una unidad estructural de esqueleto que no es una unidad estructural de esqueleto de fosfato. Ejemplos de unidades estructurales de nucleobases para APN incluyen átomos de nitrógeno aza, amido y/o ureido éteres (véase por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5, 539,082). Ejemplos de unidades estructurales descritas para APN incluyen una unidad estructural de esqueleto de aminoetilglicina, poliamida, polietilo, politiloamida, polisulfamida o polisulfonamida.

Un análogo de ácido nucleico tal como un ácido nucleico peptídico puede ser utilizado para inhibir la amplificación de ácidos nucleicos, tal como en PCR, para reducir falsos positivos y discriminar entre bases individuales mutantes, tal como lo describe la Patente de los Estados Unidos Serie No. 5, 891,625. Otras modificaciones y usos de los análogos de los ácidos nucleicos son conocidos en el arte, y son abarcados por el polinucleótido gp36. En un ejemplo no limitante, la Patente de los Estados Unidos 5, 786,461 describe APNs con cadenas laterales de aminoácidos enlazadas al esqueleto de APN para potenciar la solubilidad de la molécula. En otro ejemplo, la propiedad de consumo celular de APN es incrementada enlazando un grupo lipofílico. La solicitud de los Estados Unidos Serie No. 117,363 describe varias unidades estructurales alquilamino utilizadas para potenciar el consumo celular de APN. Otro ejemplo se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,766,855, 5,719,262, 5,714,331 y 5,736,336, los cuales describen APNs que comprenden nucleobases y cadenas laterales de alquilamina de origen natural y no natural que proveen mejoras en especificidad a secuencia, solubilidad y/o afinidad de enlazamiento relativas a un ácido nucleico de origen natural.

F. Preparación de ácidos nucleicos

Un ácido nucleico puede ser hecho mediante cualquier técnica conocida para una persona de habilidad normal en la técnica, tal como por ejemplo síntesis química, producción enzimática o producción bilógica. Ejemplos no limitantes de un ácido nucleico sintético (por ejemplo un oligonucleótido sintético), incluye un ácido nucleico hecho por síntesis química in vitro utilizando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas en fase sólida tales como las descritas en EP 266,032 o a través de intermediarios de desoxinucleósido H-fosfonato tal como lo describe Froehler et al., 1986, y la Patente de los Estados Unidos Serie No. 5, 705,629. En los métodos de la presente invención, pueden usarse uno o más oligonucleótidos. Se han divulgado diversos mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos por ejemplo en, las Patentes de los Estados Unidos 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.

Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido enzimáticamente incluye uno producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR™ (véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 4,683,202 y la Patente de los Estados Unidos 4,682,195), con la síntesis de un oligonucleótido descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,645,897. Un ejemplo no limitante de ácido nucleico producido biológicamente incluye un ácido nucleico recombinante producido (esto es replicado) en una célula viva, tal como un vector de ADN recombinante replicado en bacterias (véase por ejemplo, Sambrook et al., 1989).

G. Purificación de ácidos nucleicos

Un ácido nucleico puede ser purificado sobre geles de acrilamida gradientes de centrifugación con cloruro de cesio, o por cualquier otro método conocido para una persona de habilidad normal en el arte (véase por ejemplo, Sambrook et al., 1989).

En cierto aspecto, la presente invención se relaciona con un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado. Tal como se usa aquí, el término “ácido nucleico aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN o ADN) que ha sido aislada libre de, o que de alguna otra manera está libre de, el volumen de los ácidos nucleicos genómicos y transcritos totales de una o más células. En ciertas realizaciones, “ácido nucleico aislado” se refiere a un ácido nucleico que ha sido aislado libre de, o de alguna manera está libre de, componentes globales celulares o de componentes de reacciones in vitro tales como por ejemplo, macromoléculas tales como lípidos o proteínas, moléculas biológicas pequeñas, y similares.

H. Segmentos de ácidos nucleicos

El ácido nucleico puede ser un segmento de ácido nucleico. Tal como se utiliza aquí, el término “segmento de ácido nucleico” se refiere a fragmentos más pequeños de un ácido nucleico, tales como por ejemplo no limitante, aquellos que codifican solamente parte de la secuencia del péptido o polipéptido. Así, un “segmento de ácido nucleico” puede comprender cualquier parte de una secuencia de genes, de desde aproximadamente 2 nucleótidos hasta la longitud completa de la región codificadora del péptido o polipéptido.

Diversos segmentos de ácidos nucleicos pueden ser diseñados con base en una secuencia particular de ácido nucleico, y puede ser de cualquier longitud. Al asignar valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer residuo es 1, el segundo residuo es 2, etc., generándose un algoritmo que puede definir todos los segmentos de ácidos nucleicos:

n a n + y

donde n es un entero de 1 hasta el último número de la secuencia y y es la longitud del segmento de ácido nucleico menos 1, en donde n + y no excede el último número de la secuencia. Así, para un 10-mero, los segmentos de ácidos nucleicos corresponden a las bases de 1 a 10, 2 a 11, 3 a 12 y así sucesivamente. Para un 15-mero, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases 1 a 15, 2 a 16, 3 a 17, y así sucesivamente. Para un 20-mero, los segmentos nucleicos corresponden a las bases de 1 a 20, 2 a 21, 3 a 22 y así sucesivamente. El segmento de ácidos nucleicos puede ser una sonda o cebador. Tal como se utiliza aquí, una “sonda” se refiere en general a un ácido nucleico usado en un método de detección o composición. Tal como se utiliza aquí, un “cebador” se refiere en general a un ácido nucleico usado en un método de extensión amplificación o composición.

I. Complementos de ácidos nucleicos

La presente invención también abarca un ácido nucleico que es complementario a uno o más otros ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser empleado para propósitos de antisentido o ARNsi, tales como inhibir al menos parcialmente la expresión de un polinucleótido.

En realizaciones particulares la invención abarca un ácido nucleico con segmento de ácido nucleico complementario a la secuencia aquí definida, por ejemplo. Un ácido nucleico es “complemento” o es “complementario” a otro ácido nucleico cuando es capaz de aparear bases con otro ácido nucleico de acuerdo con las reglas estándar de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen reverso de complementariedad de enlazamiento. Tal como se utiliza aquí “otro ácido nucleico” puede referirse a una molécula separada o a una secuencia espacial separada de la misma molécula.

Tal como se utiliza aquí, el término “complementario” o “complemento” también se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleobases consecutivas o nucleobases semiconsecutivas (por ejemplo una o más unidades estructurales de nucleobases no están presentes en la molécula) capaces de hibridar a otra cadena de ácido nucleico o dúplex incluso y menos de todas las nucleobases no aparean la base con una nucleobase de contraparte. Un ácido nucleico “complementario” puede comprender una secuencia en la cual aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, a aproximadamente 100%, y cualquier rango derivable de los mismos, de la secuencia de nucleobases es capaz de aparear bases con una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble durante la hibridación. El término “complementario” se puede referir a un ácido nucleico que puede hibridar a otra cadena de ácido nucleico o dúplex en condiciones restrictivas, como lo entenderá una persona de experiencia normal en el arte.

Un ácido nucleico “parcialmente complementario” puede comprender una secuencia que puede hibridar en condiciones de baja restricción a un ácido nucleico de cadena sencilla o doble, y contiene una secuencia en la cual menos de aproximadamente 70% de la secuencia de nucleobase es capaz de aparear bases con una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble durante la hibridación.

J. Hibridación

Tal como se utiliza aquí, “hibridación”, “hibridiza” o “capaz de hibridar” se entiende con el significado de formar una molécula de doble o triple cadena a una molécula con naturaleza de doble o triple cadena parcial. El término “templar” tal como se utiliza aquí es sinónimo de “hibridar”. El término “hibridación”, “hibridiza” o “capaz de hibridar” abarca los términos condiciones restrictivas “alta restricción” y los términos “baja restricción” o “condiciones de baja restricción”.

Tal como se utiliza aquí “condiciones restrictivas” o “alta restricción” son aquellas condiciones que permiten hibridación entre o dentro de una o más cadenas de ácidos nucleicos que contienen secuencias complementarias, pero que evitan la hibridación de secuencias aleatorias. Las condiciones restrictivas toleran pocos, si es que los hay, errores entre un ácido nucleico y una cadena objetivo. Tales condiciones son bien conocidas para las personas de habilidad ordinaria en el arte, y son preferidas para aplicaciones que requieren alta selectividad. Las aplicaciones no limitantes incluyen aislar un ácido nucleico, tal como un gen o un segmento de un ácido nucleico del mismo, o detectar al menos un transcripto de ARNm específico o un segmento de ácido nucleico del mismo , y similares.

Las condiciones restrictivas pueden comprender condiciones de baja sal y/o alta temperatura, tal como las provistas por NaCl 0.02 M hasta aproximadamente 0.15 M, por ejemplo, a temperaturas de aproximadamente 50ºC hasta aproximadamente 70ºC o, por ejemplo, cuando dichas condiciones restrictivas son hibridación a 50 – 65 ºC, 5X SSPC, formamida al 50%; lavado 50-65ºC, 5X SSPC; o lavado a 60ºC, 0.5X SSC, 0.1% SDS. Se entiende que la temperatura y la fuerza iónica de una restricción deseada están determinadas en parte por la longitud de los ácido nucleicos

particulares, y la longitud y contenido de nucleobases de la secuencia objetivo, la composición de carga de los ácido nucleicos, y la presencia o concentración de formamida, cloruro de tetrametilamonio u otros solventes en una mezcla de hibridación.

También se entiende que estos rangos, composiciones y condiciones para hibridación se mencionan a manera de ejemplo no limitante solamente, y que la restricción deseada para una reacción particular de hibridación es determinada frecuentemente de manera empírica por comparación con uno o más controles positivos o negativos. Teniendo la aplicación prevista se prefiere emplear condiciones variables de hibridación para alcanzar grados variables de selectividad de un ácido nucleico a través de una secuencia objetivo. En un ejemplo no limitante, la identificación o aislamiento de un ácido nucleico objetivo relacionado que no hibrida a un ácido nucleico bajo condiciones restrictivas puede lograrse por hibridación a baja temperatura y/o alta fuerza iónica. Tales condiciones son denominadas “baja restricción” o “condiciones de baja restricción”, y ejemplos no limitantes de baja restricción incluyen hibridación realizada con NaCl a aproximadamente 0.15 M hasta aproximadamente 0.9 M a un rango de temperatura de aproximadamente 20ºC hasta aproximadamente 50ºC. Desde luego, está dentro de la habilidad de una persona en el arte modificar adicionalmente las condiciones de baja o alta restricción para ajustarse a una aplicación particular.

V. Sistemas de expresión basados en ácidos nucleicos

En realizaciones particulares, la presente invención se relaciona con un polinucleótido que codifica un polipéptido inmunorreactivo de *Ehrlichia*, y también incluye administrar el polinucleótido que codifica el polipéptido, o el producto codificado del mismo, a un individuo que así lo requiere, tal como un individuo infectado con *Ehrlichia* y/o un individuo susceptible de ser infectado con *Ehrlichia*. En aras de la brevedad, la siguiente sección se referirá a cualquier composición de ácido nucleico de gp19 de *E. canis* y/o sistema de expresión basado en ácidos nucleicos de la presente invención.

La presente invención está dirigida hacia una secuencia de ADN sustancialmente pura y/o aislada que codifica una composición de *Ehrlichia* inmunorreactiva. En general, la proteína codificada comprende una secuencia terminal N, la cual puede ser escindida después de la modificación postraslacional resultante en la producción de proteína madura.

Es bien conocida en la técnica que debido a la degeneración del código genético (esto es, para la mayoría de los aminoácidos, más de un triplete de nucleótidos (codón) codifica para un aminoácido individual), diferentes secuencias de nucleótidos pueden codificar por un aminoácido particular o polipéptido. Así, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención incluyen cualquiera de las secuencias de ejemplo o una variante degenerada de tal secuencia, por ejemplo. Adicionalmente una variante degenerada puede comprender una secuencia que no es idéntica a una secuencia de la invención pero que aún retiene una o más propiedades de una secuencia de la invención.

Tal como se utiliza aquí, “ADN sustancialmente puro” significa ADN que no es parte de un medio en el cual el ADN se presenta de manera natural, en virtud de la separación (purificación parcial o total) de alguna o todas las moléculas de ese medio, o en virtud de la alteración de la secuencias que flanquean el ADN buscado. El término incluye por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante el cual es incorporado en un vector, en un plásmido virus autónomamente replicante, o en el ADN genómico de una procariota o eucariota; o que existe como molécula separada (por ejemplo, un ADNc, o un fragmento genómico o de ADNc producido por reacción en cadena con polimerasa (PCR) o digestión con una endonucleasa de restricción) independientemente de otras secuencias. Esto también incluye un ADN recombinante el cual es parte de un gen híbrido que codifica secuencias adicionales de polipéptidos, por ejemplo, una proteína de fusión.

La presente invención está dirigida adicionalmente a un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una composición inmunorreactiva de *Ehrlichia* y que es capaz de expresar el polinucleótido cuando el vector es introducido en una célula. El vector puede comprender un enlace operable a los siguientes: a) un origen de la replicación; b) un promotor; y c) una secuencia de ADN que codifica para la proteína.

Tal como se utiliza aquí “vector” puede definirse como un constructo de ácido nucleico replicable, por ejemplo, un plásmido o un ácido nucleico viral. Los vectores pueden ser usados para amplificar y/o expresar ácidos nucleicos que codifican una composición inmunorreactiva de *Ehrlichia*. Un vector de expresión es un constructo replicable en el cual una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido esta enlazado operativamente a secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión del polipéptido en una célula. En la necesidad para tales secuencias de control variará dependiendo de la célula seleccionada y del método de transformación escogido. En general, la secuencia de control incluye un promotor y/o potenciador transcripcional, sitios de enlazamiento ribosómicos de ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción, por ejemplo. Son bien conocidos los métodos para los experimentados en la técnica que pueden ser utilizados para construir vectores de expresión que comprenden señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Véase por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Press, N.Y. Una frecuencia de polinucleótidos que se expresa y sus secuencias de control de transcripción se definen como “enlazadas operativamente” si las secuencias de control de transcripción controlan efectivamente la transcripción de las secuencias de polinucleótidos. Vectores de la invención incluyen, pero no se limitan a, vectores plásmidos y vectores virales. Los

vectores virales preferidos de la invención son los derivados de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus SV40, virus de herpes, por ejemplo.

En general, los vectores de expresión comprenden secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficiente del polinucleótido que se va a expresar, cuando se usan en relación con una célula huésped. Tal como se utiliza aquí, el término "huésped" pretende incluir no solamente células procariotas sino también eucariotas, tales como levaduras, plantas y animales. Un polinucleótido recombinante que codifica una composición inmunorreactiva de *Ehrlichia* de la presente invención puede ser utilizado para transformar un huésped usando cualquiera de las técnicas conocidas comúnmente por los experimentados en la técnica. Los huéspedes procarióticos pueden incluir *E. coli*, S*. tymphimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Huéspedes eucarióticos incluyen levaduras, tales como *Pichia pastoris*, células de mamíferos y células de insectos.

La siguiente descripción se relaciona con elementos, reactivos y métodos de ejemplo para administración de polinucleótidos y ácidos nucleicos de un polinucleótido de *Ehrlichia*.

A. Vectores

El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la cual una secuencia de ácido nucleico puede ser insertada para la introducción en unas células donde puede ser replicada. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo cual significa que es extraña a la célula en la cual el vector está siendo introducido o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la cual la secuencia no se encuentra ordinariamente. Vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus de plantas), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YACs). Una persona experimentada en el arte estará equipada para construir un vector a través de técnicas estándar de recombinación (véase, por ejemplo, Maniatis et al., 1988 y Ausubel et al., 1994).

El término "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de constructo genético que comprende un ácido nucleico que codifica para un ARN capaz de ser transcrito. En algunos casos, las moléculas de ARN son traducidas entonces en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no son traducidas, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", las cuales se refieren a secuencias de ácidos nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia de codificación enlazada operativamente en la célula huésped particular. Además para controlar secuencias que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que sirven para otras funciones así como las que se describen infra.

1. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la cual se controlan la iniciación y rata de transcripción. Puede contener elementos genéticos en los cuales puede enlazarse proteínas y moléculas reguladoras, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las frases "posicionado operativamente", "enlazado operativamente", "bajo control", y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una localización y/o orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácidos nucleicos para controlar la iniciación transcripcional y/o la expresión de esa secuencia.

Un promotor comprende generar una secuencia que funciona para posicionar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo mejor conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tal como por ejemplo, el promotor para el gen de mamíferos de desoxinucleotidil transferasa terminal y el promotor para los genes tardíos SV40, un elemento discreto que se sobrepone al sitio de inicio mismo ayuda a fijar el sitio de iniciación. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de la iniciación transcripcional. Típicamente, están localizados en la región 30 110 bp corriente arriba del sitio de inicio, aunque un cierto número de promotores han mostrado contener elementos funcionales corriente abajo del sitio de inicio. Para llevar una secuencia de codificación "bajo el control de" un promotor, se posiciona el extremo 5´del sitio de iniciación de transcripción del marco de lectura transcripcional "corriente abajo" de el promotor escogido (esto es 3´de). El promotor "corriente arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

El espaciamiento entre los elementos del promotor frecuentemente es flexible, de tal forma que se preserva la forma función promotora cuando los elementos son invertidos o movidos con respecto uno a otro. En el promotor tk, el espaciamiento entre los elementos del promotor puede ser incrementado hasta 50 bp de separación antes de que la actividad comience a declinar. Dependiendo del promotor, parece que elementos individuales pueden funcionar bien sea de manera cooperativa o independientemente para activar la transcripción. Un promotor puede o puede no ser usado con un "potenciador" lo que se refiere a una secuencia reguladora en actuación cis involucrada en la activación transcripcional de una secuencia de ácidos nucleicos.

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural, con una secuencia de ácido nucleico, tal como puede ser obtenido aislando las secuencias que no codifican en 5´localizadas corriente arriba del segmento de codificación y/o exón. Tal promotor puede denominarse como “endógeno”. De manera similar, un potenciador puede ser uno asociado de manera natural con una secuencia de ácido nucleico, localizado bien sea corriente abajo o corriente arriba de esa secuencia. Alternativamente se obtendrán ciertas ventajas posicionando el segmento de ácido nucleico de codificación bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, lo cual se refiere a un promotor que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador no asociado normalmente con una frecuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Tales promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, o promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o de células procariotas o eucariotas, y promotores o potenciadores de “origen no natural”, esto es, que contienen elementos diferentes de regiones reguladoras transcripcionales diferentes, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que son los más usados comúnmente en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas promotores beta lactamasa (penicilinasa), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácido nucleicos de promotores y potenciadores sintéticamente, las secuencias pueden ser reducidas utilizando tecnología de clonación recombinante y/o amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo PCR™, en relación con las composiciones divulgadas aquí (véase las Patentes de los Estados Unidos 4,683,202 y 5,928,906. Adicionalmente, se contemplan las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias con organelos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos, y similares, que pueden ser empleados también.

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija efectivamente la expresión del segmento de ADN en la célula, organelo, tipo de célula, tejido, órgano u organismo escogido para la expresión. Las personas de experiencia en la técnica de la biología molecular conocen en general el uso de promotores, potenciadores, y combinaciones tipo célula para expresión de proteínas (véase, por ejemplo Sambrook et al., 1989). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejidos, inducibles, y/o útiles bajo las condiciones apropiadas para dirigir un nivel de expresión alto al segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Un promotor puede ser uno adecuado para el uso en una célula procariota, una célula eucariota o ambas. Adicionalmente, cualquier combinación promotor/potenciador (como por ejemplo, la Eukaryotic Promoter Data Base EPDB), podrían ser usados también para conducir la expresión. Es posible el uso de un sistema de expresión citoplásmica T3, T7 o SP6.

2. Señales de iniciación y sitios de enlazamiento internos de ribosoma

Una señal de iniciación específica también puede ser requerida para una traducción eficiente de las secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de iniciación de ATG o secuencias adyacentes. Señales de control de traducción exógenas, incluyendo el codón de iniciación ATG, pueden ser requeridas. Una persona de experiencia normal en el arte será capaz fácilmente de determinar esto y proveer las señales necesarias. Es bien conocido que el codón de iniciación puede ser “en marco” con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control de traducciones exógenas y en los codones de iniciación pueden ser bien naturales o sintéticas. La eficiencia de la expresión puede ser potenciada por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

Los elementos de los sitios de entrada de ribosomas internos (IRES) pueden ser utilizados para crear mensajes multigen, o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de sortear el modelo de barrido de ribosoma de traducción dependiente de Cap metilada en 5´y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Han sido descritos elementos IRES para dos miembros de la familia de picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamíferos (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos de IRES pueden ser enlazados a marcos de lectura abierta heterólogos. Pueden transcribirse juntos marcos de lectura abierta múltiples, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierta es accesible a ribosomas para traducción eficiente. Pueden expresarse genes múltiples de manera eficiente utilizando un promotor/potenciador sencillo para transcribir un mensaje sencillo (véanse Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,925, 565 y 5, 935,81.

3. Sitios de clonación múltiples

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), el cual es una región de ácido nucleico que contiene sitios enzimáticos de restricción múltiple, cualquiera de los cuales puede ser utilizado en conjunción, con la tecnología recombinante estándar para digerir el vector (véase, por ejemplo, Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, y Cocea, 1997.). “Digestión de enzima de restricción” se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solamente en localizaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles comercialmente. El uso de tales enzimas es entendido ampliamente por los experimentados en la técnica. Frecuentemente, un vector es linealizado o fragmentado utilizando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que las secuencias exógenas estén ligadas al vector. “Ligación” se

refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleicos, los cuales pueden ser o no contiguos uno con otro. Las técnicas que involucran las enzimas de restricción y las reacciones de ligación son bien conocidas para los experimentados en la técnica de la tecnología recombinante.

4. Sitios de división

La mayor parte de las moléculas de ARN eucarióticas transcritas sufrirán división de ARN para eliminar intrones de los transcriptos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucariotes genómicas pueden requerir sitios de división donantes y/o receptores para asegurar un procesamiento apropiado del transcripto para la expresión de la proteína (véase, por ejemplo, Chandler et al., 1997).

5. Señales de terminación

Los vectores o constructos de la presente invención comprenderán en general al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" está comprendida de la secuencias de ADN involucradas en la terminación específica de un transcripto de ARN por una ARN polimerasa. Así, una señal de terminación que termine la producción de un transcripto de ARN puede ser contemplada. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para alcanzar niveles de mensaje deseables.

En sistemas eucariotes, la región terminadora también puede comprender secuencias de ADN específicas que permitan la escisión específica en sitios del nuevo transcripto de tal manera que se exponga a un sitio de poliadenilación. Esto señala una polimerasa endógena especializada para agregar un estiramiento de aproximadamente 200 residuos A (poliA) al extremo 3´del transcripto. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola poliA parecerán más estables y serán traducidas más eficientemente. Así, cuando se involucran eucariotes, se prefiere que el terminador comprenda una señal para la escisión del ARN, y se prefiere aún más que la señal del terminador promueva la poliadenilación del mensaje. Los elementos del sitio del terminador y/o poliadenilación pueden servir para potenciar los niveles de mensaje y minimizar las lecturas desde el casete en otras secuencias.

Los terminadores contemplados para uso en la invención incluyen cualquier terminador de la transcripción descrito aquí o conocido por una persona de experiencia normal en el arte, incluyendo pero no limitándose a, por ejemplo, la secuencias de terminación de genes, tales como por ejemplo, la secuencias de terminación de la hormona de crecimiento bovina o terminación viral, tal como por ejemplo, el terminador SV40. La señal de terminación puede ser una falta de secuencia transcribible o traducible, tal como una debida a un truncamiento de la secuencia.

6. Señales de poliadenilación

En la expresión, particularmente en la expresión eucariótica, se incluye típicamente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación apropiada del transcripto. La naturaleza de la señal de poliadenilación no se considera crucial en la práctica exitosa de la invención, y puede emplearse cualquiera de tales secuencias. Preferiblemente, está incluida la señal de poliadenilación SV40 o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, conveniente y de funcionamiento apropiado conocido en diversas células objetivo. La poliadenilación puede incrementar la estabilidad del transcripto o puede facilitar el transporte citoplasmático.

7. Orígenes de la replicación

Con el fin de preparar un vector en una célula huésped puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (denominados frecuentemente "ori"), la cual es una secuencia específica de ácido nucleico en la cual se inicia la replicación. Alternativamente puede emplearse una secuencia reautónomamente replicante (ARS) si la célula huésped es levadura.

8. Marcadores seleccionables y elegibles

Las células que contienen un constructo de ácido nucleico de la presente invención pueden ser identificadas in vitro o in vivo incluyendo un marcador en el vector de expresión. Tales marcadores pueden conferir un cambio identificable a la célula permitiendo una identificación fácil de las células que contienen el vector de expresión. En general, un marcador seleccionable es aquel que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es aquel en el cual la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es aquel en el cual su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

Usualmente la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol que son marcadores seleccionables útiles. Además los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes basados en la implementación de condiciones, se contemplan también otros

tipos de marcadores que incluyen marcadores seleccionables tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Alternativamente, pueden utilizarse enzimas elegibles tales como la timidina quinasa del virus de herpes simplex (tk) o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Una persona experimentada en la técnica también sabrá como emplear marcadores inmunológicos, posiblemente en conjunción con un análisis FACS. El marcador usado no se considera importante, en cuanto es capaz de ser expresado simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto genético. Ejemplos adicionales de marcadores seleccionables y elegibles son bien conocidos para una persona experimentada en la técnica.

9. Vectores plásmidos

Un vector plásmido puede ser contemplado para uso en la transformación de una célula huésped. En general, los vectores plásmidos que contienen secuencias de replicón y control que son derivados de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en relación con estos huéspedes. El vector ordinariamente porta un sitio de replicación, así como secuencias de marcación que son capaces de proveer selección fenotípica en células transformadas. En un ejemplo no limitante, la E. coli es transformada frecuentemente utilizando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de E. coli. La pBR322 contiene genes para la resistencia a ampicilina y tetraciclina y provee así medios fáciles para identificar células transformadas. El plásmido de pBR u otros plásmidos o fagos microbianos también pueden contener, o ser modificados para que contengan, por ejemplo, promotores que pueden ser utilizados por el organismo microbiano para expresión de sus propias proteínas.

Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicón y control que son compatibles con microorganismos huésped pueden ser usados como vectores transformantes en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, el fago lambda GEMTM 11 puede ser utilizado para preparar un vector de fago recombinante que puede ser utilizado para transformar células huésped, tales como, por ejemplo, E. coli LE392.

Vectores plásmidos útiles adicionales incluyen vectores pIN (Inouye et al. 1985); y vectores pGEX, para uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutationa S transferasa (GST) para purificación y separación o escisión posterior. Otras proteínas de fusión adecuadas son aquellas con beta galactosidasa, ubiquitina y similares.

Las células huésped bacterianas, por ejemplo, E. coli, que comprende el vector de expresión se cultivan en cualquier número de medios adecuados, por ejemplo LB. La expresión de la proteína recombinante en ciertos vectores puede ser inducida, tal como lo entenderían los experimentados en la técnica, poniendo en contacto una célula huésped con un agente específico para ciertos promotores, por ejemplo, agregando IPTG a los medios o conmutando la incubación a una temperatura más alta. Después de cultivar las bacterias durante un periodo posterior, generalmente de entre 2 y 24 horas, las células son recolectadas por centrifugación y lavadas para eliminar medio residual.

10. Vectores virales

La capacidad de ciertos virus para infectar células o entrar a las células a través de la endocitosis mediana por el receptor, y para integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar genes virales de manera estable y eficiente los han convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos foráneos en células (por ejemplo, células de mamíferos. Los componentes de la presente invención pueden comprender un vector viral que codifica una o más composiciones u otros componentes tales como, por ejemplo, un inmunomodulador o adyuvante. Ejemplos no limitantes de vectores virus que pueden ser utilizados para administrar un ácido nucleico de la presente invención se describen más adelante.

a. Vectores adenovirales

Un método particular para administrar el ácido nucleico involucra el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque los vectores de adenovirus son conocidos por tener una baja capacidad de integración en el ADN genómico, está característica es contrarrestada por la alta eficiencia de la transferencia genética permitida por estos vectores. Un "vector de expresión de adenovirus" se entiende que incluye estos constructos que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento del constructo y (b) para expresar al final un constructo específico para tejido celular que ha sido clonado en la misma. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN de doble cadena lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes partes de ADN adenoviral consecuencias foráneas hasta de 7 kb (Grunhaus and Horwitz, 1992).

b. Vectores AAV

El ácido nucleico puede ser introducido en la célula utilizando transfección asistida por adenovirus. Se han reportado eficiencias y transfección incrementada en el sistema celular utilizando sistemas de adenovirus acoplados (Kelleher and Vos, 1994; Cotten et al., 1992; Curiel, 1994). Los virus adenoasociados (AAV) son un sistema de vector atractivo para uso en las composiciones de la presente invención puesto que tiene alta frecuencia de integración y puede infectar células no divisoras, haciéndose así útil para la administración de genes en células de mamíferos, por ejemplo, en

cultivos de tejidos (Muzyczka, 1992) o in vivo. Los AAV tienen un amplio rango de huéspedes para infectividad (Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1986; Lebkowski et al., 1988; McLaughlin et al., 1988). Los detalles concernientes a la generación y uso de los vectores rAAV están descritos en las Patentes de los Estados Unidos No. 5, 139,941 y 4, 797,368.

c. Vectores retrovirales

Los retrovirus son útiles como vectores de administración debido a su capacidad de integrar sus genes en el genoma del huésped, transfiriendo una gran cantidad de material genético foráneo, infectando un amplio espectro de especies y tipos de células y por ser empacados en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

Con el fin de construir un vector retroviral, un ácido nucleico (por ejemplo uno que codifique una composición de interés) es insertado en el genoma viral en lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso en replicación. Con el fin de producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env pero sin los componentes LTR y de empaquetamiento (Mann et al., 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con el LTR retroviral y las secuencias de empaquetamiento en una línea celular especial (por ejemplo por precipitación con fosfato de calcio por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite que el transcripto de ARN del plásmido recombinante sea empacada en partículas virales, las cuales luego son secretadas en los medios de cultivo (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Los medios que contienen los retrovirus recombinantes se recolectan entonces, opcionalmente se concentran, y se utilizan para las transferencias de los genes. Los vectores retrovirales son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y expresión estable requieren la división de las células huésped (Paskind et al., 1975).

Los lentivirus son retrovirus complejos, los cuales, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naldini et al., 1996; Zufferey et al., Blomer et al., 1997; Patente de los Estados Unidos Nos. 6,013,516 y 5,994,136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de inmunodeficiencia en simios: VIS. Los vectores lentivirales se han generado atenuando de forma múltiple los genes de virulencia de VIH, por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef son eliminados haciendo el vector biológicamente seguro.

Los vectores lentivirales recombinantes son capaces de infectar células no divisora y pueden ser utilizados entonces para la transferencia de genes y expresión de secuencia de ácidos nucleicos in vivo y ex vivo. Por ejemplo, los lentivirus recombinantes capaces de infectar una célula no divisora en donde se transfecta una célula huésped adecuada con dos o más vectores que portan las funciones de empaquetamiento, a saber gag, pol y env, así como rev y tat se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5, 994,136. Se puede direccionar el virus recombinante por enlazamiento de la proteína de envoltura de un anticuerpo o un ligando particular para apuntar a un receptor de un tipo celular particular. Insertando una secuencia (incluyendo una región reguladora) de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifique el ligando par un receptor en una célula objetivo específica, por ejemplo, el vector es ahora específico de un objetivo.

d. Otros vectores virales

Otros vectores virales pueden ser empleados como constructo de vacunas en la presente invención. Los vectores derivados de virus tales como virus de vacuna (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988), virus sindbis, citomegalovirus y virus de herpes simplex pueden ser empleados. Ellos ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamíferos (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990).

e. Administración utilizando virus modificados

Un ácido nucleico que va a ser administrado puede ser alojado dentro de un virus infeccioso que haya sido manipulado para expresar un ligando de enlazamiento específico. La partícula de virus se enlaza así específicamente a receptores cognatos de la célula objetivo y administran los contenidos de la célula. Se desarrollo una nueva metodología diseñada para permitir el direccionamiento específico de vectores de retrovirus con base en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de residuos de lactosa a la envoltura viral. Está modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos a través de receptores de sialoglicoproteínas.

Se diseño otra metodología para direccionar los retrovirus recombinantes en los cuales se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de envoltura retroviral contra un receptor celular específico. Estos anticuerpos fueron acoplados a través de los componentes de biotina utilizando estreptavidina (Roux et al., 1989). Utilizando anticuerpos contra antígenos principales de complejos de histocompatibilidad clase I y clase II, demostraron una infección de una

variedad de células humanas más que aquellos antígenos de superficie con un virus ecotrópico in vitro (Roux et al., 1989).

11. Administración de vectores y transformación celular

Métodos adecuados para la administración de ácidos nucleicos erliquiales para la transformación de una organelo, una célula, un tejido o un organismo para uso en la presente invención, se consideran con la inclusión de virtualmente cualquier método mediante el cual puede introducirse un ácido nucleico (por ejemplo ADN) en un organelo, una célula, un tejido o un organismo, tal como se describe aquí o como seria conocido para una persona de experiencia normal en la técnica. tales métodos incluye, pero no se limitan a, administración directa de ADN tal como por ejemplo por transfección ex vivo (Wilson et al., 1989, Nabel et al., 1989), por inyección (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 y 5,580,85), incluyendo microinyección (Harlan and Weintraub, 1985; Patente de los Estados Unidos 5,789,215); por electroporación (Patente de los Estados Unidos No. 5,384,253; Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984); por precipitación con fosfato de calcio (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); utilizando dextrano DEAE seguido por polietilen glicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer et al., 1987); por transfección mediada por liposoma (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991) y transfección mediada por el receptor (Wu and Wu 1987; Wu and Wu, 1988); por bombardeo con microproyectiles (Solicitudes PCT Nos. WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,610,042; 5,322,783, 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 y 5,538,880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppler et al., 1990; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,302,523 y 5,464,765); por transformación mediada por Agrobacterium (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,591,616 y 5, 563,055); por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh et al., 1993; Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,684,611 y 4,952,500); por consumo de ADN mediado por desecación/inhibición (Potrykus et al., 1985); y cualquier combinación de tales métodos. A través de la aplicación de técnicas como estas, los organelos, células, tejidos y organismos pueden ser transformados de manera estable o transiente.

a. Transformación ex vivo

Los métodos para transfectar células y tejidos vasculares retirados de un organismo en una fijación ex vivo son conocidos por los experimentados en la técnica por ejemplo, se han alterado genéticamente células endoteliales caninas por transferencias de genes retrovirales in vivo y trasplantados en un canino (Wilson et al., 1989). En otro ejemplo, células endoteliales de minicerdos de Yucatán fueron transfectadas por retrovirus in vitro y transplantadas en una artería utilizando un catéter de doble balón (Nabel et al., 1989). Así, se contempla que las células o tejidos pueden ser retirados y transfectados in vivo utilizando ácidos nucleicos de la presente invención. Las células o tejidos trasplantados pueden ser colocados en un organismo. En facetas preferidas, un ácido nucleico es expresado en las células o tejidos trasplantados.

b. Inyección

Un ácido nucleico puede ser suministrado a un organelo, una célula, un tejido o un organismo, a través de una o más inyecciones (esto es, una inyección con aguja), tal como, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc. Los métodos de inyección de vacunas son bien conocidos para las personas de experiencia normal en la técnica (por ejemplo, inyección de una composición que comprende una solución salina). Adicionalmente, la introducción de un ácido nucleico puede ser por microinyección directa. La microinyección directa se ha utilizado para introducir constructos de ácidos nucleicos en Xenopus oocites (Harland and Weintraub, 1985). La cantidad de composición utilizada puede variar dependiendo de la naturaleza del antígeno así como del organelo, célula, tejido u organismos utilizados.

c. Electroporación

Un ácido nucleico puede ser introducido en un organelo, una células, un tejido o un organismo a través de electroporación. La electroporación involucra la exposición de una suspensión de células y de ADN a una descarga eléctrica de alto voltaje. En algunas variantes de este método, se emplean a ciertas enzimas degradantes de las paredes celulares, tales como enzimas degradantes de la pectina, para hacer que las células receptoras objetivo sean más susceptibles de transformación por electroporación que las células no tratadas (Patente de los Estados Unidos No. 5,384.253). Alternativamente, las células receptoras pueden hacerse más susceptibles a la transformación por lesiones mecánicas.

La transfección de las células eucarióticas utilizando electroporación ha sido bastante exitosa. Linfocitos pre B de ratón han sido transfectados con genes de kappa inmunoglobulina humana (Potter et al., 1984), y hepatocitos de rata han sido transfectados con un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Tur Kaspa et al., 1986) de esta manera.

Para efectuar la transformación por electroporación en células tales como, por ejemplo, células vegetales, se puede emplear bien sea tejidos friables, tales como un cultivo en suspensión de células o callos embriogénicos o alternativamente se pueden transformar embriones inmaduros u otros tejidos organizados directamente. En esta técnica, se degradarían parcialmente las paredes celulares de las células escogidas exponiéndolas a enzimas degradantes de la pectina (pectoliasas) o mediante lesiones mecánicas de manera controlada. Ejemplos de algunas especies que han sido transformadas por electroporación de células intactas incluyen maíz (Patente de los Estados Unidos No. 5,384,253; Rhodes et al., 1995; D´Halluin et al., 1992) trigo (Zhou et al., 1993), tomate (Hou and Lin, 1996), soja (Christou et al., 1987) y tabaco (Lee et al., 1989).

También se pueden emplear protoplastos para la transformación por electroporación de células vegetales (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Por ejemplo, la generación de plantas de soja transgénicas por electroporación de protoplastos derivados del cotiledón está descrita en la solicitud internacional de Patente No. WO 9217598 de Dhir and Widholm. Otros ejemplos de especies para los cuales se ha descrito la transformación de protoplastos incluyen cebada (Lazerri, 1995), sorgo (Battraw et al., 1991), maíz (Bhattacharjee et al., 1997), trigo (He et al., 1994) y tomate (Tsukada, 1989).

d. Fosfato de calcio

un ácido nucleico puede ser introducido en las células utilizando precipitación con fosfato de calcio. Las células KB humanas han sido transfectadas con ADN de adenovirus 5 (Graham and Van Der Eb, 1973) utilizando esta técnica. También en esta manera, se transfectaron células de ratón L (A9), ratón C127, CHO, CV 1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de neomicina (Chen and Okayama, 1987) y hepatocitos de rata fueron transfectados con una variedad de genes marcadores (Rippe et al., 1990).

e. DEAE dextrano

Un ácido nucleico también puede ser administrado a una célula utilizando DEAE dextrano seguido por polietilenglicol. De esta forma, se introdujeron plásmidos informadores en células de mieloma y eritroleucemia de ratón (Gopal, 1985).

f. Carga por sonificación

La introducción de un ácido nucleico puede ser por carga sónica directa. Los fibroblastos LTK han sido transfectados con el gen de timidina quinasa por carga por sonicación (Fechheimer et al., 1987).

g. Transfección mediada por liposomas

En una realización adicional de la invención, el ácido nucleico erliquial puede ser incluido dentro de un complejo lipídico tal como, por ejemplo, incluido en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de capa doble de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen capas lipídicas múltiples separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos sufren autoreordenamiento antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh and Bachhawat, 1991). También se contempla un ácido nucleico complejado con lipofectamina (Gibco BRL) o superfect (Qiagen).

La administración de ácido nucleico mediado por lopsomas y la expresión de ADN foráneo in vitro han sido muy exitosas (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987). La factibilidad de administración mediada por liposomas y expresión de ADN foráneo en embriones de pollo cultivados, de células HeLa y de hepatoma también han sido demostrados (Wong et al., 1980).

Un liposoma puede ser complejado con un virus hemoaglutinante (HVJ). Esto ha sido demostrado para facilitar la fusión con la membrana celular y promover la entrada a la célula de ADN encapsulado en liposomas (Kaneda et al., 1989). Adicionalmente, un liposoma puede ser complejado o empleado en conjunción con proteínas cromosómicas no histona (HMG 1) (Kato et al., 1991). Adicionalmente, un liposoma puede ser complejado o empleado en conjunción con HVJ y HMG 1. Un vehículo de administración puede comprender un ligando y un liposoma.

h. Transfección mediada por receptores

Aún adicionalmente, un ácido nucleico puede ser administrado a una célula objetiva a través de vehículos de administración mediados por receptores. Estos aprovechan la ventaja del consumo selectivo de macromoléculas por la endocitosis mediada por receptores que se ocurrirá en una célula objetivo. A la vista de la distribución específica del tipo celular de diversos receptores, este método de administración agrega otros grados de especificidad a la presente invención.

Ciertos vehículos de direccionamiento de genes mediados por receptores comprenden un ligando específico de un receptor celular y un agente de enlazamiento de ácido nucleico. Otros comprenden un ligando específico de un receptor

celular al cual el ácido nucleico que va a ser suministrado ha sido enlazado operativamente. Se han utilizado varios ligandos para la transferencia de genes mediada por receptores (Wu and Wu, 1987; Wagner et al 1990; Perales et al., 1994; Myers, EPO 0273085), lo cual establece la operatividad de la técnica. Se ha descrito la administración específica en el contexto de otros tipos celulares de mamíferos (Wu and Wu, 1993). Puede escogerse un ligando de forma que corresponda con un receptor expresado específicamente en la población de células objetivo.

Un componente vehicular de administración de ácidos nucleicos de un ácido nucleico específico de una célula que direccione el vehículo puede comprender un ligando de enlazamiento específico en combinación con un liposoma. Los ácidos nucleicos que se van a administrar son alojados dentro del liposoma y el ligando de enlazamiento específico se incorpora funcionalmente en la membrana del liposoma. El liposoma así se enlazará específicamente al receptor de una célula objetivo y suministrará el contenido a una célula. Tales sistemas han demostrado ser funcionales utilizando sistemas en los cuales, por ejemplo, se utiliza el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la administración mediada por el receptor de un ácido nucleico a células que exhiben sobreregulación del receptor de EGF.

En realizaciones, el componente vehicular de administración de ácido nucleicos de un vehículo de administración direccionado puede ser un liposoma mismo, el cual comprende preferiblemente uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen el enlazamiento específico a la célula. Por ejemplo, la lactosil ceramida, un asialgangliósido terminal de galactosa, se ha incorporado en los liposomas y se ha observado un incremento en el consumo de gel de insulina por los hepatocitos (Nicolau et al., 1987). Se contempla que los constructos transformantes específicos de tejidos de la presente invención pueden ser administrados específicamente en una célula objetivo de manera similar.

i. Bombardeo con microproyectiles

Las técnicas de microbombardeo con microproyectiles pueden ser utilizadas para introducir un ácido nucleico en al menos un organelo, célula, tejido u organismo (Patente de los Estados Unidos No. 5,550,318; Patente de los Estados Unidos No. 5, 538,880; Patente de los Estados Unidos No. 5,610,042 y solicitud PCT WO 94/09699.). Este método depende de la capacidad para acelerar microproyectiles recubiertos con ADN hasta una alta velocidad permitiéndoles perforar membranas celulares y entrar a las células sin matarlas (Klein et al., 1987). Hay una amplia variedad de técnicas de bombardeo con microproyectiles conocidas en la técnica, muchas de las cuales son aplicables a la invención.

El bombardeo con microproyectiles puede ser utilizado para transformar diversas células, tejidos, u organismos, tales como por ejemplo cualquier especie vegetal. Ejemplos de especies que han sido transformadas por bombardeo con microproyectiles incluyen especies de monocotiledóneas tales como maíz (solicitud PCT WO 95/06128), cebada (Ritala et al., 1994; Hensgens et al., 1993), trigo (Patente de los Estados Unidos No. 5,563,055), arroz (Hensgens et al., 1993), avena (Torbet et al., 1998), centeno (Hensgens et al., 1993), caña de azúcar (Bower et al., 1992), y sorgo (Casas et al., 1993; Hagio et al., 1991); así como un número de dicotiledóneas incluyendo tabaco (Tomes et al., 1990; Buising and Benbow, 1994), soja (Patente de los Estados Unidos No. 5,322,783), girasol (Knittel et al., 1994), cacahuete (Singsit et al., 1997), algodón (McCabe and Martinell, 1993) tomate (VanEck et al., 1995), y legumbres en general (Patente de los Estados Unidos No. 5,563,055).

En el bombardeo con microproyectiles, pueden recubrirse una o más partículas con al menos un ácido nucleico y administrarse dentro de las células mediante una fuerza propelente. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar las partículas pequeñas. Uno de estos dispositivos se basa sobre una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, la cual a su vez provee la fuerza impulsora (Yang et al., 1990). Los microproyectiles usados han consistido de sustancias bilógicamente inertes tales como partículas o perlas de tungsteno u oro. Partículas de ejemplo que comprenden tungsteno, platino, y preferiblemente, oro. Se contempla que en algunos casos la precipitación del ADN sobre partículas metálicas no sería necesaria para la administración de ADN a una célula receptora utilizando bombardeo con microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas pueden contener ADN en vez de ser recubiertas con ADN. Las partículas recubiertas con ADN pueden incrementar el nivel de administración de ADN a través del bombardeo de partículas pero no son, por sí mismas necesarias.

Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran sobre filtros o medios de cultivo sólido. Alternativamente, pueden disponerse embriones inmaduros y otras células objetivo sobre un medio de cultivo sólido. Las células que van a ser bombardeadas son posicionadas a una distancia apropiada por debajo de la placa de tensión de los macroproyectiles.

Alternativamente, la invención divulga adicionalmente un método para administra ADN en una células (por ejemplo, una célula vegetal) por aceleración según el Biolistics Particle Delivery System, el cual puede ser utilizado para impulsar partículas recubiertas con ADN o células a través de una pantalla, tal como una pantalla de acero inoxidable o Nytex, sobre una superficie de filtro recubierta con células, tal como por ejemplo, unas células de planta monocotiledóneas cultivadas en suspensión. La pantalla dispersa las partículas de tal manera que no sean administradas a las células receptoras en grandes agregados. Se cree que una pantalla que interviene entre el aparato de proyectiles y las células que van a ser bombardeadas reduce el tamaño del agregado de proyectiles y puede contribuir a una frecuencia más

alta de transformación reduciendo el daño infligido sobre las células recipientes por proyectiles que son demasiado grandes.

12. Células huésped

Tal como se utiliza aquí, los términos “células”, “línea celular” y “cultivo celular” pueden utilizarse de manera intercambiable. Todos estos términos incluyen también la progenie, la cual es cualquiera y todas las generaciones subsecuentes. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, “célula huésped” se refiere a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula huésped puede, y ha sido usada así, operada como un receptor para vectores. Una célula huésped puede ser “transfectada” o “transformada”, lo cual se refiere a un proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno puede ser transferido o introducido a la célula huésped. Una célula transformada incluye la célula objetivo primario y su progenie. Tal como se utilizan aquí, los términos célula o células huésped “manipuladas” y “recombinantes” pretenden referirse a una célula dentro de la cual se ha introducido una frecuencia de ácido nucleico exógeno, tal como, por ejemplo, un vector. Por lo tanto, las células recombinantes son distinguibles de las células de origen natural que no contienen ácido nucleico introducido por vía recombinante.

Las secuencias de ARN o proteináceas pueden ser expresadas con otras secuencias de ARN o proteináceas seleccionadas en la misma célula huésped. La coexpresión puede lograrse cotransfectando la célula huésped con dos o más vectores recombinantes distintos. Alternativamente, puede construirse un vector recombinante sencillo de forma que incluya múltiples regiones de codificación distintas para ARN, lo cual podría ser expresado entonces en células huésped transfectadas con el vector sencillo.

Un tejido puede comprender una célula o células huésped que van a ser transformadas con una composición de la invención. El tejido puede ser parte o estar separado de un organismo. Un tejido puede comprender, pero no está limitado a, células de adipocitos, alveolares, ameloblastos, axones, células basales, sangre (por ejemplo linfocitos), vasos sanguíneos, hueso, médula ósea, cerebro, seno, cartílago, cérvix, colon, cornea, embriónico, endometrio, epitelial, esófago, fascia, fibroblasto, folicular, células de ganglion, células gliales, células de cáliz, riñón, hígado, pulmón, nódulo linfático, músculo, neurona, ovarios, páncreas, sangre periférica, próstata, piel, intestino delgado, vaso, células madre, estómago, testículos, anteras, tejido ascita, mazorcas, oídos, flores, cáscaras, pulpas, hojas, células meristemáticas, polen, puntas de raíces, raíces, seda, tallos y todos los cánceres de los mismos.

La célula o tejido huésped puede comprender al menos un organismo. El organismo puede ser, pero no se limita a, un eucariota (por ejemplo, una eubacteria, una arcaea), o un eucariota, tal como lo entendería una persona de experiencia normal en la técnica (véase, por ejemplo, el sitio web http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html).

Hay disponibles numerosas líneas celulares y cultivos para uso como células huésped, y pueden obtenerse a través de la American Type Culture Collection (ATCC), la cual es una organización que sirve como archivo para cultivos vivos y materiales genéticos (ww.atcc.org). Un huésped apropiado puede ser determinado por una persona experimentada en la técnica con base en el esqueleto del vector y el resultado deseado. Un plásmido o cósmido, por ejemplo, pueden ser introducidos en una célula huésped procariota para replicación de muchos vectores. Los tipos celulares disponibles para la replicación y/o expresión de vectores incluye, pero no se limitan a, bacterias, tales como E.coli (por ejemplo, E. coli cepa RR1, E. coli LE392, E. coli X 1776 (ATCC No. 31537), así como E. coli W3110 (F, lambda, fototrófico, ATTC No. 273325), DH5α, JM109, bacilos, tales como Bacillus subtilis; y otras enterobacteriáceas tales como Salmonella typhimirium, Serratia marcescens, diversas especies de Pseudomonas así como un cierto número de huéspedes bacterianos disponibles comercialmente, tales como SURE® Competent Cells y células SOLOPACK Gold (STRATAGENE®, La Jolla). Células bacterianas tales como E. coli LE392 se contemplan particularmente como células huésped para virus de fagos.

Ejemplos de células huésped eucarióticas para la replicación y/o expresión de un vector incluyen, pero no se limitan a, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos y PC12. Muchas células huésped de diversos tipos de células y organismos están disponibles y serán conocidos para una persona experimentada en la técnica. De la misma forma un vector viral puede ser usado en conjunción bien sea con una célula huésped eucariota o procariota, particularmente, una que sea permisiva para replicación o expresión del vector.

Algunos vectores pueden emplearse secuencias de control que permiten que sea replicados y/o expresados en células tanto procariotas como eucariota. Una persona experimentada en la técnica entenderá adicionalmente las condiciones bajo las cuales incubar todas las células huésped descritas anteriormente para mantenerlas y para permitir la replicación de un vector. También se entienden y conoce técnicas y condiciones que permiten la producción de vectores a gran escala, así como la producción de ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteína o péptidos cognados.

13. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos parte o todas las composiciones discutidas anteriormente. Los sistemas basados en procariotas y/o eucariotes pueden emplearse para uso en la presente invención con el fin de producir secuencias de ácidos nucleicos, o sus polipéptidos, proteína y péptidos cognatos. Muchos de tales sistemas están disponibles comercialmente de manera amplia.

El sistema de célula de insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión de proteínas de segmentos de ácidos nucleicos heterólogos, tales como se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,871,986, 4,879,236 y los cuales pueden obtenerse por ejemplo bajo los nombres MAXBAC® y BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM FROM CLONTECH®.

Otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen STRATAGENE®´s COMPLETE CONTROL Inducible Mammalian Expression System, el cual involucra un receptor inducible por ecdisoma o su sistema de expresión pET, un sistema de expresión para E. coli. Otro ejemplo para un sistema de expresión inducible está disponible en INVITROGEN®, el cual porta el sistema T-REX™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión inducible en mamíferos que utiliza el promotor CMV de longitud completa. INVITROGEN® también provee un sistema de expresión en levaduras denominado el sistema de expresión de piquia metabólica, el cual está diseñado para una producción a alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica piquia metabólica. Una persona experimentada en la técnica sabrá cómo expresar un vector, tal como un constructo de expresión, de tal forma que se produzca una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido cognatos.

Se contempla que las proteínas, polipéptidos o péptidos producidos por los métodos de la invención pueden ser "sobreexpresados", esto es, expresados en niveles incrementados con respecto a su expresión natural en las células. Tal sobreexpresión puede lograrse mediante una variedad de métodos, incluyendo radiomarcación y/o purificación de proteínas. Sin embargo, se prefieren los métodos simples y directos, por ejemplo, los que involucran SDS/PAGE y tinción de proteína o inmunoprecipitación western seguidos por análisis cuantitativos, tal como un barrido densitométrico del gel o precipitado resultante. Un incremento específico en el nivel de proteína, polipéptido o péptido recombinantes en comparación con el nivel de las células naturales es indicador de la sobreexpresión, puesto que es una abundancia relativa de la proteína, polipéptidos o péptidos específicos en relación con las otras proteínas producidas por las células huésped y, por ejemplo visibles sobre un gel.

La secuencia proteinácea expresada puede formar un cuerpo de inclusión en la célula huésped, las células huésped son sometidas a lisis, por ejemplo, por perturbación en un homogenizador celular lavado y/o centrifugación para separar los cuerpos de inclusión densos y las membranas celulares de los componentes celulares solubles. Esta centrifugación puede llevarse a cabo bajo condiciones mediante las cuales los cuerpos de inclusión densos sean enriquecidos selectivamente por incorporación de azúcares, tales como sacarosa, en el regulador y por centrifugación a una velocidad selectiva. Los cuerpos de inclusión pueden ser solubilizados en soluciones que contienen altas concentraciones de urea (por ejemplo 8M) o agentes caotrópicos tales como clorhidrato de guanidina en presencia de agentes reductores tales como beta mercaptoetanol o DDT (ditioetritol), y replegados en una conformación más deseable, tal como las conocidas para una persona de experiencia normal en la técnica.

VI. Equivalentes funcionales biológicos

Puesto que las modificaciones y/o cambio pueden hacerse en la estructura de los polinucleótidos y/o proteínas de acuerdo con la presente invención, a la vez que se obtienen moléculas que tienen características similares o mejoradas, tales equivalentes funcionales biológicamente también quedan abarcados dentro de la presente invención.

A. Polinucleótidos y polipéptidos modificados

El equivalente funcional biológico puede comprender un polinucleótido que ha sido manipulado para contener distintas secuencias mientras que al mismo tiempo tiene la capacidad de codificar la proteína "tipo silvestre" o estándar. Esto puede lograrse con degeneración del código genético, esto es, la presencia de codones múltiples, que codifican los mismos aminoácidos. En un ejemplo, una persona experimentada en la técnica quiere introducir una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción en un polinucleótido sin perturbar la capacidad de ser un polinucleótido para codificar una proteína.

En otro ejemplo, los polinucleótidos pueden ser (y codificar) un equivalente funcional bilógico con cambios más significativos. Ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura proteínica sin pérdida apreciable de su capacidad de enlazamiento interactivo con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de enlazamiento de antígenos en anticuerpos, sitios de enlazamiento sobre sus moléculas, sustratos, receptores y similares. Los así llamados cambios "conservadores" no perturban la actividad bilógica de la proteína, puesto que el cambio estructural no es uno que perturbe la capacidad de las proteínas para llevar a cabo su función designada. Así es

contemplado por los inventores que pueden hacerse diversos cambios en la secuencia de genes y proteínas divulgados aquí a la vez que se satisface a un las metas de la presente invención.

En términos de equivalentes funcionales, es bien entendido por el técnico experimentado que, inherente en la definición de una proteína y/o polinucleótido "equivalente biológico funcional", es el concepto que hay un límite al número de cambios que pueden hacerse dentro de una porción definida de la molécula mientras se retiene en una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. Los equivalentes funcionales biológicamente se definen aquí entonces como aquellas proteína (y polinucleótidos) en los cuales pueden sustituirse aminoácidos (o codones) seleccionados. Actividad funcional.

En general, cuanto más corta es la longitud de la molécula, pueden hacerse más pocos cambios dentro de la molécula manteniendo su función. Los dominios más largos pueden tener un número intermediario de cambios, la proteína de longitud grande tendrá la máxima tolerancia para un número mayor de cambios. Sin embargo, debe ser observado que ciertas moléculas o dominios que son altamente dependientes de su estructura pueden tolerar poca o ninguna modificación.

Las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño y similares. Un análisis del tamaño forma y/o tipo de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos revela que la arginina, la lisina y/o la histidina son todos residuos cargados positivamente; la alanina, glicina y/o serina son todos de un tamaño similar; y/o que la fenilalanina, triptófano y/o la tirosina tienen una forma en general similar. Por lo tanto, con base en estas consideraciones, la arginina, lisina y/o histidina; alanina, glicina y/o serina; y/o la fenilalanina, triptófano y/o tirosina; se definen aquí como equivalentes biológicamente funcionales.

Para efectuar más cambios cualitativos, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido ha sido asignado a un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y/o características de carga, siendo estos isoleucine (+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); triptófano (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); y/o arginina (4.5).

La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir una función biológica interactiva sobre una proteína se entiende en general en la técnica (Kyte & Doolittle, 1982). Es conocido que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen índices y/o clasificaciones hidropáticas similares y/o mantienen aún una actividad biológica similar. Al hacer cambios con base en el índice hidropático, la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 es la preferida, son particularmente preferidos aquellos dentro de ± 1 y/o son más particularmente preferidos aquellos con ± 0.5.

También se entiende en la técnica que la sustitución de los aminoácidos similares puede realizarse efectivamente sobre la base de la hidrofobicidad, particularmente cuando la proteína y/o péptido con equivalencia biológica funcional creada de esta manera se entiende para uso en realizaciones inmunológicas, como en ciertas realizaciones de la presente invención. La Patente de los Estados Unidos No. 4, 554,101 establece que la hidrofilicidad promedio local más grande de una proteína, según es regulada por la hidrofilicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y/o antigenicidad, esto es, con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la Patente de los Estados Unidos 4, 554,101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilicidad a los residuos de los aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 6 1); glutamato (+3.0 6 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina. (0.4); prolina (-0.5 6 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); triptófano (3.4). Al hacer cambios con base en valores de hidrofilicidad similares, la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad están dentro de ± 2 es preferida, mientras que se prefiere particularmente aquellos dentro de ± 1, y se prefieren más particularmente aquellos dentro de ± 0.05.

B. Aminoácidos alterados

La presente invención, en muchos aspectos, se basa en la síntesis de péptidos y polipéptidos in cyto, a través de transcripción y traducción de polipéptidos apropiados. Estos péptidos y polipéptidos incluirán los 20 aminoácidos "naturales", y modificaciones postranslacionales de los mismos. Sin embargo, la síntesis y péptidos in vitro permiten el uso de aminoácidos modificados y/o inusuales. La Tabla 1 provee aminoácidos de ejemplo, pero no limitantes, modificados y/o inusuales.

C. Imitaciones

Además de los equivalentes funcionales bilógicos discutidos anteriormente, los presentes inventores también contemplan que compuestos estructuralmente similares pueden formularse para imitar las porciones claves de los

péptidos o polipéptidos de la presente invención. Tales compuestos, los cuales pueden ser denominados péptidomiméticos, han sido utilizados de la misma forma que los péptidos de la invención y, por lo tanto, también son equivalentes funcionales.

Ciertos imitadores que imitan los elementos de la estructura secundaria y terciaria de la proteína están descritos en Johnson et al. (1993). El raciocinio subyacente detrás del uso de los imitadores de péptidos es que el esqueleto del péptido de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas de aminoácidos de tal forma que faciliten las interacciones moleculares, tales como la de los anticuerpos y/o antígenos. Un imitador peptídico está diseñado así para permitir interacciones moleculares similares a la molécula natural.

Algunas aplicaciones exitosas del concepto del péptido imitador se han enfocado en imitadores de los giros β dentro de las proteínas, de los que se saben que son altamente antigénicos. Probablemente la estructura de giros β dentro de un polipéptido puede ser predicha por algoritmos basados en ordenador, tal como se discute aquí. Una vez que los aminoácidos componentes del giro son determinados, pueden construirse imitadores para alcanzar una orientación espacial similar a los elementos estándar de las cadenas de aminoácidos laterales.

Otras metodologías se han enfocado en el uso de proteínas pequeñas, que contienen multidisulfuros como patrones estructurales atractivos para producir conformaciones bilógicamente activas que imiten los sitios de enlazamiento de la proteínas grandes. Vita et al. (1998). Un motivo estructural que parece haber sido conservado en la evolución en ciertas toxinas es pequeño (30-40 aminoácidos), estable y altamente permisivo para la mutación. Este motivo está compuesto de láminas beta y una hélice alfa puenteada en el núcleo interior por tres disulfuros.

Los giros beta II han sido imitados exitosamente utilizando L-pentapéptidos cíclicos, y aquellos D-aminoácidos. Weisshoff et al. (1999). También, Johannesson et al. (1999) han informado sobre tripéptidos bicíclicos que invierten las propiedades inductoras del giro.

Métodos para generar estructuras específicas han sido divulgados en la técnica. Por ejemplo, se divulgan imitadores de la hélice alfa en las Patentes de los Estados Unidos 5, 446,128; 5, 710,245; 5, 840,833; y 5, 859,184. Estas estructuras hacen que péptido proteína sea más estable térmicamente, incluyendo también la resistencia a la degradación proteolítica. Se divulgan estructuras de anillo de seis, siete, once, doce, trece y catorce miembros.

Los métodos para generar giros beta conformacionalmente restringidos y salientes beta se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos 5,440,013; 5,618,914 y 5,670,155. Los giros beta permiten sustituyentes laterales cambiados sin que tengan cambios en la conformación del esqueleto correspondiente, y tengan términos apropiados para la incorporación en péptidos mediante el procedimiento de síntesis estándar. Otros tipos de giros miméticos incluyen giros reversos y gama. Los giros miméticos están divulgados en las Patentes de los Estados Unidos 5,475,085 y 5,929,237, y los imitadores de giros gama están descritos en las Patentes de los Estados Unidos 5,672,681 y 5,674,976.

VII. Composiciones inmunológicas

En realizaciones particulares de la invención se emplean composiciones inmunológicas. En aras de la brevedad, la siguiente sección se referirá a composiciones inmunológicas de gp19 de E. canis de la presente invención, tal como las descritas aquí como realizaciones solamente de ejemplo. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir todo o parte del polipéptido gp19 de E. canis, tal como comprender parte o toda las SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19, un polinucleótido de gp19, tal como una parte que comprende todo de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18, un péptido, tal como el que comprende SEQ ID NO: 13, un anticuerpo a un polipéptido o péptido de la invención, o una mezcla de los mismos, por ejemplo. Los anticuerpos pueden ser utilizados para enlazar un antígeno, haciendo por lo tanto que la molécula sea parcialmente inefectiva en cuanto a su actividad, por ejemplo. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se emplean en aspectos diagnósticos de la invención, tal como por ejemplo para detectar la presencia de un antígeno a partir de una muestra. Muestras de ejemplo pueden ser de un animal que se sospecha que tiene infección por E. canis o E. chaffeensis, de un animal susceptible a infección por E. canis o E. chaffeensis, o de un animal que tiene una infección por E. canis o E. chaffeensis. Muestras de ejemplo pueden obtenerse a partir de sangre, suero, fluido cerebroespinal, orina, heces, frotis de mejillas, aspirado de pezones y así sucesivamente.

Composiciones inmunorreactivas purificadas o fragmentos antigénicos de las composiciones inmunorreactivas pueden utilizarse para generar nuevos anticuerpos o para probar anticuerpos existentes (por ejemplo, como controles positivos en una prueba diagnóstica) empleando protocolos estándar conocidos para los experimentados en la técnica.

Como es bien conocido en la técnica, la inmunogenicidad de un inmunógeno particular puede potenciarse a partir de estimuladores no específicos de la respuesta inmune conocidos como adyuvantes. Adyuvante de ejemplo y preferidos incluyen BCG completo, Detox (RIBI, Immunochem Research Inc.), ISCOMS y adyuvante de hidróxido de aluminio (Superphos, Biosector).

Incluidos en esta invención están los antisueros policlonales generados mediante el uso de una composición inmunorreactiva o un fragmento de la composición inmunorreactiva tal como un inmunogéno, por ejemplo, conejos. Se emplean protocolos estándar para la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales si conocidos por los experimentados en esta técnica. Los anticuerpos monoclonales generados por este procedimiento pueden ser filtrados en cuanto a su capacidad para identificar clones de ADNc de Erlichia recombinantes y para distinguirlos de clones de ADNc conocidos, por ejemplo.

La invención abarca no solamente un anticuerpo monoclonal intacto, sino también un fragmento de anticuerpo inmunológicamente activo, por ejemplo, un fragmento Fab O (Fab)2, una molécula de scFv de cadena manipulada; o una molécula quimérica, por ejemplo, un anticuerpo que contiene la especificidad de enlazamiento de un anticuerpo, por ejemplo, de origen murínico, y las porciones remanente de otro anticuerpo, por ejemplo, de origen humano.

El anticuerpo, o fragmento de los mismos, puede estar enlazado a una toxina o a un marcador detectable, por ejemplo, a un marcador radioactivo, un marcador isotópico no radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético, un marcador enzimático o un marcador colorimétrico. Ejemplos de toxinas adecuadas incluyen toxina de difteria, exotoxina A de Pseudomona, ricina, y toxina del cólera. Ejemplos de marcadores enzimáticos adecuados incluyen malato hidrogenasa, stafiloccocu nucleasa, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa, alfa glicero fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, etc. Ejemplos de marcadores isotópicos adecuados incluyen ^{3}H, ^{125}I, ^{131}I, ^{32}P, ^{35}S, ^{14}C, etc.

Isotopos paramagnéticos para propósitos de diagnóstico in vivo también pueden utilizarse de acuerdo con los métodos de esta invención. Hay ejemplos numerosos de elementos que son útiles en las imágenes de resonancia magnética. Para discusiones sobre imágenes de resonancia magnética nuclear in vivo, véase por ejemplo, Scheffer et al., (1989) JACC 14, 472-480; Sirve et al (1986) Magna. Rezón. Mes. 3, 336-340; Woolf, G.L., (1984); Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 93-95; Wesby et al., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 145-155; Runge et al., (1984) Invest. Radiol. 19, 408-415. Ejemplos de marcadores fluorescentes estables incluyen un marcador de fluoresceína, un marcador de isotiocianato, un marcador de rodamina, un marcador de ficoeritrina, un marcador de ficocianina, un marcador de aloficocianina, un marcador de oftaldehído, un marcador de fluorescamina, etc. Ejemplos de marcadores quimioluminiscentes incluyen un marcador luminal, un marcador isoluminal, un marcador aromático de éster de acridinio, un marcador de luciferina, un marcador de luciferasa, un marcador de aecuorina, etc.

Las personas de experiencia normal en la técnica, serán de estos y otros marcadores adecuados, los cuales pueden ser empleados de acuerdo con la presente invención. El enlazamiento de estos marcadores a los anticuerpos o fragmentos de los mismos puede lograrse utilizando técnicas estándar conocidas comúnmente por las personas experimentadas en la técnica. Las técnicas típicas están descritas por Kennedy et al., (1976) Clin. Chim. Acta 70, 1-31; y Schurset al., (1977) Clin. Chim. Acta 81, 1-40. Las técnicas de acoplamiento mencionadas en este último son el método de glutaraldehído, el método del peryodato, el método de la dimaleimida, el método de la maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida. Todos estos métodos se incorporan aquí.

D. Anticuerpos

Uno o más anticuerpos pueden ser producidos para los gp36 o gp47 expresados. Estos anticuerpos son utilizados en diversas aplicaciones diagnosticas y/o terapéuticas descritas aquí.

Tal como se utiliza aquí, el término “anticuerpo” pretende referirse ampliamente a cualquier agente de enlazamiento inmunológico tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En general, se prefieren IgG y/o IgM porque son los anticuerpos más comunes en a situación fisiológica y porque son los que se hacen más fácilmente en un montaje del laboratorio.

El término “anticuerpos” se utiliza para referirse a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tenga una región de enlazamiento a antígeno, e incluye fragmentos de anticuerpos tal como Fab´, Fab, F(ab´)2, anticuerpos de dominio sensible (DABs), Fv, scFv (Fv de cadena sencilla), y similares. Las técnicas para preparar y utilizar diverso constructos y fragmentos basados en anticuerpos son bien conocidas en la técnica. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

También se contemplan “minianticuerpos” o “minicuerpos” para uso con la presente invención. Los minicuerpos son cadenas de polipéptidos de sFv que incluyen dominios de oligomerización en sus terminales C, separados de los sFv por una región bisagra. Pack et al. (1992) Biochem 31: 1579-1584. El dominio de oligomerización comprende la autoasociación de hélices alfa, por ejemplo, cremalleras de leucina, las cuales pueden ser estabilizadas adicionalmente por puentes de disulfuro adicionales. El dominio de oligomerización está diseñado para ser compatible con un plegamiento vectorial a través de una membrana, un proceso pensado para facilitar el plegamiento in vivo del polipéptido en una proteína de enlazamiento funcional. En general, los minicuerpos se producen utilizando métodos

recombinantes bien conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Pack et al. (1992) Biochem 31: 1579-1584; Cumber et al. (1992) J Immunology 149B: 120-126.

Los péptidos miméticos de enlazamiento similares a anticuerpos también se contemplan dentro de la presente invención. Liu et al. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003 Mar; 49(2): 209-16 describen "anticuerpos como peptidomiméticos de enlazamiento" (ABiPs), los cuales son péptidos que actúan como anticuerpos apareados por lo bajo y tienen ciertas ventajas de una vida media en suero más larga así como métodos de síntesis menos engorrosos.

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) se reconocen por tener ciertas ventajas como, por ejemplo, reproducibilidad y producción a gran escala, y su uso es preferido en general. La invención provee así anticuerpos monoclonales de origen humano, murínico, de monos, ratas, hámster, conejos e incluso pollos. Debido a la facilidad de preparación y fácil disponibilidad de los reactivos, se prefieren frecuentemente los anticuerpos monoclonales murínicos.

Sin embargo, los anticuerpos "humanizados" también son contemplados, como lo son los anticuerpos quiméricos de ratón, rata u otras especies, que portan dominios de regiones constantes y/o variables humanos, anticuerpos específicos, anticuerpos recombinantes y manipulados y fragmentos de los mismos. Tal como se utiliza aquí, el término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región de marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (usualmente ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que provee el CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que provee el marco se conoce como "el receptor". Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena liviana humanizada y una cadena pesada humanizada.

E. Métodos de ejemplos para la generación de anticuerpos monoclonales

Métodos de ejemplo para la generación de anticuerpos monoclonales (MAbs) comienzan generalmente a lo largo de las mismas líneas que las usadas para la preparación de anticuerpos policlonales. En resumen, un anticuerpo policlonal se prepara inmunizando un animal con una composición LEE o CEE de acuerdo con la presente invención y recolectando los antisueros de ese animal inmunizado.

Puede utilizarse un amplio rango de especies animales para producción de antisueros. Típicamente el animal utilizado para la producción de antisueros es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una cabra. La selección del animal puede decidirse de acuerdo con la facilidad de manipulación, costes o la cantidad deseada de suero, así como es conocido para una persona experimentada en la técnica. Los anticuerpos de la invención también pueden ser producidos por vía transgénica a través de la generación de un mamífero o planta que sea transgénica para la secuencias de cadena pesada y liviana de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir de la misma. En conexión con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos pueden ser producidos en, y recuperados desde, la leche de cabras, de vacas u otros mamíferos. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 827,690, 5, 756,687, 5,750, 172 y 5, 741,957.

También como es conocido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición inmunogénica particular puede potenciarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmune, conocido como adyuvantes. Adyuvantes adecuados incluyen todos los compuestos inmunoestimuladores aceptables, tales como citoquinas, quimioquinas, cofactores, toxinas, plasmodia, composiciones sintéticas o LEE o CEE que codifican tales adyuvantes.

Los adyuvantes que pueden ser utilizados incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ-interferón, GMCSP, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos MDP tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A, y el inmunofosforil lípido A (MPL). El RIBI que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, trealosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS) en una emulsión al 2% de escualeno/Tween 80 también se contemplan aquí. Pueden utilizarse incluso antígenos MHC. Adyuvantes de ejemplo frecuentemente preferidos incluyen el adyuvante de Freund completo (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene Mycobacterium tuberculosis mueros), adyuvantes de Freund incompletos y adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Además de los adyuvantes, puede ser deseable coadministrar modificadores de la respuesta bilógica (BRM), los cuales han demostrado superregular la inmunidad de las células T o subregular la actividad de las células supresoras. Tales BRM incluyen, pero no se limitan a, cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); ciclofosfamida en baja dosis (CYP; 300 mg/m^2) (Johnson/Mead, NJ), citoquina tales como γ-interferón, IL-2 e IL-12 o genes que codifican proteínas involucradas en las funciones auxiliares inmunes tales como B-7.

La cantidad de composición inmunogénica utilizada en la producción de anticuerpos policlonales varía dependiendo de la naturaleza del inmunogéno así como del animal utilizado para la inmunización. Puede utilizarse una variedad de rutas para administrar el inmunogéno incluyendo pero no limitándose sea subcutáneas, intramusculares, intradérmicas, intraepidérmicas, intravenosas o intraperitoneales. La producción de anticuerpos policlonales puede monitorearse muestreando sangre del animal inmunizado en diversos puntos después de la inmunización.

Puede darse también una segunda dosis potenciadora (por ejemplo, provista en una inyección). El proceso de potenciar y titular es repetido hasta que se alcanza un titulo adecuado. Cuando se obtiene un nivel adecuado de inmunogenicidad, el animal inmunizado puede ser sangrado y el suero aislado y almacenado, y el animal puede ser utilizado para generar MAbs.

Para la producción de anticuerpos policlonados de conejo, el animal puede ser sangrado a través de una vena de la oreja o alternativamente por punción cardiaca. La sangre removida se deja coagular y luego se centrifuga para separar componentes del suero de células enteras y coágulos sanguíneos. El suero puede ser utilizado como tal para diversas aplicaciones o incluso la fracción de anticuerpos deseada puede ser purificada por métodos bien conocidos, tales como cromatografía de afinidad utilizando otro anticuerpo, un péptido enlazado a una matriz sólida, o usando, por ejemplo, cromatografía de proteína A o proteína G.

El MAbs puede ser preparado fácilmente a través del uso de técnicas bien conocidas, tales como las ejemplificadas en la Patente de los Estados Unidos 4, 196,265. Típicamente, esta técnica involucra inmunizar un animal adecuado con una composición inmunogénica seleccionada, por ejemplo una proteína, polipéptido, péptido o dominio purificados o parcialmente purificados, sean de tipo silvestre o de composición mutante. La composición de inmunización se administra de una manera efectiva para estimular las células productoras de anticuerpos.

Los métodos para generar anticuerpos monoclonales (MAbs) comienzan generalmente junto con las mismas líneas que para preparar anticuerpos policlonales. Roedores tales como ratones y ratas son animales preferidos, sin embargo, también es posible el uso de células de conejo, oveja o rana. El uso de ratas puede proveer ciertas ventajas (Goding, 1986, pp. 60 61), pero se prefieren los ratones, siendo el ratón BALB/c el más preferido y es el más utilizado rutinariamente y generalmente da un porcentaje más alto de fusiones estables.

Los animales son inyectados con antígeno, generalmente como se describe anteriormente. El antígeno puede ser mezclado con adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo o incompleto. Las administraciones potenciadoras con el mismo antígeno o ADN que codifica el antígeno se presentaría en aproximadamente con intervalo de dos semanas.

Después de la inmunización, las células somáticas con el potencial de producir anticuerpos, específicamente linfocitos B (células B), se seleccionan para uso en el protocolo de generación de MAb. Estas células pueden ser obtenidas a partir de vasos, amígdalas o nódulos linfáticos sometidos a biopsia, o a partir de una muestra de sangre periférica. Las células de vaso o las células de sangre periférica son las preferidas, la primera porque es una fuente rica de células productoras de anticuerpos que están en una etapa de plasmablasto en división, y las últimas porque la sangre periférica es fácilmente accesible.

Frecuentemente, se abra inmunizado un panel de animales y se retirará el bazo de un animal con el título de anticuerpos más alto y los linfocitos de bazo obtenidos por homogenización del bazo con una jeringa. Típicamente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente 5×10^7 hasta 2×10^8 linfocitos.

Los linfocitos B productores de anticuerpos de los animales inmunizados son fusionados entonces con células de una célula de mieloma inmortal, generalmente una de la misma especie del animal que fue inmunizado. Las líneas celulares de mieloma adecuadas para uso en los procedimientos de fusión productores de hibridoma preferiblemente no son productoras de anticuerpos, tienen alta eficiencia de fusión y deficiencias en enzimas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos los cuales soportan el crecimiento solamente de las células fusionadas deseadas (hibridomas).

Puede utilizarse cualquiera de un cierto número de células de mieloma, como las que son conocidas para los experimentados en la técnica (Coding, pp. 65 66, 1986; Campbell, pp. 75 83, 1984). (Citas). Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, se pueden utilizar P3 X63/Ag8, X63 Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210 Ag14, FO, NSO/U, MPC 11, MPC11 X45 GTG 1.7 y S 194/5XXOBul; para ratas se puede usar R210.RCY3, Y3 Ag 1.2.3. IR983F y 4B210; y U 266, GM 1500 GRG2, LICR LON HMy2 y UC729 6 son útiles en relación con fusiones de células humanas. Véase Yoo et al., J Immunol Methods. 2002 Mar 1; 261(1-2):I-20, para una discusión de sistemas de expresión de mielomas.

Una célula de mieloma murínico preferida es la línea celular de mieloma NS-1 (también denominada P3-NS-1-Ag4-1), la cual es fácilmente disponible del NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository requiriendo el número de repositorio de línea celular GM3573. Otra línea celular de mieloma de ratón que puede ser utilizada es la línea celular no productora de SP2/0 de mieloma murínico de ratón resistente a 8 azaguanina.

Los métodos para generar híbridos de células de bazo o nódulos linfáticos que producen anticuerpos y células de mieloma comprenden usualmente mezclar células somáticas con células de mieloma en una proporción 2:1, si bien la proporción puede variar desde aproximadamente 20:1 hasta aproximadamente 1:1, respectivamente, en la presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que promueven la fusión de las membranas celulares. Los métodos de fusión que utilizan virus Sendai han sido descritos por Kohler y Milstein (1975; 1976), y los que utilizan polietilen glicol

(PEG), tales como PEG al 37% (v/v), de Geffer et al., (1977). También se han apropiado los métodos de fusión inducida eléctricamente (Goding pp. 71 74, 1986).

Los procedimientos de fusión producen usualmente híbridos viables a bajas frecuencias, aproximadamente 1x 10^{-6} hasta 1 x 10^{-8}. Sin embargo, esto no plantea un problema, puesto que los híbridos viables fusionados se diferencian de las células progenitoras no fusionadas (particularmente las células de mieloma no fusionadas que normalmente continuarían dividiéndose indefinidamente) haciendo el cultivo en un medio selectivo. El medio selectivo generalmente es uno que contiene un agente que bloque la síntesis de novo de nucleótidos en medio de cultivo de tejidos. Agentes de ejemplo y preferidos son aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis de novo tanto de purinas como de pirimidinas, mientras que la azaserina bloquea solamente la síntesis de purina. Cuando se usa aminopterina o metotrexato, el medio es suplementado con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT) cuando se utiliza azaserina, el medio es complementado con hipoxantina.

El medio de selección preferido es HAT. Solamente las células capaces de operar rutas silvestres de nucleótidos son capaces de sobrevivir en un medio HAT. Las células de mieloma son defectuosas en sus enzimas clave de la ruta silvestre, por ejemplo, la hipoxantina fosforribocil transferasa (HPRT), y no pueden sobrevivir. Las células B pueden operar esta ruta, pero tienen un barrido de vida limitado en cultivo y generalmente mueren al cabo de dos semanas aproximadamente. Por lo tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en los medios selectivos son aquellos híbridos formados a partir de mieloma y células B.

Este cultivo provee una población de hibridomas a partir de la cual se seleccionan los hibridomas específicos. Típicamente, la selección de hibridomas se lleva a cabo cultivando las células por dilución de clon individual en placas de microtitulación, seguida por prueba de los sobrenadantes clonales individuales (aproximadamente después de dos a tres semanas) para la reactividad deseada. El ensayo debe ser sensible, simple y rápido, tal como los radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, ensayos de citotoxicidad, ensayos en placa, ensayos de inmunoenlazamiento por precipitación y similares.

Los hibridomas seleccionados serian diluidos entonces en serie y clonados en líneas celulares productoras de anticuerpos, clones que pueden ser propagados indefinidamente para proveer MAbs. Las líneas celulares pueden ser explotadas para la producción de MAbs de dos maneras básicas. Primero, puede inyectarse una muestra del hibridoma (frecuentemente en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que fue utilizado para proveer las células somáticas y de mieloma para la fusión original (por ejemplo, un ratón singenésico). Opcionalmente, los animales son cebados con un hidrocarburo, especialmente aceites tales como pristano (tetrametilpentadecano) antes de la inyección. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido celular fusionado. Los fluidos corporales del animal, tales como suero o el fluido ascites, puede entonces ser inducidos a proveer MAbs en alta concentración. En segundo lugar, las líneas de células individuales pueden ser cultivadas *in vitro*, mientras que los MAbs son secretados de forma natural en el medio de cultivo desde el cual pueden ser obtenidos fácilmente en alta concentración.

Adicionalmente, la expresión de los anticuerpos de la invención (u otras unidades estructurales del mismo) de las líneas de producción celular puede potenciarse utilizando un cierto número de técnicas conocidas. Por ejemplo, la glutamina sintetasa y los sistemas de expresión genética de DHFR son metodologías comunes para potenciar la expresión bajo ciertas condiciones. Clones celulares de alta expresión pueden ser identificados utilizando técnicas convencionales, tales como la clonación en dilución limitada y la tecnología Microdrop. El sistema GS es discutido como un todo o en parte en relación con las Patentes Europeas Nos. 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y la solicitud de Patente Europea No. 89303964.4.

Los MAbs producidos por cualquiera de estos medios pueden ser purificados adicionalmente, si se desea, utilizando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad. Los fragmentos de los anticuerpos monoclonales de la invención pueden ser obtenidos a partir de los anticuerpos monoclonales así producidos por métodos que incluyen digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o por escisión de enlaces disulfuro por reducción química. Alternativamente, los fragmentos de anticuerpos monoclonales abarcados por la presente invención pueden ser sintetizados utilizando un sintetizador de péptidos automatizado.

También se contempla que se puede utilizar una metodología de clonación molecular para generar monoclonales. Las bibliotecas de fagémidos de inmunoglobulina convencionales pueden prepararse a partir de RNA aislado del bazo del animal inmunizado, y los fagémidos que expresan anticuerpos apropiados se seleccionan por exposición utilizando células que expresen el antígeno y células de control. Las ventajas de esta metodología sobre las técnicas de hibridoma convencionales son que pueden producirse aproximadamente 10^4 veces de anticuerpos y seleccionarse en una ronda sencilla, y que las nuevas especificidades son generadas por combinación de cadenas H y L lo cual incrementa adicionalmente la potencia de encontrar anticuerpos apropiados. En otro ejemplo, pueden utilizarse LEE o CEE para producir antígenos *in vitro* con un sistema libre de células. Pueden utilizarse como objetivos para barrido de bibliotecas de anticuerpos de cadena sencilla. Esto permitiría que muchos anticuerpos diferentes sean identificados muy rápidamente sin el uso de animales.

Un método para producir anticuerpos de acuerdo con la presente invención se encuentra en la Patente de los Estados Unidos No. 6, 091,001, el cual describe métodos para producir una célula que expresa un anticuerpo de una secuencia genómica de la célula que comprende una localización de inmunoglobulina modificada utilizando recombinación específica del sitio mediada por Cre según se divulga. El método involucra primero transfectar una célula productora de anticuerpo con un vector de direccionamiento con homología que comprende un sitio lox y una secuencia de direccionamiento homóloga a la primera secuencia de ADN adyacente a la región de las ubicaciones de inmunoglobulina de la secuencia genómica la cual se va a convertir en una región modificada, de manera que el primer sitio lox esta insertado en la secuencia genómica a través de una recombinación homóloga específica del sitio. Luego la célula es transfectada con un vector de direccionamiento lox que comprende un segundo sitio lox adecuado para la recombinación mediada por Cre con el sitio de lox integrado y una secuencia de modificación para convertir la región de las localizaciones de inmunoglobulina en la región modificada. Esta conversión se lleva a cabo haciendo interactuar los sitios lox con Cre *in vivo*, de tal manera que la secuencia modificadora se inserte en la secuencia genómica a través de la recombinación especifica del sitio mediada por Cre de los sitios lox.

Alternativamente, los fragmentos de anticuerpos monoclonales abarcados por la presente invención pueden sintetizarse utilizando un sintetizador de péptidos automatizado, o por expresión de un gen de longitud completa o de fragmentos del gen en *E. coli*.

f. Conjugados de anticuerpos

La presente invención provee adicionalmente anticuerpos contra proteínas, polipéptidos y péptidos de gpl9, en general del tipo monoclonal, que están enlazados a al menos un agente para formar un conjugado de anticuerpo. Con el fin de incrementar la eficacia de las moléculas de anticuerpo como agentes de diagnóstico terapéuticos, es convencional enlazar o enlazar covalentemente o complejar al menos una molécula o unidad estructural deseadas. Tal molécula o unidad estructural puede ser, pero no se limita a, al menos una molécula efectora o informadora. Las moléculas efectoras comprenden moléculas que tienen una actividad deseada, por ejemplo actividad citotóxica. Ejemplos no limitantes de moléculas efectoras que han sido unidas a anticuerpos incluyen toxinas, agentes antitumorales, enzimas terapéuticas, nucleótidos radiomarcados, agentes antivirales, agentes quelantes, citoquinas, factores de crecimiento y oligo o polinucleótidos. En contraste, una molécula informadora se define como cualquier unidad estructural que puede ser detectada utilizando una prueba. Ejemplos no limitantes de moléculas informadoras que han sido conjugadas con anticuerpos incluye enzimas, radiomarcadores, haptenos, marcadores fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas luminiscentes, moléculas con fotoafinidad, partículas o ligandos coloreados, tales como biotina.

Cualquier anticuerpo de selectividad, especificidad o afinidad suficiente puede ser empleado como la base de un conjugado de anticuerpo. Tales propiedades pueden ser evaluadas utilizando metodologías de barrido de inmunológico convencional conocidos para los experimentados en el arte. Los sitios para enlazar moléculas biológicas activas en la molécula del anticuerpo, además de los sitios de enlazamiento canónicos del antígeno incluyen sitios que reciben el dominio variable que puede enlazar patógenos, superantígenos de células B, el correceptor de células T y la envoltura de CD4 y de VHI-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). Además, el dominio variable está involucrado en autoenlazamiento de anticuerpos (Kang et al., 1988) y contiene epítopos (idiotopos) reconocidos por anticuerpos (Kohler et al., 1989).

Ciertos ejemplos de conjugados de anticuerpos son aquellos conjugados en los cuales el anticuerpo está enlazado a un marcador detectable. “Marcadores detectables” son compuestos y/o elementos que pueden ser detectados primero con base en sus propiedades funcionales específicas y/o características químicas, cuyo uso permite que el anticuerpo al cual se han unido sea detectado, y/o cualificado posteriormente si se desea. Otro ejemplo tal es la formación de un conjugado que comprende un anticuerpo enlazado a un agente citotóxico y células, y puede ser denominado “inmunotoxinas”.

Otros conjugados se prefieren en general para uso como agentes de diagnóstico. El diagnóstico con anticuerpos en general se divide en dos clases, una para uso en diagnóstico *in vitro*, tal como una variedad de inmunoensayos y/o aquellos para uso en protocolos de diagnóstico *in vivo*, conocido generalmente como “imágenes dirigidas de anticuerpos”.

Muchos agentes de imágenes apropiados son conocidos en la técnica, como lo son los métodos para a enlazamiento de anticuerpos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos. 5, 021,236; 4, 938,948 y 4, 472,509. Las unidades estructurales de imágenes utilizadas pueden ser iones paramagnéticos, isotopos radioactivos, fluorocromos, sustancias detectables por NMR; imágenes por rayos X.

En el caso de iones paramagnéticos se podrían mencionar a manera de ejemplo iones tales como cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II) cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y/o erbio (III), siendo particularmente preferido el gadolinio. Los iones útiles en otros contextos, tales como imágenes por rayos X, incluyen pero no se limitan a lantano (III), oro (III), plomo (II) y especialmente bismuto (III).

En el caso de isotopos radioactivos para aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico, se pueden mencionar astatina^{211}, ^{14}carbono, ^{51}cromo, ^{36}cloro, ^{57}cobalto, ^{58}cobalto, cobre^{67}, ^{152}Eu, galio^{67}, ^{3}hidrógeno, yodo^{123}, yodo^{125}, yodo^{131}, indio^{111}, ^{59}hierro, ^{32}fósforo, renio^{186}, renio^{188}, ^{75}selenio, ^{35}azufre, tecnecio^{99m} y/o itrio^{90}. ^{125}I es otro que está siendo preferido para uso en ciertas aplicaciones, y el tecnecio^{99m} y/o indio^{111} también son preferidos frecuentemente debido a su baja energía y adecuabilidad para detecciones de largo rango. Los anticuerpos monoclonales marcados radioactivamente de la presente invención pueden producirse de acuerdo con métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser yodados por contacto con yoduro de sodio y/o potasio y un agente oxidante químico tal como hipoclorito de sodio, o un agente oxidante enzimático tal como lactoperoxidasa. Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden ser marcados con tecnecio99m por procesos de intercambio de ligando, por ejemplo, reduciendo el pertechnato con solución estannosa, haciendo quelación del tecnecio reducido sobre una columna Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna. Alternativamente, pueden utilizarse técnicas de marcación directa, por ejemplo, incubando el pertechnato, un agente reductor tal como $SnCl_2$, una solución reguladora tal como solución de ftalato de sodio y potasio y el anticuerpo. Los grupos funcionales intermediarios que utilizan frecuentemente para enlazar radioisótopos que existen como iones metálicos a anticuerpos son ácido dietilentreaminopentaacético (DTPA) o ácido etilen diaminotetraacético (EDTA).

Entre los marcadores fluorescentes contemplados para uso como conjugados incluyen 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, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rodamina Green, Rodamina Red, Renografin, ROX, TAMRA, TET, tetrametilrodamina y/o Texas Red.

Otro tipo de conjugados de anticuerpos contemplados en la presente invención son aquellos que tienen como objetivo primario la utilización *in vitro*, cuando el anticuerpo esta enlazado a un ligando de enlazamiento secundario y/o a una enzima (una etiqueta de enzima) lo que generará un producto coloreado por contacto con un sustrato cromogénico. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen ureasa, fosfatasa alcalina (de rábano) hidrógeno peroxidasa o glucosa oxidasa. Ligandos de enlazamiento secundarios preferidos son biotina y/o avidina y compuestos de estreptavidina. El uso de tales marcadores es bien conocido para los experimentados en la técnica y están descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,241.

Aún otro método conocido de enlazamiento específico al sitio de moléculas a anticuerpos comprende la reacción de anticuerpos con marcadores de afinidad basados en haptenos que reaccionan con aminoácidos en el sitio de enlazamiento del antígeno destruyendo por lo tanto este sitio y bloqueando la reacción específica del antígeno. Sin embargo, esto puede no ser ventajoso puesto que da como resultado una pérdida de enlazamiento al antígeno por parte del conjugado anticuerpo.

Moléculas que contienen grupos azido pueden ser utilizados para formar enlaces covalentes a proteínas a través de intermediarios de nitreno reactivos que son generados por luz ultravioleta de baja intensidad (Potter & Haley, 1983). En particular, se han utilizado análogos de nucleótidos de purina 2-y 8- azido como fotosondas dirigidas al sitio para identificar proteínas de enlazamiento de nucleótidos en extractos celulares crudos (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985). Los nucleótidos 2- y 8- azido han sido utilizados para mapear dominios de enlazamiento de nucleótidos de proteína purificadas (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; y Dholakia et al., 1989) y pueden ser utilizados como agentes de enlazamiento de anticuerpos.

Se conocen varios métodos en la técnica para el enlazamiento o conjugación de un anticuerpo a su unidad estructural conjugada. Algunos métodos de enlazamiento involucran el uso de un complejo quelato o metálico que emplea, por ejemplo, un agente quelatante orgánico tal como anhídrido de ácido dietiltetraminopentaacético (DTPA); ácido etilentriaminotetraacético; N-cloro-p-toluenosulfonamida; y/o tetracloro-3α-6α-difenilglicouril-3 enlazado al anticuerpo (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4, 472,509 y 4, 938,948). Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como glutaraldehído o peryodato. Los conjugados con marcadores de fluoresceína se preparan en presencia de estos agentes de acoplamiento o por reacción con un isotiocianato. En la Patente de los Estados Unidos 4, 938,948, la generación de imágenes de tumores de seno se logra utilizando anticuerpos monoclonales y las unidades estructurales de imágenes detectables se enlazan al anticuerpo utilizando enlazantes tales como N-succinimidil-3-(4-hidroxifenil) propionato.

La derivación de inmunoglobulinas por introducción selectiva de grupos sulfhidrilo en la región Fc de una inmunoglobulina, utilizando condiciones de reacción que no alteran el sitio de combinación del anticuerpo puede contemplarse. Los conjugados de anticuerpos producidos de acuerdo con esta metodología son divulgados para exhibir longevidad, especificidad y sensibilidad mejoradas (Patente de los Estados Unidos No. 5, 196,066). En el enlazamiento específico al sitio de moléculas efectoras o informadoras, cuando la molécula reportadora o efectora están conjugadas a un residuo de carbohidratos en la región Fc también ha sido divulgada en la literatura (O´Shannessy et al., 1987). Esta metodología ha sido reportada para producir diagnósticamente y terapéuticamente anticuerpos prometedores que son frecuentes en la evaluación clínica.

Adicionalmente, los anticuerpos anti gp36 pueden ser enlazados a nanocristales de un semiconductor tal como los descritos en las Patentes de los estados Unidos Nos. 6,048,616; 5,990,479; 5,690,807; 5,505,928; 5,262,357; así como la Publicación PCT No. 99/26299 (publicada el 27 mayo de 1999). En particular, materiales de ejemplo para uso como nanocristales de semiconductores en las pruebas biológicas y químicas de la presente invención, incluyen pero no se limitan a los descritos anteriormente, incluyendo semiconductores del grupo II-VI, III-V y IV tales 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, AlS, AlP, AlSb, PbS, PbSe, Ge y Si y mezclas ternarias o cuaternarias de los mismos. Los métodos para enlazar nanocristales de semiconductor a anticuerpos están descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6, 630,307 y 6, 274,323.

G. Métodos de inmunodetección

En realizaciones aún adicionales, la presente invención se relaciona con métodos de inmunodetección para enlazar, purificar, remover, cuantificar y/o de alguna otra manera detectar en general componentes biológicos tales como polipéptidos inmunorreactivos. Los anticuerpos preparados de acuerdo con la presente invención pueden emplearse para detectar proteínas, polipéptidos y/o péptidos de tipo silvestre y/o mutante. El uso de anticuerpos de tipo silvestre y/o mutante está contemplado. Algunos métodos de inmunodetección incluyen ensayos de enlazamiento con inmunoabsorbente por enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunorradiométrico, fluoroinmunoensayo, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente e inmunoprecipitación Western para mencionar algunos pocos. Las etapas de diversos métodos de inmunodetección útiles han sido descritas en la literatura reciente, tal como, por ejemplo, Doolittle MH y Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B Y Galand P, 1993; De Jager R et al., 1993; y Nakamura et al., 1987.

En general, los métodos de inmunoenlazamiento incluyen la obtención de una muestra de la que se sospecha contiene proteína, polipéptido y/o péptido, y poner en contacto la muestra con un primer anticuerpo anti-gp19 de acuerdo con la presente invención, tal como el caso puede ser, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de inmunocomplejos.

Estos métodos incluyen métodos para purificar proteínas, polipéptidos y/o péptidos tipo silvestre y/o mutantes, tal como puede ser empleado en la purificación de proteínas, polipéptidos y/o péptidos de tipo silvestre y/o mutante a partir de muestras de pacientes y/o para purificar proteínas, polipéptidos y/o péptidos tipo silvestre o mutante expresados de forma recombinante. En estas instancias, el anticuerpo remueve el componente de proteína, polipéptido y/o péptido tipo silvestre y/o mutante de una muestra. El anticuerpo estará enlazado preferiblemente a un soporte sólido, tal como una forma de una matriz de columna, y la muestra de la que se sospecha contener el componente antigénico de proteínas tipo silvestre o mutante será aplicada al anticuerpo inmovilizado. Los componentes no deseados serán lavados de la columna dejando que el antígeno inmunocomplejado al anticuerpo inmovilizado, antígeno de proteína tipo silvestre o mutante sea reconectado retirando la proteína y/o péptido tipo silvestre o mutante de la columna.

Los métodos de inmunoenlazamiento también incluyen métodos para detectar y cuantificar la cantidad de un tipo de proteína tipo silvestre o mutante en una muestra y la detección y cuantificación de cualquier complejo inmune formado durante el proceso de enlazamiento. Aquí, se debería obtener una muestra de la que se sospeche comprende un tipo silvestre o proteína mutante durante el proceso de enlazamiento. Aquí, se debería tener una muestra de la que se sospecha comprende una proteína tipo silvestre o mutante y/o un péptido o sospechar que comprende *E. canis* organismo, y poner en contacto la muestra con un anticuerpo contra un tipo silvestre o mutante, y luego detectar y cuantificar la cantidad de complejos inmunes formados durante las condiciones específicas.

En términos de detección de antígenos, la muestra biológica analizada puede ser cualquier muestra de la que se sospeche cuando tenga un cierto tipo de proteína específica para el antígeno tipo silvestre o mutante, tal como un espécimen, un extracto de tejido homogenizado, una célula, formas separadas y/o purificadas de las composiciones anteriores que contienen las formas de cualquiera de las composiciones anteriores que contienen proteína tipo silvestre o mutante, o incluso cualquier fluido biológico que entra en contacto con un organismo de *E. canis* por infección.

Al poner en contacto la muestra biológica escogida con el anticuerpo bajo condiciones efectivas durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes primarios), es generalmente asunto simplemente de agregar la composición de anticuerpo a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo para que los anticuerpos formen complejos inmunes con, por ejemplo, comunes con, esto es para enlazarse a, cualquiera antígeno de proteína presente. Después de este momento, la composición muestra que un anticuerpo, tal como una sensación de tejido, la placa de ELISA, la inmunoprecipitación dot blot o western, se darán generalmente para retirar cualquiera especie de anticuerpo no enlazado específicamente, permitiendo que solo queden anticuerpos que se enlazan específicamente con los complejos primarios inmunes sean detectados.

En general, la detección de la formación de inmunocomplejos es bien conocida en el arte y puede lograrse a través de la aplicación de numerosas metodologías. Estos métodos se basan generalmente en la detección de una etiqueta o marca, tal como las etiquetas radioactivas fluorescentes, biológicas y enzimáticas. Las Patentes de los Estados Unidos concernientes al uso de tales etiquetas incluyen 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y

4,366,241. Desde luego, uno puede encontrar ventajas adicionales a través del uso de un ligando de enlazamiento secundario tal como un anticuerpo secundario y/o un anticuerpo ligando de avidina con una disposición de enlazamiento de ligando conocida en la técnica.

El anticuerpo empleado en la detección puede ser por si mismo enlazado a una etiqueta detectable, en donde se detectaría simplemente esta etiqueta, permitiendo por lo tanto que pueda determinarse la cantidad de los complejos inmunes primarios en la composición. Alternativamente, el primer anticuerpo, que se enlaza con los primeros complejos inmunes primarios puede ser detectado por medio de un segundo ligando de enlazamiento que tiene afinidad de ligandos para el anticuerpo. En estos casos, el segundo ligando de enlazamiento puede ser enlazado a una etiqueta detectable. El segundo ligando de enlazamiento es por sí mismo frecuentemente un anticuerpo, el cual puede ser así denominado un anticuerpo “secundario”. Los complejos inmunes primarios son puestos en contacto con el ligando etiquetado, de enlazamiento secundario, o anticuerpo, bajo condiciones efectivas durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes secundarios. Los complejos inmunes secundarios son en general lavados para retirar cualquier anticuerpo o ligando secundario doblemente etiquetado no específicamente y la etiqueta restante en el complejo inmune secundario se detecta entonces.

Métodos adicionales incluyen la detección de complejos inmunes primarios mediante una metodología de dos etapas. Un segundo ligando de enlazamiento, tal como un anticuerpo, que tienen afinidad de enlazamiento por el anticuerpo se utilizan para formar complejos inmunes secundarios tal como se describió anteriormente. Después del lavado, los complejos inmunes secundarios son puestos en contacto con un tercer ligando de enlazamiento o anticuerpo que tiene afinidad de enlazamiento por el segundo anticuerpo, de nuevo bajo condiciones efectivas y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de los complejos inmunes (complejos inmunes terciarios). El tercer ligando o anticuerpo está enlazado a un nivel aceptable, permitiendo la detección de los complejos inmunes (complejos inmunes terciarios). El tercer ligando o anticuerpo esta enlazado a una etiqueta detectable permitiendo la detección de los complejos inmunes terciarios así formados. Este sistema puede proveer amplificación de señales si se desea.

Un método de inmunodetección utiliza dos anticuerpos diferentes. En una primera etapa se utiliza un anticuerpo biotinilado, monoclonado policlonal para detectar el antígeno objetivo, y en una segunda etapa se utiliza entonces un anticuerpo para detectar la biotina enlazada a la biotina complejada. En ese método la muestra que se va a probar se incuba primero en una solución que contiene el anticuerpo de la primera etapa. Si el antígeno objetivo está presente, una parte de los anticuerpos se enlazan al antígeno para formar un complejo anticuerpo/antígeno biotinilado. El complejo anticuerpo/antígeno se amplifica entonces por incubación en soluciones sucesivas de estreptavidina (o avidina), ADN biotinilado y/o ADN biotinilado complementario, agregando cada etapa sitios de biotina adicionales al complejo anticuerpo/antígeno. Las etapas de amplificación se repiten hasta que se alcanza un nivel adecuado de amplificación, punto en el cual la muestra se incuba en una solución que contiene el anticuerpo de la segunda etapa contra biotina. Este anticuerpo de la segunda etapa es marcado, por ejemplo con una enzima que pueda ser utilizada para detectar la presencia del complejo anticuerpo/antígeno por histoenzimología utilizando un sustrato cromógeno. Con una amplificación adecuada, puede producirse un conjugado el cual es visible macroscópicamente.

Otro método conocido para la inmunodetección aprovecha la metodología del inmuno PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa). El método de PCR es similar al método de Cantor hasta la incubación con ADN biotinilado, sin embargo, en vez de utilizar ciclos múltiples de incubación con estreptavidina y ADN biotinilado, el complejo ADN/biotina/estreptavidina/anticuerpo se lava con un regulador salino de pH bajo o alto que libera el anticuerpo. La solución del lavado resultante se utiliza entonces para llevar a cabo una reacción de PCR con cebadores adecuados con controles apropiados. Al menos en teoría, la enorme capacidad de amplificación y la especificidad del PCR pueden utilizarse para detectar una molécula individual de antígeno.

Los métodos de inmunodetección de la presente invención tienen utilidad evidente en el diagnóstico y prognosis de condiciones tales como diversas formas de enfermedades hiperproliferativas, tales como cáncer, incluyendo leucemia, por ejemplo. Aquí, se usa una muestra biológica y/o clínica sospechosa de contener una proteína, polipéptido, péptido y/o mutante de tipo silvestre o mutante. Sin embargo, esta realizaciones también tienen aplicaciones en muestras no clínicas, tales como la titulación de muestras de antígenos o anticuerpos, por ejemplo en la selección de hibridomas.

H. ELISA

Como se detallo anteriormente, los inmunoensayos, en su sentido más simple y/o directos son ensayos de enlazamiento. Ciertos inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de ensayos de inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA) y/o radioinmunoensayos (RIA) conocidos en la técnica. La detección inmunoquímica que utiliza secciones de tejido también es particularmente útil. Sin embargo, será fácilmente evidente que la detección no está limitada a tales técnicas, y también pueden utilizarse inmunoprecipitación Western, inmunoprecipitación por punto, análisis FACS y/o similares.

En una ELISA de ejemplo, los anticuerpos de la invención se inmovilizan sobre una superficie seleccionada que exhibe afinidad por las proteínas, tal como un pozo en una placa de poliestireno para microtitulación. Luego, una composición de prueba sospechosa de contener el antígeno de la proteína tipo silvestre y/o mutante, tal como una muestra clínica,

se agrega a los pozos. Después de enlazar y/o lavar para eliminar complejos inmunes enlazados no específicamente, puede enlazarse el antígeno de proteína enlazado tipo silvestre y/o mutante. La detección se logra generalmente mediante la división de otro anticuerpo que esta enlazado a un marcador detectable. Este tipo de ELISA es una “ELISA en sándwich” simple. La detección también puede lograrse mediante la división de un segundo anticuerpo, seguida por la división de un tercer anticuerpo que tiene afinidad de enlazamiento para el segundo anticuerpo, estando enlazado el tercer anticuerpo a un marcador detectable.

En otro ELISA de ejemplo, las muestras sospechosas de contener el antígeno de proteínas tipo silvestre y/o mutante se inmobilizan sobre la superficie del pozo y/o se ponen en contacto con los anticuerpos de la invención. Después de enlazar y/o lavar para retirar complejos inmunes enlazados no específicamente, se detectan los anticuerpos enlazados. Cuando los anticuerpos iniciales están anlazados a un marcador detectable, los complejos inmunes pueden ser detectados usando un segundo anticuerpo que tiene afinidad de enlazamiento por el primer anticuerpo, estando enlazado el segundo anticuerpo s un marcador detectable.

Otra ELISA en la cual las proteínas, polipéptidos y/o péptidos tipo silvestre y/o mutante están inmovilizados, involucra el uso de la competición de los anticuerpos en la detección. En esta ELISA, los anticuerpos marcados contra proteína tipo silvestre mutante se agregan a los pozos, se dejan enlazar, y/o se detectan por medio de su marcador. La cantidad de antígeno de proteína tipo silvestre o mutante en una muestra desconocida se determina entonces mezclando la muestra con los anticuerpos marcados contra tipos silvestre y/o mutante antes y/o durante la incubación de los pozos recubiertos. La presencia de proteína tipo silvestre y/o mutante en la muestra actúa para reducir la cantidad de anticuerpo contra la proteína tipo silvestre mutante disponible para enlazarse en el pozo y así reduce la señal final. Esto también es apropiado para detectar anticuerpos contra proteína tipo silvestre y/o mutante en una muestra desconocida, donde los anticuerpos no marcados se enlazan a los pozos recubiertos con antígeno y también reduce la cantidad de antígeno disponible para enlazarse a los anticuerpos marcados.

Con independencia de formación empleado, los ELISA tienen ciertas características en común, tales como el recubrimiento, incubación y enlazamiento, lavado para eliminar especies enlazadas no específicamente, y detección de los complejos inmunes enlazados. Estos se describen a continuación.

Para recubrir una placa bien sea con antígeno o anticuerpo, generalmente se incuban los pozos de la placa con una solución del antígeno o anticuerpo, bien sea durante la noche o durante un periodo especificado de horas. Los pozos de la placa serán lavados entonces para eliminar material adsorbido de manera incompleta. Cualquier superficie disponible remanente de los pozos es entonces “recubierta” con una proteína no especifica que es antigénicamente neutra con respecto a los antisueros de prueba. Estas incluyen albumina de suero bovino (BSA), caseína o soluciones de leche en polvo. El recubrimiento permite bloquear sitios de adsorción no específicos sobre la superficie inmovilizante y así reduce la señal de fondo causada por el enlazamiento no específico de antisueros sobre la superficie.

En ELISA, probablemente es más habitual utilizar un medio de detección secundario o terciario en vez de un procedimiento directo. Así, después de enlazar una proteína o anticuerpo al pozo, el recubrimiento con un material no reactivo para reducir la señal de fondo, y el lavado para eliminar material no enlazado, la superficie de inmovilización se pone en contacto con la muestra bilógica para ser probada bajo condiciones efectivas para permitir la formación de un complejo inmune (antígeno/anticuerpo). La detección del complejo inmune requiere un ligando o anticuerpo de enlazamiento secundario marcado, y un ligando o anticuerpo de enlazamiento secundario en conjunción con un anticuerpo terciario marcado o un tercer ligando de enlazamiento.

“Bajo condiciones selectivas para permitir la formación del complejo inmune (antígeno/anticuerpo)” significa que las condiciones preferiblemente incluyen la dilución de los antígenos y/o anticuerpos con soluciones tales como BSA, gamma globulina bovina (BGG) o solución salina reguladora de fosfato (PBS)/Tween. Estos agentes agregados también tienden a ayudar en la reducción de la señal de fondo no específica.

Las condiciones “adecuadas” también significan que la incubación es a una temperatura o durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el enlazamiento efectivo. Las etapas de incubación van típicamente desde aproximadamente 1 a 2 a 4 hora o así, a temperaturas preferiblemente en el orden de 25ºC a 27ºC, o puede ser durante la noche a aproximadamente 4ºC o similar.

Siguiendo todas las etapas de incubación en un ELISA, la superficie en contacto es lavada de tal forma que se elimine el material no complejado. Un procedimiento de lavado preferido incluye lavado con una solución tal como PBS/Tween, o un regulador de borato. Después de la formación de complejos inmunes específicos entre la muestra de prueba y el material enlazado originalmente, y lavado subsecuente, puede determinarse la presencia de incluso cantidades diminutas de los complejos inmunes.

Para proveer un medio de detección, el segundo o tercer anticuerpo tendrán un marcador asociado para permitir la detección. Preferiblemente, este será una enzima que genere desarrollo de color por incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Así, por ejemplo, se deseará poner en contacto o incubar el primero o segundo complejo

inmune con una ureasa, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina o un anticuerpo hidrógeno peroxidasa conjugado durante un periodo de tiempo bajo condiciones que favorezcan el desarrollo de la formación del complejo inmune adicional (por ejemplo, incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como PBS-Tween).

Después de la incubación con el anticuerpo marcado, y subsiguiente al lavado para eliminar el material enlazado, la cantidad de marcadores cuantificada, por ejemplo, por incubación con un sustrato cromogénico tal como urea, o purpura de bromocresol, o 2,2´-azino-di-(ácido 3-etilbenztiazolin-6-sulfónico (ABTS), o H_2O_2, en el caso de la peroxidasa como marcador enzimático. La cuantificación se logra entonces midiendo el grado de color generado, por ejemplo, utilizando un espectrofotómetro de espectro visible.

I. Inmunohistoquímica

Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser utilizados en conjunción con bloques de tejido embebidos en parafina frescos congelados y/o fijados con formalina preparados para estudio por inmunohistoquímica (IHC). El método para preparar bloques de tejidos de estos especímenes en partículas ha sido usado exitosamente en estudios de IHC previos de diversos factores de prognosis, y/o es bien conocido para los experimentados en la técnica (Brown et al., 1990: Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990).

En resumen , pueden prepararse secciones congeladas rehidratando 50 ng de tejido congelado “pulverizado” a temperatura ambiente en solución salina regulada de fosfato (PBS) en pequeñas cápsulas plásticas. Se aglomeran las partículas por centrifugación. Se resuspenden en un medio de embebimiento viscoso (OCT); se invierte la cápsula y/o la pella de nuevo por centrifugación; se congela instantáneamente en isopentano a 70ºC; se corta la cápsula plástica y/o se retira el cilindro congelado de tejido; se asegura el cilindro de tejido sobre la mandíbula de un criostato micrótomo; y/o se cortan 25–50 secciones en serie.

Pueden prepararse secciones permanentes por un método similar que involucra la rehidratación de 50 mg de muestra en un tubo plástico de microcentrífuga. Se aglomera; se suspende en formalina al 10% durante 4 horas de fijación. Se lava/aglomera; se resuspende en agar caliente al 2.5%; se aglomera; se enfría en agua con hielo para endurecer el agar; se elimina el bloque de tejido/agar del tubo; se infiltra y/o embebe el bloque en parafina; y/o se cortan hasta 50 secciones en serie permanentes.

J. Microscopía inmunoelectrónica

Los anticuerpos de la presente invención también pueden utilizarse en conjunción con la microscopía electrónica para identificar componentes intracelulares de los tejidos. En resumen, se conjuga un marcador electrónicamente denso directa o indirectamente con el anticuerpo. Ejemplos de marcadores electrónicamente densos de acuerdo con la invención son la ferritina y el oro. El marcador electrónicamente denso absorbe electrones y puede ser visualizado por el microscopio electrónico.

K. Kits de inmunodetección

En realizaciones aún adicionales, la presente invención se relaciona con kits de inmunodetección para uso con los métodos de inmunodetección descritos anteriormente. Puesto que los anticuerpos se utilizan en general para detectar proteínas, polipéptidos y/o péptidos tipo silvestre y/o mutante, los anticuerpos se incluirán preferiblemente en el kit. Sin embargo pueden proveerse kits que incluyen ambos componentes. Los kits de inmunodetección comprenderán así, en medios de contención adecuados, un primer anticuerpo que se enlaza a una proteína, polipéptido y/o péptido tipo silvestre y/o mutante, y/o opcionalmente, un reactivo de inmunodetección y/o también opcionalmente, una proteína, polipéptido y/o péptido tipo silvestre y/o mutante.

En realizaciones preferidas se utilizarán anticuerpos monoclonales. En algunas de ellas el primer anticuerpo que se enlaza a la proteína, polipéptido y/o péptido tipo silvestre y/o mutante puede ser preenlazada a un soporte sólido, tal como una matriz de columna y/o una placa de microtitulación.

Los reactivos de inmunodetección del kit pueden tener alguna de una gran variedad de formas, incluyendo los marcadores detectables que están asociados con y/o enlazados al anticuerpo dado. Los marcadores detectables que están asociados con y/o enlazados a un ligando de enlazamiento secundario también se contemplan aquí. Ligandos secundarios de ejemplo son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de enlazamiento por el primer anticuerpo.

Reactivos de inmunodetección adecuados adicionales para el uso en los presentes kits incluyen el reactivo de dos componentes que comprende un anticuerpo secundario que tiene afinidad de enlazamiento por el primer anticuerpo, junto con un tercer anticuerpo que tiene afinidad de enlazamiento por el segundo anticuerpo, estando enlazado el tercer anticuerpo a un marcador detectable. Como se anoto anteriormente, se conoce un cierto número de marcadores de ejemplo en la técnica y/o tales marcadores pueden ser empleados en relación con la presente invención.

Los kits pueden comprender adicionalmente una composición adecuadamente separada en alícuotas de la proteína, polipéptido y/o péptido tipo silvestre y/o mutante, bien sea marcado y/o no marcado, tal como se puede utilizar para preparar una curva estándar para un ensayo de detección. Los kits pueden contener conjugados anticuerpo-marcador bien sea en forma completamente conjugada, en la forma de intermediarios, y/o como unidades estructurales separadas para ser conjugadas por el usuario del kit. Los componentes de los kit pueden ser empacados bien sea en medios acuosos y/o en forma liofilizada.

Los medios de contenedor de los kits serán alojados adecuadamente e incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa y/o otros medios de contención, en los cuales puede colocarse el anticuerpo, y/o preferiblemente, separados en alícuotas adecuadas. Cuando se provee proteína, polipéptido y/o péptido de proteína gp19 tipo silvestre o mutante, y/o un segundo y/o un tercer ligando de enlazamiento y/o un componente adicional, el kit también contendrá en general un segundo, tercero y/o otro contenedor adicional dentro del cual puede colocarse este ligando y/o componente. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el anticuerpo, antígeno y/o cualquier otros contenedores de reactivos en un confinamiento cerrado para venta comercial. Tales contendores pueden incluir contenedores de plástico moldeados por inyección y/o soplado en los cuales se retienen los viales.

VIII. Preparaciones farmacéuticas

También se contempla aquí pueda preparase composiciones farmacéuticas utilizando las novedosas composiciones de la presente invención. En tal caso, la composición farmacéutica comprende la composición novedosa activa de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una persona con experiencia normal en esta técnica será fácilmente capaz de determinar, sin experimentación indebida, las dosificaciones y rutas de administración apropiadas del componente activo de la presente invención.

La expresión “farmacéuticamente aceptables” se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica o similar cuando se administran a un sujeto. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien entendida en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, bien sea como soluciones o suspensiones líquidas; las formas sólida adecuadas para solución, o suspensión en líquidos antes de la inyección también pueden ser preparadas. Esta preparación puede ser emulsificada también.

En general, una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un polipéptido, polinucleótido, o anticuerpo de gp19 de *E. canis* y/o mezcla de los anteriores.

Una proteína puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición ácida (formada con los grupos de aminoácidos libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

Por formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con las formulaciones de dosificación y en tal cantidad que sean terapéuticamente efectivas. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser regulada adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido debe hacerse inicialmente isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal. En relación con esto, los medios estériles acuosos, los cuales pueden ser empleados, serán conocidos para las personas de experiencia en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría ser disuelta en 1 mL de solución NaCl isotónica y luego agregarse a 1000 mL de fluido hipodermoclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo “Remington´s Pharmaceutical Sciences” 15ht Edition, pages 1035–1038 y 1570–1580). Ocurrirá necesariamente algún tipo de variación en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier evento, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad efectiva de uno o más agentes que apunten a un polipéptido o secreción del mismo o agente adicional disuelto o disperso en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las expresiones “farmacéutico”, “farmacéuticamente aceptables” o “farmacológicamente aceptables” se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra cuando se administran a un animal, tal como por ejemplo, un humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un agente que apunta hacia el polipéptido o la secreción del mismo y/o ingredientes activos adicionales serán conocidos para los experimentados en la técnica a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica en Remington´s Pharmaceutical Sciences” 18ht Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para

administración en animales (por ejemplo humanos), se entenderá que las preparaciones satisfarán los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y purezas generales tal como lo requiere la FDA Office of Biological Standards.

Tal como se utiliza aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes, (agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglomerantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes endulzantes, agentes saborizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, tal como son conocidos para una persona de experiencia normal en la técnica (véase, por ejemplo, Remington´s Pharmaceutical Sciences 18ht Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Solamente en el caso de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La invención puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si va a ser administrada en forma sólida, líquida o en aerosol, y de si necesita ser estéril para tales rutas de administración como en el caso de la inyección. La presente invención puede ser administrada por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesiones, intracraneal, intraarticular, intraprostáticamente, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravitreal, intravaginal, intrarectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntiva, intravesicular, por vía mucosa, intrapericardial, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, inhalación (por ejemplo inhalación por aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña células objetivo directamente, a través de un catéter, a través de un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo liposomas) o por cualquier otro método o cualquier combinación de los anteriores tal como será conocido por una persona experimentada en la técnica (véase por ejemplo, Remington´s Pharmaceutical Sciences 18ht Ed. Mack Printing Company, 1990).

La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un paciente animal puede determinarse mediante factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, severidad de la condición, el tipo de enfermedad que está siendo tratada, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y la ruta de administración. El practicante responsable de la administración, en cualquier evento, determinará la concentración de ingredientes activos en una composición y las dosis apropiadas para el sujeto individual.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo al menos 0.1% de un compuesto activo. El un compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% hasta aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier rango entre ellos. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender desde aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, aproximadamente 1000 miligramos/kg/peso corporal o más por administración, en cualquier rango derivable dentro del mismo. En ejemplos no limitantes de un rango derivable de los números listados aquí, puede administrarse un rango de aproximadamente 5 mg/kg/ peso corporal hasta aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal hasta aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, con base en los números descritos anteriormente.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante conservantes tales como diversos agentes antibacteriano y antifúngicos, incluyendo pero no limitándose a parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sorbico, timerosal o combinaciones de los anteriores.

La invención puede ser formulada en una composición en forma de base libre, neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de la composición proteinácea, o que se forma con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse a partir de bases inorgánicas tales como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaina.

Cuando la composición esta en forma líquida, un vehículo puede ser un solvente o un medio de dispersión que comprende pero no se limita a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de surfactantes tales como, por ejemplo, hidróxipropilcelulosa; o combinaciones de tales métodos anteriores. En

muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

Se pueden utilizar gotas para ojos, soluciones o aspersiones nasales, aerosoles o inhalantes en la presente invención. Tales composiciones están diseñadas en general para ser compatibles con el tipo de tejido objetivo. En un ejemplo no limitante, las soluciones nasales son usualmente soluciones acuosas diseñadas para ser administradas a los conductos nasales en gotas o aspersión. Las soluciones nasales son preparadas de tal manera que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de tal manera que se mantiene la acción ciliar normal. Así, preferiblemente, las soluciones nasales acuosas son isotónicas o ligeramente reguladas para mantener un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5. Además, pueden incluirse en la formulación conservantes antimicrobianos, similares a los usados en las preparaciones oftálmicas, fármacos o estabilizadores de fármacos apropiados, si se requiere. Por ejemplo, se conocen diversas preparaciones nasales comerciales que incluyen fármacos tales como antibióticos o antihistamínicos.

La composición puede ser preparada por administración por gotas tales como ingestión oral. Aquí, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas (por ejemplo cápsulas de cubierta de gelatina dura o flexible), formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, troches, elíxires, suspensiones, jarabes, galletas, o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales pueden ser incorporadas directamente en el alimento de la dieta. Los vehículos preferidos para la administración oral comprenden diluyentes inertes, vehículos comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. La composición oral puede prepararse como un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir, puede comprender, al menos un agente activo, un agente endulzante, un conservante, un agente saborizante, un colorante, un conservante o combinaciones de los anteriores.

Una composición oral puede comprender uno o más aglomerantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes saborizantes, y combinaciones de los anteriores. Una composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglomerante, tal como por ejemplo, goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato de dicalcio, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los anteriores; un agente de desintegración, tal como por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los anteriores; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente endulzante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los anteriores; un agente saborizante, tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, sabor de cereza, sabor de naranja, etc.; o combinaciones de los anteriores. Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de alguna otra manera la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas, píldoras o cápsulas pueden estar recubiertas con shellac, azúcar o ambos.

Las formulaciones adecuadas que son útiles para otros modos de administración incluyen supositorios. Los supositorios son formas de dosificación sólida de diversos pesos y formas, usualmente medicados para inserción en el recto, vagina o uretra. Después de la inserción, los supositorios se ablandan, funden o disuelven en los fluidos de las cavidades. En general, para los supositorios, los vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles, triglicéridos o combinaciones de los mismos. Los supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen, por ejemplo, el ingrediente activo en el rango de aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 10%, y preferiblemente de aproximadamente 1% hasta aproximadamente 2%.

Las soluciones inyectables estériles se preparan por incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguida por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en el vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacio o liofilización los cuales producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado a partir de un medio líquido congelado filtrado por esterilización de los mismos. El medio líquido debe ser regulado adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido debe hacerse inicialmente isotónico antes de la inyección con solución salina o glucosa suficientes. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa, en donde se prevé el uso de DMSO como solvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, concentraciones altas de administración de los ingredientes activos a un área pequeña.

La composición debe ser estable bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento, y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Será evidente que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse mínimamente a un nivel de seguridad, por ejemplo, menos de 0.5 ng/mg de proteína.

La absorción prolongada de una composición inyectable puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los anteriores.

IX. Kits de ejemplo de la invención

Adicionalmente, puede haber un kit alojado en un contenedor adecuado. El kit puede ser adecuado para diagnóstico, tratamiento y/o protección de un individuo de *Ehrlichia*, tal como *Ehrlichia canis*. El kit puede comprender en un contendor adecuado un agente que direcciona un antígeno gp19 de *E. canis*. El agente puede ser un anticuerpo, una molécula pequeña, un polinucleótido, un polipéptido, un péptido o una mezcla de los anteriores. El agente puede ser provisto en el kit en una forma adecuada, tal como estéril, liofilizado, o ambos, por ejemplo. El kit puede comprender un anticuerpo contra uno o más de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19 (para *E. canis*); y/o proteínas relacionadas de las mismas. Otras composiciones relacionadas inmunogénicas relacionadas con gp19 de *E. canis* (incluyendo polipéptidos, péptidos o anticuerpos) no presentadas específicamente aquí también podrán ser incluidas.

El kit puede comprender adicionalmente uno o más aparatos para administración de una composición a un individuo que así lo requieren. Los aparatos pueden incluir una jeringa, un gotero para ojos, aguja, herramientas de biopsia, escópulas, catéter y así sucesivamente, por ejemplo.

Cuando el kit es empleado para un propósito de diagnóstico, el kit puede proveer adicionalmente una o más composiciones y/o aparatos de detección para identificar un antígeno de gp19 de *E. canis*. Puede emplearse un marcador detectable, tal como por ejemplo un anticuerpo, por ejemplo, y el marcador puede ser fluorescente, radioactivo, quimioluminiscente o colorimétrico, por ejemplo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Será evidente para los experimentados en la técnica que las técnicas divulgadas en los ejemplo que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y así pueden ser consideradas como modos preferidos constituyentes para su práctica.

Ejemplo 1

Materiales y métodos de ejemplo

Cultivo y purificación de *Ehrlichiae.* Se propagó como se describió previamente *E. canis* (cepas Jake, DJ, Demon, Louisiana, Florida, y Sao Paulo) (McBride et al., 2001). La *Ehrlichiae* fue purificada por cromatografía de exclusión por tamaño sobre Sephacryl S-1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.) y se describió previamente (Rikihisa et al., 1992). Las fracciones que contenían bacterias fueron congeladas y utilizadas como fuentes de antígeno y ADN.

Construcción y selección de la biblioteca genómica de *E, canis*. La biblioteca genómica de la cepa Jake de *E. canis* fue construida utilizando una digestión por restricción Hpall y se selecciono como se describió previamente (McBride et al., 2001).

Secuenciamiento de ADN. Los insertos de la biblioteca, plásmidos y productos de PCR fueron secuenciados con un ABI Prism 377XL ADN Sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif.) en University of Texas Medical Branch Protein Chemistry Core Laboratory.

Análisis de glicoproteína. Las alineaciones de ácidos nucleicos y aminoácidos fueron ejecutadas con MegAlign (Lasergene v5,08, ADNstar, Madison, Wis.). Las secuencias de las proteína gp19 de *E. canis* y VLPT de *E. chaffeensis* fueron evaluadas en cuanto a glicosilación enlazada a O y fosforilación potenciales con los algoritmos computacionales YinOYang 1.2 y NetOGlic v3.1 (Julenius et al., 2005). El tándem Repeat Finder (Benson, 1999) fue utilizado para analizar las repeticiones en tándem de los genes que codifican gp19 de *E. canis*. Las secuencias de señal potencial fueron identificadas con el algoritmo computacional SignalP probado sobre bacterias gran-negativas (Nielsen et al., 1997).

Amplificación por PCR de los fragmentos genéticos de gp19 de *E. canis*. Los cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos de genes de gp19 de *E. canis* (gp19, gp19N-terminal, gp19N1, gp19N2, gp19N1-C, gp19C-terminal) fueron diseñados manualmente o utilizando el Primer Select (Lasergene v5.08, ADNstar, Madison Wis.)(Tabla 2). Los fragmentos de gp19 de *E. canis* fueron amplificados utilizando la mezcla PCR Master (F. Hoffmann-LaRoche Ltd, Basilea, Suiza) y el ADN genómico de *E. canis* (cepa Jake) como patrón.

Table 2. Exemplary oligonucleotide primers for amplification of *E. canis* gp19 gene

Recombinant Protein	Forward Primer	Sequence	Reverse Primer	Sequence	Amplicon Size
gp19	P16N-F	5'-CACGTTCAAAATCATGTTGA-3' (SEQ ID NO:1)	P16C-R	5'-CGCACAATCACAACAGTTGT-3(SEQ ID NO:7)	405 bp
gp19N	P16N-F	5'-CACGTTCAAAATCATGTTGA-3' (SEQ ID NO:2)	P16N-R	5'-GCATACTGGTCTTTCCT-3'(SEQ ID NO:8)	222 bp
gp19N1	P16N-F	5'-CACGTTCAAAATCATGTTGA-3' (SEQ ID NO:3)	p19 132-R	5'-AGATACTTCTTGTAACTCCATT-3' (SEQ ID NO:9)	126 bp
gp19N1-C	Small FOR	5'-CATTTTACTGGTCCTACT-3'(SEQ ID NO:41)	p19 132-R	5'-AGATACTTCTTGTAACTCCATT-3' (SEQ ID NO:10)	72 bp
gp19N2	p19 133-F	5'-TCTATTGATAGTGTAGGATGC-3' (SEQ ID NO:5)	P16N-R	5'-GCATACTGGTCTTTCCT-3'(SEQ ID NO:11)	96 bp
gp19C	P16C-F	5'-GCAGGTTTAGAGAGCTT-3'(SEQ ID NO:6)	P16C-R	5'-CGCACAATCACAACAGTTGT-3(SEQ ID NO:12)	180 bp

Clonación y expresión de gp19 recombinante de *E. canis*. Los productos de PCR amplificados fueron clonados directamente en el vector de expresión pBAD/TOPO Thio Fusión® y pCR T7/NT TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) el *E. coli* (TOP10, Invitrogen) fueron transformados con el plásmido que contiene los fragmentos del gp19 de *E. canis*, y los transformantes positivos fueron seleccionados por PCR en cuanto a la presencia del inserto y su orientación y fueron secuenciados para confirmar el marco de lectura de los genes. La expresión de la proteína recombinante fue inducida con arabinosa al 0.2% (pBAD/topo Thio Fusion), o IPTG (pCRT7/NT) utilizando el Overnight Express Autoinduction System I (Novagen, Madison, Wis.). Las bacterias fueron aglomeradas (5.000 x g durante 20 minutos), resuspendidas en PBS, y las proteínas recombinantes fueron purificadas bajo condiciones nativas tal como se describió previamente (Doyle et al., 2005).

Electroforesis en gel e inmunoprecipitación Western. Lisados de células enteras purificadas de *E. canis* o *E. chaffeensis* o proteínas recombinantes fueron separadas por SDS-PAGE, transferidas a nitrocelulosa, y se llevaron a cabo las precipitaciones Western tal como se describe previamente (McBride et al., 2003), excepto que los anticuerpos primarios fueron diluidos (1:500). Los sueros de perro anti *E. canis* o *E. chaffeensis* fueron derivados a partir de perros infectados experimentalmente (#2995 y #2551, respectivamente).

Detección de carbohidratos y composición glicosílica. La detección de glicano en la proteína recombinante gp19 fue llevada a cabo con un kit de detección de glicano DIG (Roche, Indianápolis, IN), tal como se describió anteriormente (McBride et al., 2000). La composición de glicósilo fue determinada por análisis con acetato de alditol en la University of Georgia Complex Carbohydrate Research Center. La glicoproteína fue hidrolizada utilizando ácido trifluoroacético 2 M (TFA; 2 horas en un tubo sellado a 121ºC), reducida con NaBD4 y acetilada utilizando anhídrido acético/TFA. El acetato de alditol resultante fue analizado en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 conectado en interfaz con un detector selectivo de masas 5970 (modo de ionización por impacto de electrones), y la separación se llevo a cabo sobre una columna capilar en silica fundida en fase enlazada Supelco 2330 de 30 metros.

Inmunización de ratones. Se inmunizaron cinco ratones BALB/c (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.) con el gp19 recombinante de *E. canis* (tiofusión; aminoácidos 4 a 137). Se mezclo la proteína recombinante (100 µg) en 0.1 mL con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma, San Luis, Mo.) para la primera inyección intraperitoneal y con adyuvante incompleto de Freund para las inyecciones subsecuentes. Los ratones recibieron inyecciones dos veces en intervalo de dos semanas.

Epítopo del anticuerpo del péptido sintético de gp19 de *E. canis*. Un péptido de 24 aminoácidos (N1-C; HFTGPTSFEVNLSEEEKMELQEVSS; SEQ ID NO: 13) correspondiente a la región que contiene el epítopo de gp19 de *E. canis* fue sintetizada por Bio Synthesis, Inc. (Lewisville, Tx).

Ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA). Se recubrieron placas ELISA (Nunc-Immuno™ Plates with MaxiSorp™ Surface, NUNC, Roskilde, Denmark) con proteína o péptido recombinante (1.25 µg/pozo, 100 µL) en solución salina regulada con fosfato (PBS). Se adsorbió el antígeno sobre placas de ELISA durante la noche a 4ºC con agitación suave y subsecuentemente se lavo tres veces con 200 µL de solución salina regulada con Tris con Tween 20 (0.2%) (TBST), se bloqueo con BSA al 3% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y se lavo de nuevo. El suero canino convalescente anti *E. canis* (1:4000) diluido en BSA TBST al 3% fue agregado a cada pozo (100 µL) y se incubo a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Las placas fueron lavadas cuatro veces, y se agregó un anticuerpo secundario de cabra anti perro IgG (H+L) marcado con fosfatasa alcalina (1:2500) (Kirkegaard & Perry Laboratories) en BSA TBST al 3% y se incubo durante 1 hora. Las placas fueron lavadas cuatro veces, y se agregó a cada pozo sustrato (100 µL) (BluePhos, Kirkegaard & Perry Laboratories). Las placas fueron incubadas durante 30 minutos en la oscuridad con agitación, y se leyó el desarrollo de color sobre un lector de microplacas (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.), a A650 y los datos fueron analizados con SoftmaxPro v4.0 (Molecular Devices). Las lecturas de densidad óptica de la gráfica de barras representan la media de dos pozos sustrayendo la O.D. de los pozos que tienen solo regulador. El tratamiento con peryodato del gp19 recombinante fue llevado a cabo durante 20 minutos en regulador de acetato de sodio 100 mM con metaperyodato de sodio 100mM. La proteína de control tratada con protector fue incubada en los mismos reguladores en ausencia de peryodato. La ELISA fue llevada a cabo como se describió anteriormente para los antígenos de *E. canis*, con la excepción de que la placa fue bloqueada con solución diluyente/bloqueadora de leche (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md).

Microscopía inmunoelectrónica. La microscopía inmunoelectrónica con oro fue llevada a cabo como se describió previamente (Doyle et al., 2005), excepto que el anticuerpo de gp19 de anti *E. canis* primario fue diluido 1:10.000. Se hicieron reaccionar células no infectadas DH82 con gp19 anti *E. canis* como control negativo.

Microscopía con focal fluorescente. Se prepararon láminas de antígeno a partir de las células DH82 infectadas con *E. canis* (cepa Jake) tal como se describió previamente (McBride et al., 2001). Se agregó suero de conejo monoespecífico contra la proteína de formación de enlace de disulfuro en *E. canis* recombinante (DsbA) (McBride et al., 2002) diluida 1:100 a cada pozo (15 µL) y se dejo incubar durante 30 minutos. Las láminas fueron lavadas, y se agregó anti gp19 de ratón (dilución 1:100) y se incubo durante 30 minutos. Se agregó anticuerpo secundario anticonejo IgG (H & L) Alexa Fluor® 488 de cabra (Molecular Probes, Eugene, Or), diluida 1:100 y se incubo durante 30 minutos, seguida por lavado y adición subsecuente e incubación de anticuerpo secundario anti ratón IgG (H & L) de cabra marcado con rodamina (Kirkegaard & Perry Laboratories). Se agregó medio de montaje (ProLong Gold, Molecular Probes) y las láminas fueron vistas en un microscopio con focal de láser Olympus FV-1000 con el software Fluoview™.

Amplificación por PCR de gp19 de *E. canis* a partir de aislados dispersos geográficamente. El ADN aislado a partir de aislados Norteamericanos (Jake, Demon, DJ, Louisiana y Florida) aislados Sudamericanos (Brasil) (Sao Paulo; amablemente provisto por Marcelo Labruna) y un perro infectado de México (Yucatán; amablemente provisto por Carlos Pérez) fue utilizado como patrón para amplificar el gen gp19 completo utilizando cebadores de flanqueamiento (Forward-E.canis p19 FOR, 5´-AAAATTAGTGTTGTGGTTATG-3´(SEQ ID NO:14) y Ecanis p19 REV inverso, 5´-TTTTACGCTTGCTGAAT-3´; SEQ ID NO:15). Los amplicones fueron clonados en un vector de clonación TA (pCR2.1, Invitrogen) y los plásmidos fueron transformados en *E. coli* (TOP10). Los plásmidos que contienen gp19 fueron purificados con el kit de purificación de plásmidos (Roche) y secuenciados.

Ejemplo 2

Identificación molecular de la proteína inmunorreactiva principal de gp19 de *E. canis*

La selección de la biblioteca de expresión genómica de *E. canis* identificó un clon que reacciona fuertemente con el anticuerpo y contiene un inserto-3-kb. Este clon fue secuenciado parcialmente (aproximadamente 900 bp) para revelar un ORF incompleto, el cual fue alineado con la secuencia de genoma disponible de *E. canis* para identificar completamente los genes presentes dentro del clon 3 kb. El clon contenía un gen 1086-bp completo que codifica una proteína de biosíntesis de la riboflavina (RibD), y una proteína de codificación corriente abajo 414 bp ORF de 137 aminoácidos con una masa predicha de 15.8 kDa con función desconocida. La proteína tenía una región terminal C de 47 aminoácidos con > 53% de identidad y aproximadamente 60% de homología global con *E. chaffeensis* VLPT, una proteína inmunorreactiva conocida. Por lo tanto este gen fue considerado para investigación posterior. La proteína de *E. canis* tenía una homología de región terminal C sustancial (60%) con VLPT de *E. chaffeensis*, pero carecía de las características de repeticiones en tándem. La proteína de *E. canis* había previsto varios sitios de enlazamiento de O-glicano y un aminoácido (serina 44) que fue un sitio Yin-Yang predicho (glicosilación/fosforilación). Análisis posterior de la posesión genética en el cromosoma reveló los mismos genes adyacentes para el gen de *E. canis* 414-bp y el de la vlpt de *E. chaffeensis* (Figura 1).

Característica de la proteína. Cisteína (14; 10.2%) serina y treonina (13; 9.5% combinadas), glutamato (13; 9.5%) y tirosina (13; 9.5%) fueron los aminoácidos de ocurrencia más frecuente en el gp19 de *E. canis*, representando más del 38% del contenido total de aminoácidos. Los residuos de cisteína no estaban presentes en los primeros 50 aminoácidos, pero la región terminal carboxilo de la proteína (últimos 28 aminoácidos) estaba dominada por cisteína y tirosina (55%). La serina, treonina (7 cada una), 27% y residuos de glutamato (6; 23%) fueron los aminoácidos de ocurrencia más frecuente en una pequeña región central (parche rico STE; 26 aminoácidos) y representó el 50% del contenido de aminoácidos.

Conservación de gp19 de *E. canis*. El gp19 de *E. canis* fue examinado en aislados Norteamericanos dispersos (Jake, DJ, Demon, Louisiana, y Florida) y Sudamericanos (Brasil; Sao Paulo) y se conservo completamente; la secuencia de gp19 amplificada a partir de un perro infectado con *E. canis* de México (Yucatán) tenía una sustitución de nucleótido sencillo (posición 71) que dio como resultado un cambio de aminoácidos individual de glicina a aspartato.

Masa molecular e inmunorreactividad. La masa de la proteína recombinante de fusión de gp19 fue aproximadamente 35 kDa, y fue más grande (aproximadamente 3kDa) que la masa predicha ((32kDa) la cual incluía las etiquetas de fusión (13 kDa) pero era consistente con los aproximadamente 3kDa de más que predijo la masa (16 kDa) del gp19 nativo (19-kDa) (Figura 2A). De la misma manera, los fragmentos más pequeños del gp19 (terminal N, N1 y N1c) expresados como proteínas de fusión recombinante tenían masas moleculares más grandes (aproximadamente 6kDa) (véase Figura 5 para orientación) que lo predicho por sus secuencias de aminoácidos. La gp19 recombinante reaccionó fuertemente con suero de un perro (#2995) infectado experimentalmente con *E. canis* (Figura 2B).

Detección de carbohidratos. Se detectaron los carbohidratos sobre el gp19 recombinante (terminal N, véase Figura 4 para orientación), que contenía el parche STE (Figura 3). Adicionalmente, el análisis de composición de glicósilos del fragmento terminal N por la University of Georgia Complex Carbohydrate Research Center utilizando análisis por acetato de alditol reveló la presencia de glucosa y xilosa.

Identificación de gp19 nativo y especificidad de las especies. Los antisueros de gp19 antirrecombinantes reaccionaron fuertemente con la proteína de 19 kDa en lisados de células enteras de *E*. *canis*, y esta proteína fue reconocida de la misma forma por el suero de perro anti *E. canis* (Figura 4A). Los sueros de gp19 antirrecombinantes también reaccionaron débilmente con otras glicoproteínas caracterizadas de *E. canis*, gp36, sugiriendo una reactividad cruzada menor entre estas dos proteínas. El suero de gp19 antirrecombinante no reconoció los antígenos en lisados de células enteras de *E. chaffeensis* (Figura 4B).

Epítopo mayor individual. Los determinantes de epítopo de otras glicoproteínas han sido determinados incluyendo la gp47 de *E. chaffeensis* y gp36 de *E. canis* (Doyle et al., 2006). La gp19 de *E.canis* es reconocida fuertemente por el anticuerpo de perros infectados, y dispara una respuesta temprana del anticuerpo (McBride et al., 2003). Con el fin de identificar la región que contiene el epítopo, fragmentos del gen gp19 de *E. canis* (terminal N, terminal C, N1, N2, NIC) (Figura 5) fueron amplificados con cebadores (Tabla 2) para crear proteínas de fusión recombinantes superpuestas. Los fragmentos de gp19 expresados (N1, N2, terminal N y terminal C) exhibieron masas más grandes (2 a aproximadamente 6 kDa) que las predichas por SDS-PAGE (Figura 4A). El anticuerpo reaccionó fuertemente con el fragmento recombinante terminal N, pero no reaccionó con el fragmento terminal C indicando que un epítopo estaba localizado en la región terminal N de la proteína (Figura 5B). La localización adicional de la región que contiene el epítopo fue determinada con los fragmentos N1 y N2. El anticuerpo reaccionó fuertemente con el N1 (42 aminoácidos), y el N2 fue reconocido débilmente (Figura 5B). Una región dentro de N1 que tiene un contenido alto de Ser/Thr/Glu (N1C; 24 aminoácidos) consistente con otros epítopos identificados en otras proteínas erliquiales reaccionó fuertemente con anticuerpo consistente con el del fragmento N1 más grande, demostrando que un epítopo principal individual estaba localizado en la región del aminoácido 24 de N1C.

Carbohidratos como determinantes del epítopo. Se demostró previamente que el carbohidrato es un determinante de epítopo importante en glicoproteínas inmunorreactivas principales (Doyle et al., 2006). El carbohidrato fue detectado sobre la región N terminal del gp19 y el epítopo fue localizado en el parche rico en STE. Los sitios de enlazamiento de glicano también fueron predichos dentro del parche rico en STE. Para determinar el papel de los determinantes de carbohidrato en el reconocimiento de anticuerpos, la inmunorreactividad del N1C recombinante fue comparada con la del péptido sintético. Por ELISA, el péptido sintético fue sustancialmente menos inmunorreactivo con el suero de perro (# 2995) anti *E. canis* que la versión recombinante (Figura 6). De la misma forma, el N1C tratado con peryodato para alterar la estructura del glicano fue menos inmunorreactivo que la proteína NIC tratada con protector (Figura 6).

Localización celular y extracelular de gp19. Varias glicoproteína erliquiales caracterizadas se expresan diferencialmente en *Ehrlichiae* de núcleo denso (gp120, gp36 y gp47). Sin embargo, por microscopía inmunoelectrónica el gp19 de *E. canis* fue observado dentro del citoplasma de *Ehrlichiae* tanto reticulada como de núcleo denso, pero también fue detectado extracelularmente en la matriz fibrilar de la mórula y asociada con la membrana de la mórula (Figura 7). Estos resultados fueron consistentes con observaciones que utilizaban microscopía inmunofluorescente con focal, utilizando anti gp19 (Figura 8A) y anticuerpo anti-Dsb (presente en *Ehrlichiae*, pero no extracelularmente) (Figura 8B), mostrando tanto Dsb como gp19 colocalizadas en *Ehrlichiae*, y la tinción del límite de la membrana de mórula por anti-gp19 solamente (fusionado) (Figura 8C).

Números de acceso a secuencias de nucleótidos. Las secuencias genéticas de gp19 de *Ehrlichiae canis* de aislado de gp19 de *E. canis* (Jake, DJ, Demon, Louisiana, Florida, Sao Paulo y México) fueron depositadas en el GenBank® y recibieron la asignación de los siguientes números respectivos de acceso: DQ858221, DQ858222, DQ858223, DQ858224, DQ858225, DQ860145 y DQ858226. Todos estos números de acceso fueron representados en la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 17 excepto el número de acceso GenBank® DQ858226, el cual está representado en la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 18 y la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 19.

Ejemplo 3

Significado de la presente invención

La cinética de las respuestas de los anticuerpo a antígenos de inmunorreactivos principales de *E. canis* durante la infección experimental ha sido bien establecida en un estudio previo (McBride et al., 2003). Dos antígenos de *E. canis* (37 y 19 kDa) fueron reconocidos consistentemente de manera temprana en la respuesta inmune aguda. En un estudio más reciente, la identificación y caracterización molecular de la proteína de 37 kDa (gp36) que es una glicoproteína expresada diferencialmente en *Ehrlichiae* de núcleo denso y es secretada, fue descrita (Doyle et al., 2006). A medida que más proteínas inmunorreactivas principales han sido caracterizadas molecularmente en *E. canis* y *E. chaffeensis*, ha sido más evidente que muchas exhiben un contenido alto de serina/treonina, contienen repeticiones en tándem y son glicosiladas (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2000; Yu et al., 1997; Yu et al., 2000).

Aunque otros han reportado que los ortólogos de vlpt de *E. chaffeensis* no fueron identificados en genomas relacionados (*E. canis* y *E. ruminamtium*) (Hotopp et al., 2006) proveemos en evidencia aquí de que una proteína de 19kDa identificada en este estudio es el ortólogo de la proteína VLPT descrita previamente en *E. chaffeensis* (Sumner et al., 1999). El VLPT de *E. chaffeensis* es inmunorreactivo, y no tiene repeticiones en tándem ricas en serina. Aunque no se ha reportado carbohidrato en el VLPT de *E. chaffeensis*, la proteína también exhibe una masa doble que la predicha por su contenido de aminoácidos, similar a otras glicoproteína erliquiales descritas (Sumner et al., 1999). De manera interesante, el ortólogo de vlpt que identificamos en *E. canis* en este estudio carece de las repeticiones en tándem encontradas en el vlpt de *E. chaffeensis*, pero tiene un parche rico en Ser/Thr/Glu que es similar en tamaño y composición al de una unidad de repetición VLPT individual. Además, estos genes comparten la misma localización cromosómica y tienen homología sustancial en aminoácidos (aproximadamente 60%) en la región terminal en carboxilo.

Otra proteína inmunorreactiva principal (MAP2) reacciona en MSP5 marginal de Anaplasma ha sido identificada y caracterizada molecularmente en *E. canis*, *E.chaffeensis* y *E. ruminantium* con una masa molecular (aproximadamente 21 kDa) similar a la gp19 identificada en este estudio (Alleman et al., 2000; Alleman et al., 2001; Mahan et al., 1994). Sin embargo no hay homología de aminoácidos entre MAP2 y gp 19, y así, estas proteínas son molecular e inmunológicamente distintas. A diferencia del gp19, el MAP2 parece tener una masa consistente con la predicha por su secuencia de aminoácidos y no tiene dominios ricos en serina. Hay una homología sustancial entre los ortólogos de MAP2 en *Ehrlichia spp* y se ha informado de reacciones cruzadas entre proteínas heterólogas de MAP2 (Knowles et al., 2003; Mahan et al., 1994). En contraste, los anticuerpos generados al gp19 de *E. canis* no tienen reactividad cruzada con VLPT de *E. chaffeensis*, y por lo tanto estas proteínas parecen ser ortólogos específicos de las especies. Otras diferencias notables entre MAP2 y gp19 incluyen un epítopo lineal rico en serina principal de gp19 que es fuertemente reconocido por anticuerpos por inmunoprecipitación Western, mientras que los anticuerpos de MAP2 de *E. canis* y *E. chaffeensis* parecen estar dirigidos primariamente a un epítopo conformacional (Alleman et al., 2000; Alleman et al., 2001, Knowles et al., 2003). En un estudio previo se ha sugerido que la proteína inmunorreactivas principal de 19 kDa que fue identificada puede ser MAP2 (McBride et al., 2003); sin embargo, los datos presentados en esta invención indica que esta proteína no es MAP2, sino más bien gp19. De manera interesante, solamente una proteína

inmunorreactiva principal en el rango de 15 a 25 kDa ha sido identificada en el estudio previo (McBride et al., 2003). El hecho de que los anticuerpos para MAP2 sean incapaces de ser detectados está relacionado probablemente con el hecho de que los epítopos conformacionales sean dominantes en MAP2 tanto de *E. canis* como de *E. chaffeensis* (Alleman et al., 2000; Alleman et al., 2001).

Consistente con numerosas otras proteínas inmunorreactivas principales que han sido caracterizadas, los carbohidratos estaban presente en la región N terminal de la proteína de 19 kDa de *E*. *canis*, y se detectaron glucosa y xilosa en este fragmento. La presencia de glucosa y galactosa como azúcares enlazados a gp120 de *E. chaffeensis* y gp140 de *E. canis* han sido informados. Aunque el gp19 de *E. canis* no tiene repeticiones en tándem ricas en serina que parezcan ser localizaciones de uniones glicano, contienen un parche rico en STE con la región terminal en N, similar a la composición en aminoácidos de repeticiones en tándem encontradas en otras glicoproteínas erliquiales. Por lo tanto, es probable que glicanos enlazados en O estén enlazados a aminoácidos (serina/treonina) en este parche rico en STE. Adicionalmente, utilizando el servidor de predicción Yin OYang, los residuos de serina dentro de esta región fueron identificados como sitios potenciales de glicosilación/fosforilación. Puesto que este servidor de predicción está entrenado en glicoproteínas eucariota, la identificación de residuos específicos que están glicosilados puede no ser confiable, sin embargo vale la pena anotar que hay una correlación positiva consistente entre nuestros datos experimentales y la predicción generada por el algoritmo de predicción basado en eucariotes.

La composición en aminoácido de la gp19 de *E. canis* consiste predominantemente de 5 aminoácidos, cisteína, glutamato, tirosina, serina y treonina. De manera interesante, estos aminoácidos fueron concentrados en dos dominios específicos, la región que contiene el epítopo y la región del terminal carboxilo. El alto contenido de Ser/Thr/Glu de la región que contiene el epítopo ha sido reportado en otras glicoproteínas erliquiales donde los epítopos han sido mapeados (Doyle et al., 2006), y se ha encontrado un alto contenido de serina y treonina en otras glicoproteínas erliquiales, particularmente en regiones de repetición en tándem (Doyle et al., 2006; Yu et al., 1997; Yu et al, 2000). La VLPT de *E*. *chaffeensis* también contiene repeticiones en tándem con contenido similar de aminoácidos. Esto de la misma forma indica que está región dentro del gp19 de *E. canis* corresponde a la repetición en tándem en VLPT de *E. chaffeensis*. La adición y eliminación de repeticiones en tándem es considerada una fuente principal de cambio e inestabilidad en genomas erliquiales (Frutos et al., 2006). El hecho de que el gp19 de *E canis* carezca de repeticiones en tándem, mientras que el VLPT de *E. chaffeensis* tienen números variables es indicativo de que estos genes son afectados por este proceso.

Otra característica novedosa del gp19 es la cola terminal de carboxilo dominada por tirosina y cisteína (55%). Está cola terminal carboxilo también está presente en el VLPT de *E. chaffeensis* corriente abajo de la región de repetición, indicando que es un dominio conservado importante en estas proteínas. Globalmente, la cisteína estaba presente más que cualquier otro aminoácido, y debido a esto, el gp19 es un miembro de un pequeño grupo de proteína (n=36) con alto contenido de cisteína (Mavromatis et al., 2006). La cisteína es esencial para la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares, y su alto contenido en el gp19 indica que está proteína tiene el potencial de ser enlazada con otras proteínas que contienen cisteína por puentes de disulfuro o que son importantes para el enlazamiento intramolecular necesario para mantener la estructura de gp19.

La tirosina y la serina comúnmente son fosforiladas. La alta proporción de residuos de tirosina en la región terminal de carboxilo del gp19 sugiere un alto potencial para que este dominio de la proteína sea fosforilado. Está condición también abre la posibilidad de que la gp19 esté involucrada en la señalización proteínica. La presencia de fosfoproteínas ha sido reportada en *E. chaffeensis* (Singu et al., 2005) y más Ser/Thr/Tyr quinasas y fosfoproteínas están siendo identificadas en bacterias (Hinc et al., 2006; Levine et al., 2006; Madec et al., 2002; Obuchowski et al., 2000). No obstante, los residuos de tirosina en esta región terminal C no fueron identificados como sitios de fosforilación por NetPhos, el cual está entrenado en proteínas eucariotes. Por lo tanto, se llevan a cabo estudios adicionales para caracterizar el estatus de fosforilación de residuos de tirosina en cuanto este se relaciona con la función proteínica, en realizaciones especificas de la invención.

Un epítopo principal individual fue identificado en el g19 de *E. canis* en el dominio rico en STE. Este epítopo dispara una respuesta anticuerpo temprana en perros experimentalmente afectados con *E*. *canis* (McBride et al., 2003). Otros epítopos que han sido caracterizados dentro de las glicoproteínas erliquiales fueron mapeados para repeticiones en tándem ricas en serina. Aquí, el hallazgo de un epítopo principal dentro de la región STE del g19 es consistente con estudios previos, y demuestra la importancia de las regiones ricas en serina y el carbohidrato enlazado como inmunodeterminantes para la *Ehrlichiae spp*. Se detectó un carbohidrato en la región terminal N del g19 que contiene la región STE. El epítopo del gp19 recombinante fue más inmunorreactivo que el correspondiente péptido sintético, indicando que había presente una modificación postranslacional en este epítopo. Además, el tratamiento de péptido que contiene el epítopo recombinante con peryodato redujo su inmunorreactividad, soportando adicionalmente el papel de carbohidrato como inmunodeterminante. Estos hallazgos son consistentes con la demostración previa de que el carbohidrato como un inmunodeterminante en los epítopos que fueron mapeados en las regiones de repetición en tándem ricas en serina de gp47 de *E. chaffeensis* y gp36 de *E. canis* (Doyle et al., 2006). De manera notable este epítopo parece ser especifico para la especie y el anticuerpo anti gp19 no reacciona de forma cruzada con los antígenos de *E. chaffeensis*, similar a otros antígenos inmunorreactivos específicos para la especie que han sido identificados incluyendo el gp36 (Doyle et al., 2006; Yu et al., 1997; Yu et al., 2000). Por lo tanto, el uso de inmunodiagnósticos

específicos de la especie sensibles utilizando el gp19 de *E. canis* solo, o en combinación con otros antígenos tal como el gp36 también son abarcados por la invención.

El gp19 de *E. canis* fue encontrado en células tanto reticuladas como de núcleo denso y parece estar localizado predominantemente en el citoplasma de la *Ehrlichiae.* La localización del gp19 está en contraste con otra glicoproteína de *E. canis* (gp36) que fue reportada con expresión diferencialmente primariamente en la superficie de células de núcleo denso (Doyle et al., 2006). Sin embargo, similar al gp36, el gp19 también fue observado extracelularmente en la matriz fibrilar de mórula y asociado con la membrana de la mórula. La expresión de gp19 sobre *Ehrlichiae*, la matriz fibrilar y la membrana de la mórula fue corroborada adicionalmente con inmunofluorescencia utilizando tinción dual con Dsb, la cual no es secretada y está presente tanto en organismos reticulados como de núcleo denso (McBride et al., 2002). Algunas mórulas pequeñas parecen tener menos gp19 sugiriendo que la expresión de gp19 se hace más predominante a medida de que la mórula madura. La gp19 de *E. canis* no tiene una secuencia de señal aminoterminal; por lo tanto la exportación de esta proteína probablemente involucre un sistema de secreción sec independiente (Tipo 1 o Tipo III).

El gp19 de *E. canis* fue conservado altamente en aislados de *E. canis* examinados de los Estados Unidos, México y Brasil. La conservación de genes inmunorreactivos principales (p28, gp140, gp36) en aislados de *E. canis* separados geográficamente han sido reportados consistentemente (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2000; McBride et al., 1999; Ndip et al., 2005; Yu et al., 2000). Esto indica que son factibles las vacunas globalmente efectivas e inmunodiagnósticos confiables para *E. canis* con base en proteínas inmunorreactivas principales tales como la gp19.

Ejemplo 4

Sensibilidad potenciada e inmunodiagnóstico especifico según la especie de infección por *Ehrlichia canis* por ensayo inmunosolvente enlazado a enzima con glicoproteínas inmunorreactivas conservadas gp36 y gp19

La *Ehrlichia canis* es el agente etiológico primario de la erliquiosis monocítica canina (CME), una enfermedad de los perros distribuida globalmente y potencialmente fatal. El inventor previamente informó acerca de la identificación de dos antígenos inmunorreactivos principales conservados gp36 y gp19, las primeras proteínas que disparan una respuesta específica de anticuerpo de *E. canis*, y gp200 y p28 que disparan respuestas anticuerpos fuertes más tarde en la infección aguda. En la presente invención, la sensibilidad y especificidad de las proteínas de *E. canis* recombinantes fueron evaluadas en cuanto al inmunodiagnóstico de infección por *E. canis* utilizando un ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA). Los polipéptidos recombinantes gp36, gp19 y gp200 (N y C) exhiben 100% de sensibilidad y especificidad en comparación con IFA (estándar de oro) en la detección de anticuerpos en perros que finalmente fueron infectados de manera natural con *E. canis*. Adicionalmente, la sensibilidad potenciada de gp36 y gp19 en comparación con IFA se demostró con perros infectados experimentalmente con *E. canis* en los cuales los anticuerpos fueron detectados tanto como 2 semanas antes, el día 14 después de la inoculación. Además, la gp36 y gp19 no fueron reactivos cruzados con anticuerpos en sueros de perros infectados con *E. chaffeensis*, y proveen así una discriminación serológica especifica de la especie entre infecciones de *E. canis* y *E. chaffeensis*. Este es el primer estudio para demostrar una capacidad de detección mejorada con tecnología de proteína recombinante en comparación con la IFA de “estándar de oro” y puede eliminar los obstáculos remanentes asociados con el inmunodiagnóstico de infecciones con *E. canis*, incluyendo identificación específica de la especie y falta de sensibilidad asociada con bajos títulos de anticuerpos que se presentan tempranamente en la infección aguda.

Materiales y métodos

Animales experimentales. Los perros y protocolos utilizados en las infecciones experimentales con *E. canis* fueron descritos previamente (McBride et al., 2003). Para infecciones experimentales con *E. chaffeensis*, se obtuvieron perros beagle saludables de dos años de edad de una fuente comercial y se alojaron en las instalaciones de la University of Texas Medical Branch Laboratory Animal Resources, lo cual fue acreditado por la American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care. Antes del estudio, se demostró que los perros carecían de anormalidades por exámenes físicos y no tenían anticuerpos detectables de *E. chaffeensis* según IFA. El protocolo experimental fue aprobado por el Animal Care and Use Committee at the University of Texas Medical Branch.

Inóculos de *E. chaffeensis* y *E. canis*. Las dosis infecciosas de cultivo de tejidos (TCID) del inóculo de *E. chaffeensis* se determinó por inoculación de monocapas de DH82 sembradas en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos con diluciones a 10 veces (10^{-1} hasta 10^{-5}) de inóculo (0.2 ml) en MEM. El inóculo fue cultivado durante 1 hora a 37ºC seguido por la adición de 1 ml de medio de crecimiento. Siete días después de la inoculación se determinó el TCID por identificación de *E. chaffeensis* en células inoculadas por IFA. El TCID del inóculo de *E. canis* fue determinado como se describió previamente (Gaunt et al., 1996).

Infección experimental con *E. canis* y *E. chaffeensis* en perros. Se infectaron experimentalmente dos perros con *E. chaffeensis* (cepa Arkansas) propagadas en una línea celular de embriones de ratón tal como se describió previamente (Chen et al., 1995). Las células infectadas de seis matraces T-150 fueron recolectadas por centrifugación a 13.000 x g,

durante 25 minutos después de que las células fueron infectadas en un 80%. Dos perros recibieron 4 ml de la suspensión celular de *E. chaffeensis* por vía intravenosa inmediatamente después de la preparación, y se determinó el TCID50 retrospectivamente. El suero inmune fue recolectado cuatro semanas después de la inoculación, y se determinaron los títulos de anticuerpos anti-*E. chaffeensis* y anti-*E. canis*, mediante IFA. Se infectaron experimentalmente quince perros con *E. canis* y suero recolectado en intervalos semanales como se describió previamente (McBride et al., 2003).

Sueros de perro. Las muestras de los sueros de perros enfermos que exhibían señales clínicas o anormalidades hematológicas consistentes con CME fueron enviadas al Louisiana Veterinary Medical Diagnostic Laboratory (LAVMDL) con preparación veterinaria como se describió previamente. (McBride et al., 2001). Los sueros fueron seleccionados por IFA (1:40) y separados en grupos como sueros positivos y negativos a *Ehrlichia*. Los sueros de los perros saludables fueron obtenidos de beagles saludables de un año de edad a partir de un criador comercial (Marshall Farms, New York).

Clonación de los genes de proteínas recombinantes de *E. canis*. Los genes gp19 (nt 7-411), gp36 (nt 28-816), gp200N (nt 22-564) y gp200C (nt 3665-4188) y p28-3 (nt 82-695) fueron clonados en vectores de expresión procariota como se describió previamente (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2006; McBride et al., 2001; McBride et al., 2000; Nethery et al., 2006). Los cebadores fueron diseñados para una inserción enmarco de amplicones en el vector pUni/V5-His-TOPO y recombinados con el vector aceptor pBAD Thio-E-Echo (p28) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.) o clonados directamente en un vector de expresión pBAD ThioFusión (gp19, gp36, gp200N y gp200C) (Invitrogen).

Expresión y purificación de proteína recombinantes de *E. canis*. Las proteínas recombinantes gp19, gp36, gp200 de terminal N y gp200 de terminal C fueron expresadas en *E. coli* (TOP10) después de inducción con 0.02% de arabinosa durante 2 horas. Las bacterias (de 10 litros de cultivo de fermentación) fueron recolectadas por centrifugación a 5.000 x g durante 40 minutos y resuspendidas en PBS. Se purificaron las proteínas recombinantes (gp19, gp36, gp200N y gp200C) bajo condiciones naturales sometiendo a lisis las bacterias resuspendidas en un regulador de lisis (PBS, Triton 100X al 0.05%, NaCl 0.5 M, PMSF 1 mM e imidazol 5 mM) y se perturbaron utilizando una French Press a 1100 psi en agua con hielo y aglomerando el material insoluble por centrifugación a 10.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante clarificado fue cargado sobre una columna equilibrada Ni-NTA (columna de 50 ml). La proteína recombinante enlazada fue lavada con 15 volúmenes de columna de concentraciones crecientes de imidazol (4%, 8%, 20% y 100%) y se eluyó con imidazol 250 mM en regulador de lisis. La proteína p28 recombinante fue purificada bajo condiciones de desnaturalización sometiendo a sonicación las bacterias aglomeradas resuspendidas en regulador de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 400 mM, PMSF 1 mM y Triton 100X al 0.1%) a 50 W durante 30 minutos (20 segundos encendido, 20 segundos apagado) en agua con hielo y aglomerando el material insoluble por centrifugación (10.000 x g) durante 30 minutos. La pella fue lavada tres veces primero con urea 2 M, luego urea 4 M en regulador de lisis y luego con agua agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente y aglomerando (6.000 g) durante 30 minutos. El lavado final fue llevado a cabo en urea 4 M más Triton X100 al 1% y 0.1% de ácido desoxicólico con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente y se aglomero mediante centrifugación (10.000 x g, 45 minutos). La pella fue resuspendida en regulador de muestra (urea 4 M, guanidina 6 M y 2-mercaptoetanol 50 mM) con agitación durante la noche a 4ºC y se aglomeró (10.000 x g, 40 minutos). El sobrenadante clarificado fue cargado sobre una columna de fase reversa equilibrada (26/10 XK, Amersham Biosciences), se lavó con regulador A (TFA al 0.1%) y se eluyó con 6 volúmenes de columna de proporciones crecientes (desde 0% hasta 100% de regulador B) de regulador A y regulador B (TFA al 0.1% y 85% de acetonitrilo).

Ensayo inmunosolvente enlazado con enzima (ELISA). La respuesta a anticuerpos de proteínas recombinantes de *E. canis* (gp36, gp19, p28, gp200N y gp200C) fue evaluada por un ensayo inmunosolvente enlazado con enzima (ELISA). El protocolo ELISA fue optimizado incluyendo la selección de placa de ELISA, concentraciones de proteínas, diluciones de suero y reguladores de bloqueo. El gp36 recombiante (0.3 µg/ml), gp19 (1.2 µg/ml), p28 (2.5 µg/ml), gp200N (1.4 µg/ml), gp200C (0.5 µg/ml) y control de tiorredoxina (2.5 µg/ml) fueron diluidos en PBS y se recubrieron placas de ensayo (Nunc-Immuno™ Plates with Polysorp TM Surface, NUNC, Roskilde, Dinamarca), fueron recubiertos con 50 µl que contenían proteína recombinantes y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y durante la noche a 4ºC. Las placas fueron lavadas 4 veces con 200 µl de regulador de lavado (PBS y Tween 20, 0.05%) y se bloquearon con 100 µl de regulador de bloqueo (10% de suero equino en PBS; HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) y se incubaron durante 1 hora a 37ºC. Cada anticuerpo primario fue diluido 1:250 en regulador de bloqueo y 50 µl del anticuerpo se agregaron a pozos de prueba duplicados que contienen el antígeno, un pozo de control que contenía tiorredoxina recombinante (control negativo), y un pozo de blanco que no contenía antígeno y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas fueron lavadas, y se agregaron 50 µl de IgG (H & L) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) anti perro de cabra marcada con peroxidasa purificada por afinidad diluida 1:1000 en regulador de bloqueo a cada pozo. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron. El anticuerpo enlazado fue detectado después de la adición de sustrato (100 µl) sustrato de peroxidasa (de Sure Blue Reserve de Kirkegaard & Perry Laboratories). Las placas fueron leídas sobre un lector de microplacas sintonizable (Molecular Devices, Sunnyvale. Calif.) a A630 después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos. La absorbancia de cada muestra fue registrada gráficamente como la densidad óptica a 630 nm (OD630), y la señal de fondo del pozo de control negativo fue sustraída de cada muestra correspondiente para determinar la absorbancia final.

Electroforesis en gel e inmunoprecipitación Western. Las proteínas recombinantes de *E. canis* fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), transferidas a membranas de nitrocelulosa y se llevaron a cabo las inmunoprecipitaciones Western como se describe previamente. (McBride et al., 2003).

IFA. El estatus de anticuerpo de los perros infectados experimentalmente con *E. canis*, clínicamente enfermos y de perros infectados de manera natural fue determinado como se describió previamente (McBride et al., 2003). El estatus de anticuerpos de los perros saludables y los perros infectados experimental y naturalmente con *E. chaffeensis* se ejecutaron de manera similar con láminas de antígenos de *E. canis* (cepa Jake) y *E. chaffeensis* (cepa Arkansas). Los sueros fueron probados utilizando diluciones de dos veces en PBS comenzando en 1:64.

Comparación de la cinética de anticuerpos contra proteína recombinante de *E. canis* por inmunoprecipitación Western y ELISA

Los anticuerpos de las principales proteínas inmunorreactivas de *E.canis* se desarrollaron diferencialmente durante la infección aguda (McBride et al., 2003). La respuesta a anticuerpos de las proteínas recombinantes de *E. canis* en tres perros infectados experimentalmente fue examinada por ELISA e inmunoprecipitación Western para determinar la correlación entre los dos inmuno ensayos y determinar si la cinética observada previamente con los lisados de *E. canis* natural se reprodujeron con las proteínas recombinantes. Los anticuerpos en sueros de los tres perros infectados con *E. canis* reaccionaron más tempranamente (día 14), con el gp36 recombinante tanto por inmunoprecipitación Western como por ELISA, seguida por gp19 (día 21). Los polipéptidos p28 y gp200 de terminales N y C exhibieron una sensibilidad de detección similar, reaccionando con los anticuerpos más tarde en el transcurso de la infección (día 28 a 35) aproximadamente dos semanas después que el gp36 (Figura 9).

Sensibilidad analítica y especificidad de ELISA de glicoproteína recombinante de *E. canis*

El "estándar de oro" actual para inmunodiagnóstico es la prueba de anticuerpo fluorescente indirecta (IFA). Este estándar se utilizó para determinar la sensibilidad y especificidad de nuestra ELISA de proteína recombinante. Los anticuerpos contra la gp36, gp19, gp200N y gp200C recombinantes fueron detectadas en todas las muestras positivas de IFA por ELISA a partir de perros infectados experimentalmente (rango 1280 a > 10.240) y de manera natural (títulos de anticuerpos: 4, ≥3200; 4, 1600; 3, 800; y 2, 400) con *E. canis*. (Tabla 3). Las proteínas recombinantes (gp36, gp19 y gp200 de terminal N y terminal C) exhibieron 100% de especificidad en comparación con IFA de sueros a partir de perros saludables y enfermos (Tabla 3). Por el contrario, la p28 recombinante exhibió niveles altos de enlazamiento no específico de anticuerpos (niveles de control negativos anteriores) con algunos sueros de perro y así tenían una especificidad sustancialmente inferior (60%).

Tabla 3. Sensibilidad analítica y especificidad de inmunodiagnóstico de *E. canis* con proteínas recombinantes e IFA

	Perro (%) con anticuerpos detectables				
	IFA	gp36	gp19	gp200N	gp200C
Infectados experimentalmente *E. canis* (n=15)*	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)
Infectados naturalmente *E. canis* (n=14)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	14 (100)
Total (n=29)	29 (100)	29 (100)	29 (100)	29 (100)	29 (100)
Clínicamente saludables (n=10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Clínicamente enfermos (n=26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total (n=36)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Experimentalmente infectado *E. chaffeensis* (n=2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
Naturalmente infectados *E. chaffeensis* (n=2)**	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)

La detección temprana de anticuerpos de anti-*E. canis* con glicoproteínas recombinantes. Perros infectados experimentalmente con *E. canis* (n=15), en los cuales se definieron las cinéticas de respuesta de anticuerpos (McBride et al., 2003), fueron utilizados para determinar la sensibilidad a la detección de IFA en comparación con las proteínas recombinantes en ELISA. Los perros experimentados experimentalmente (1 excepción) desarrollaron anticuerpos IgG a gp36 de *E. canis* que pudo ser detectado por ELISA 14 días después de la inoculación (dpi), y un tercio de estos perros (n=5), tenían anticuerpos que reaccionaron con gp19 (Tabla 3). Por el contrario, ninguno de los perros tenía anticuerpos IgG detectables por IFA con 14 dpi (Tabla 3). Los anticuerpos fueron detectables por IFA en solamente cuatro perros en 21 dpi. La sensibilidad de IFA y de ELISA de proteína recombinante se hizo comparable a los 28 dpi, pero no se logró una concordancia completa hasta 42 dpi (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de sensibilidad de detección serológica de infección por *E. canis* por IFA y ELISA (gp36 y gp19) en perros infectados experimentalmente

	Día 0 IFA gp36 gp19	Día 7 IFA gp36 gp19	Día 14 IFA gp36 gp19	Día 21 IFA gp36 gp19	Día 28 IFA gp36 gp19	Día 35 IFA gp36 gp19	Día 42 IFA gp36 gp19
32	- - -	- - -	+	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
33	- - -	- - -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
34	- - -	- - -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
35	- - -	- - -	- + +	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
37	- - -	- - -	- + +	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
41	- - -	- - -	- + -	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
43	- - -	- - -	- + -	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
44	- - -	- - -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
45	- - -	- - -	- + +	- + -	+ + +	+ + +	+ + +
46	- - -	- - -	- + -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +
48	- - -	- - -	- + +	- + +	- + -	- + -	+ + +
51	- - -	- - -	- - -	- - -	- + -	+ + +	+ + +
52	- - -	- - -	- - -	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
54	- - -	- - -	- + -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +
59	- - -	- - -	- + -	- + -	- + -	+ + +	+ + +

Inmunodiagnóstico especifico de la especie con gp19 y gp36. Cuatro perros infectados con *E. chaffeensis* (2 experimentales y 2 naturales) fueron positivos por IFA al antígenos de *E. canis*, pero no reaccionaron con las proteínas recombinante de *E. canis* (gp36, gp19 y gp200). Los títulos de anticuerpos de anti-*E. chaffeensis* a partir de perros infectados experimentalmente con *E. chaffeensis* fueron ≥ 1280. Los títulos de anticuerpos por IFA de anti-*E. chaffeensis* de los perros infectados de manera natural con *E. chaffeensis* fueron 1:400 y 1:800 frente al antígeno homólogo (1:64 al *E. canis*).

Significado de la presente realización

Los diagnósticos tempranos de CME en el estado agudo de infección seguido por tratamiento con doxiciclina asegura la mejor prognosis. La detección de los anticuerpos de *E. canis* por IFA es actualmente el método más ampliamente utilizado para el diagnóstico de CME y se considera el “estándar de oro” (Waner et al., 2001). Sin embargo, el IFA se

lleva a cabo de forma rutinaria en grandes laboratorios de diagnóstico de referencia y no es útil como una prueba de diagnóstico o selección cuidadosa porque requiere un alto nivel de experiencia técnica, está sujeto a variaciones inter e intralaboratorio y a interpretaciones cerradas, y requiere equipamiento de microscopía fluorescente muy costoso. Además, el IFA utiliza células infectadas con *E. canis* que no están bien definidas y que contienen antígenos (choque de calor y p28/p30) capaz de reaccionar con anticuerpos generados contra otros miembros del género (*E. chaffeensis* y *E. ewingii*) y organismos de otros géneros (Neorickettsia) (Comer et al., 1999). Así, la posibilidad de infecciones múltiples nacidas en garrapatas en perros complica los diagnósticos serológicos por IFA (Kordick et al., 1999). Actualmente, las pruebas diagnósticas de punta (Snap 3Dx, IDEXX Laboratories; Dip-S-Tick, PanBio InDx; Immunocomb, Biogal) que están disponibles comercialmente utilizan antígenos de células enteras o proteínas/péptidos sintéticos o recombinantes de las dos principales proteínas de la membrana exterior (p30 y p30-1). El ensayo Snap 3Dx parece ser uno de las pruebas más ampliamente usadas, pero los estudios recientes han concluido que su sensibilidad parece ser sustancialmente menor que la de IFA (Belanger et al., 2002; Harrus et al., 2002), un problema que es más pronunciado con sueros que contienen por debajo de (<320) títulos de anticuerpos (Harrus et al., 2002; O´Connor et al., 2006). Además, todos los ensayos disponibles comercialmente son incapaces de diferenciar entre diversas especies de *Ehrlichia*, que son conocidas por causar infecciones en perros. Por lo tanto, se requiere un inmunodiagnóstico capaz de proveer mejor sensibilidad, particularmente durante una infección aguda temprana, y la capacidad para diferenciar el agente especifico responsable de la infección, utilizando un antígeno recombinante o sintético caracterizado y consistentemente reproducible, pero no disponible.

La reciente identificación molecular de varias proteínas inmunorreactivas principales distintas pero conservadas de *E. canis* incluyendo gp36, gp19, gp200 y p28/30 han creado nuevas oportunidades para mejoras sustanciales en el diagnóstico serológico de CME (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2003; McBride et al., 2001; McBride et al., 1999; Ohashi et al., 1998). El inventor ha reportado previamente que gp36, gp19 y gp200 de *E. canis* son molecular e inmunológicamente distintos de los ortólogos respectivos en *E. chaffeensis* (gp47, VLPT y gp200) y que dos de estas proteínas caracterizadas (gp36 y gp19) son las primeras en disparar una respuesta de anticuerpos en perros infectados con *E. canis*. (McBride et al., 2003). Además, estas proteínas se conservan entre las cepas de *E. canis* dispersas geográficamente (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2006; McBride et al., 2000; McBride et al., 1999). Por lo tanto, estos antígenos tienen un alto potencial para facilitar el desarrollo de inmunodiagnósticos de nueva generación ultrasensibles y altamente específicos para la detección de infección por *E. canis*. Se considera que en ciertos casos estas proteínas podrían proveer una sensibilidad incrementada sobre proteínas de antígenos de célula entera (gp36 y gp19) utilizado en un formato ELISA que provee sensibilidad incrementada en comparación con IFA para detectar anticuerpos durante la respuesta inmune temprana y son altamente específicos para *E. canis*.

Las proteínas recombinantes molecularmente caracterizadas (gp36, gp19, p28/30 y gp200) reaccionan con los anticuerpos de sueros caninos infectados con cinéticas similares a las reportadas con las proteínas correspondientes en lisados naturales de *E. canis* (McBride et al., 2003) en dos formatos de inmunoensayos (ELISA y membrana) que se utilizan comúnmente como pruebas de diagnóstico de referencia. Estos resultados confirman que las proteínas recombinantes son subrogados adecuados para proteínas nativas erliquiales y reaccionan de la misma manera con anticuerpos generados durante una infección. Además, los resultados consistentes obtenidos por dos formatos de inmunoensayo indican que estas proteínas podrían proveer una sensibilidad consistente independientemente del formato de ensayo utilizado. En este estudio particular, la inmunoprecipitación Western proveyó resultados similares en comparación con ELISA, pero los resultados pueden ser dependientes del laboratorio y esta técnica es laboriosa, consume tiempo y no es muy bien adecuada para pruebas de referencia.

La sensibilidad analítica de las proteínas recombinantes de *E. canis* se correlacionan completamente con el IFA que utiliza sueros de perros con infecciones naturales y experimentales. Los inventores reportaron previamente 100% de sensibilidad con gp200-N ((P43) de *E. canis* y estos resultados fueron confirmados en este estudio (McBride et al., 2001). Sin embargo, recientemente se identifico que hay cinco epítopos principales dentro de la proteína gp200 (Nethery et al., 2006). La gp200-N (P43) contiene un epítopo principal individual y una región terminal carboxi, la gp200-C contiene dos epítopos de anticuerpos principales (Nethery et al., 2006). La respuesta al anticuerpo en ambas proteínas recombinantes gp200 se desarrollo más tarde que con gp36 y gp19, pero reaccionaron fuertemente con el anticuerpo en suero de la fase aguda tardía de perros experimentales. Estos hallazgos fueron consistentes con investigaciones previas en las cuales se observó una fuerte respuesta de anticuerpos en la fase aguda tardía a gp200 (McBride et al., 2003; McBride et l., 2001). Los anticuerpos para p28 de *E. canis* se desarrollaron más tarde en la respuesta inmune en fase aguda tardía. Se había reportado previamente una cinética de respuesta a anticuerpos similar que fue consistente con p28 natural y recombinante (McBride et al., 2003). Se observaron algunas respuestas no específicas a p28 en el formato de ELISA, pero esto es debido a otras proteínas contaminantes, en realizaciones específicas. La p28 es muy insoluble haciendo que producir una proteína recombinante altamente purificada sea muy difícil de lograr. No obstante, los resultados obtenidos por inmunoprecipitación Western en este estudio y otros estudios sugieren que p28/p30 altamente purificado es un antígeno de inmunodiagnóstico específico (Belanger et al., 2002; McBride et al., 2003; McBride et al., 2001).

Los primeros anticuerpos detectables de *E. canis* estaban dirigidos a gp36 y gp19 (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2003). Todas las proteínas recombinantes de *E. canis* proveyeron una sensibilidad similar a IFA en perros infectados por vía natural; sin embargo, en el grupo infectado experimentalmente de perros donde la cinética de la respuesta al

anticuerpo podría ser determinada con exactitud, gp36 y gp19 detectaron anticuerpos 7 a 14 días antes que IFA o ELISA utilizando gp200 y p28. Para nuestro conocimiento, esta es la primera demostración de que las proteínas especificas de la especie de *E. canis* son más sensibles que el antígeno de la célula entera para la detección de bajos niveles de anticuerpos producidos durante las infecciones erliquiales agudas tempranas. Muchas proteínas de *E. canis* pueden ser adecuadas para detectar anticuerpos en fases agudas tardías y las sensibilidades de las proteínas parecen estar relacionadas con la fase de la enfermedad. La sensibilidad de los antígenos de *E. canis* tales como p28/p30, gp200 y MAP2 para detectar anticuerpos parece ser mejor en una fase de enfermedad tardía donde los sueros contienen niveles medios a altos de anticuerpos. Sin embargo, los sueros con bajos niveles de anticuerpos tales como los obtenidos tempranamente en la infección, plantean más dificultades con estos antígenos recombinantes y con antígenos de células enteras (Harrus et al., 2002; O´Connor et al., 2006). Esta situación puede ser particularmente relevante para sueros recolectados a partir de perros tempranamente en la infección cuando los niveles de anticuerpos son bajos, y cuando un diagnóstico exacto puede ser más retador serológicamente.

Gp36 y gp19 tienen epítopos principales específicos de la especie ricos en serina que han sido identificados y caracterizados molecularmente (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2006). De la misma forma, los ortólogos de gp200 de *E. canis* y *E.chaffeensis* son distintos antigénicamente y tiene epítopos que han sido caracterizados molecularmente (McBride et al., 2003; McBride et al., 2001; Nethery et al., 2006). Los epítopos principales sobre gp36, gp19 y gp200 parecen tener inmunodeterminantes carbohidrato que contribuyen a la inmunorreactividad de los epítopos (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2006; Nethery et al., 2006). Estos antígenos inmunorreactivos principales pueden discriminar serológicamente entre *E. canis* y el organismo más cercanamente relacionado, *E. chaffeensis*, y permitirán el desarrollo de ensayos altamente específicos de la discriminación del agente infectante específico. Otro agente inmunorreactivo principal (gp120) de *E. chaffeensis* capaz de una discriminación específica de la especie sensible también ha sido reportado. (Yu et al., 1996; Yu et al., 1997; Yu et al., 1999). Así, antígenos recombinantes altamente definidos que incluyen los epítopos principales de gp36 y/o gp19 de *E. canis* y gp120 de *E. chaffeensis* podrían ser utilizados en el mismo ensayo para diagnóstico específico de infecciones por *E. canis* y *E. chaffeensis*.

La confiabilidad de los diagnósticos serológicos de infecciones con antígenos recombinantes o sintéticos depende de la falta de variabilidad antigénica del antígeno que se selecciona. En el caso de *E. canis*, muchos de los antígenos inmunorreactivos principales incluyendo gp36, gp19, gp200 y p28 que tienen el potencial de ser utilizados para serodiagnósticos, se conservan altamente en aislados distintos geográficamente (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2006; McBride et al., 2000; McBride et al., 1999; Yu et al., 2000). Por el contrario, la *E. chaffeensis* exhibe más diversidad entre aislados diferentes, pero el epítopo del anticuerpo del gp120 parece ser bien conservado (Chen et al., 1997; Doyle et al., 2006; Reddy and Streck, 2000; Doyle et al., 2006; Yu et al., 1997; Yu et al., 2000). Además, la expresión diferencial de las proteínas de membrana exterior principales (p28/p30), las cuales tienen regiones hipervariables antigénicamente distintivas que contienen epítopos de anticuerpos (Barnewall et al., 1999; Li et al., 2002; Li et al., 2002; McBride et al., 1999; Ohashi et al., 1998; Ohashi et al., 1998; Unver et al., 2002; Yu et al., 2000) puede contribuir también a variaciones en respuestas serológicas a *E. canis* y *E. chaffeensis*. Así, se concluye que los antígenos tales como gp36 y gp19 son proteínas genéticas simples altamente conservadas que minimizan o eliminan el potencial de variabilidad serológico que tienen el mejor potencial para desarrollo de inmunodiagnósticos ultrasensibles y específicos de la especie y globalmente útiles que superen estos obstáculos asociados con los serodiagnóticos CME.

Ejemplo 5

Vacunas de la invención

En aspectos particulares de la invención, las composiciones inmunogénicas de la presente invención son adecuadas como una vacuna, tal como una vacuna en subunidad. Las composiciones inmunogénicas también pueden denominarse como inmunoprotectoras.

Específicamente, una o más composiciones de la invención, tales como las que comprenden el epítopo de gp19 de *E. canis*, por ejemplo, se administran a un mamífero, tal como un animal humano, canino, bovino o equino, por ejemplo. El suero del mamífero puede ser probado en cuanto a su respuesta inmune, detectando anticuerpos en el suero. El mamífero es sometido entonces a un reto subsecuente con el organismo patogénico, tal como un organismo de *E. canis*, u otra composición apropiada, y se determina la inmunoprotección. Pueden emplearse controles, tales como inmunización con, por ejemplo, un epítopo mutado o un epítopo que no comprenda una unidad estructural carbohidrato. La protección completa o parcial contra el reto subsecuente demuestra la naturaleza inmunoprotectora de la composición y la composición es una vacuna. La protección parcial puede ser definida como la protección del desarrollo o un retardo en desarrollar al menos un síntoma de la infección o la protección de al menos un síntoma que se está haciendo peor.

Listado de secuencias

<110> MCBRIDE, JERE W. DOYLE, C. KUYLER

<120> GLICOPROTEÍNA IMMUNOREACTIVA GP19 DE EHRLICHIA CANIS

<130> CLFR:277WO

<140> DESCONOCIDO

<141> 2007-08-07

<150> 60/841,465 <151> 2006-08-31

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 1

cacgttcaaa atcatgttga 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 2

cacgttcaaa atcatgttga 20

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 3

cacgttcaaa atcatgttga 20

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 4

cattttactg gtcctact 18

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 5

tctattgata gtgtaggatg c 21

<210> 6

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 6

gcaggtttag agagctt 17

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 7

cgcacaatca caacagttgt 20

<210> 8

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 8

gcatactggt ctttcct 17

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 9

agatacttct tgtaactcca tt 22

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 10

agatacttct tgtaactcca tt 22

<210> 11

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 11

gcatactggt ctttcct 17

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 12

cgcacaatca caacagttgt 20

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 13

```
His Phe Thr Gly Pro Thr Ser Phe Glu Val Asn Leu Ser Glu Glu Glu
  1               5                  10                  15

Lys Met Glu Leu Gln Glu Val Ser
            20
```

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 14

aaaattagtg ttgtggttat g 21

<210> 15

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 15

ttttacgctt gctgaat 17

<210> 16

<211> 414

<212> ADN

<213> Ehrlichia canis

<400> 16

```
atgttacacg ttcaaaatca tgttgatcaa catacaaatc atatagaaca tgatgattac 60
cattttactg gtcctactag ttttgaagtt aatctttctg aagaagaaaa aatggagtta 120
caagaagtat cttctattga tagtgtagga tgcgaagatt gtgatccaaa ttgtcgttat 180
cctttagaat tagtagaatg tcagcgtatt gaggaaagac cagtatgcaa tgcaggttta 240
gagagcttga ctgttgatgc atatcaatta ggattgttgt taggtggttt tttaagtgct 300
atgaattaca tatcttatag ctatccttgt tattattatg attgttgtga tagaaattat 360
tacgactgtt gtcataagaa tgcgtgttat tacaactgtt gtgattgtgc gtaa       414
```

<210> 17

<211> 137

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 17

```
Met Leu His Val Gln Asn His Val Asp Gln His Thr Asn His Ile Glu
  1               5                  10                  15

His Asp Asp Tyr His Phe Thr Gly Pro Thr Ser Phe Glu Val Asn Leu
             20                  25                  30

Ser Glu Glu Glu Lys Met Glu Leu Gln Glu Val Ser Ser Ile Asp Ser
         35                  40                  45

Val Gly Cys Glu Asp Cys Asp Pro Asn Cys Arg Tyr Pro Leu Glu Leu
     50                  55                  60

Val Glu Cys Gln Arg Ile Glu Glu Arg Pro Val Cys Asn Ala Gly Leu
 65                  70                  75                  80

Glu Ser Leu Thr Val Asp Ala Tyr Gln Leu Gly Leu Leu Leu Gly Gly
                 85                  90                  95

Phe Leu Ser Ala Met Asn Tyr Ile Ser Tyr Ser Tyr Pro Cys Tyr Tyr
            100                 105                 110
```

```
Tyr Asp Cys Cys Asp Arg Asn Tyr Tyr Asp Cys Cys His Lys Asn Ala
        115                 120                 125

Cys Tyr Tyr Asn Cys Cys Asp Cys Ala
    130                 135
```

<210> 18

<211> 414

<212> ADN

<213> Ehrlichia canis

<400> 18

```
atgttacacg ttcaaaatca tgttgatcaa catacaaatc atatagaaca tgatgattac 60
cattttactg atcctactag ttttgaagtt aatctttctg aagaagaaaa aatggagtta 120
caagaagtat cttctattga tagtgtagga tgcgaagatt gtgatccaaa ttgtcgttat 180
cctttagaat tagtagaatg tcagcgtatt gaggaaagac cagtatgcaa tgcaggttta 240
gagagcttga ctgttgatgc atatcaatta ggattgttgt taggtggttt tttaagtgct 300
atgaattaca tatcttatag ctatccttgt tattattatg attgttgtga tagaaattat 360
tacgactgtt gtcataagaa tgcgtgttat tacaactgtt gtgattgtgc gtaa       414
```

<210> 19

<211> 137

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 19

```
Met Leu His Val Gln Asn His Val Asp Gln His Thr Asn His Ile Glu
  1               5                  10                  15

His Asp Asp Tyr His Phe Thr Asp Pro Thr Ser Phe Glu Val Asn Leu
             20                  25                  30

Ser Glu Glu Glu Lys Met Glu Leu Gln Glu Val Ser Ser Ile Asp Ser
         35                  40                  45

Val Gly Cys Glu Asp Cys Asp Pro Asn Cys Arg Tyr Pro Leu Glu Leu
     50                  55                  60

Val Glu Cys Gln Arg Ile Glu Glu Arg Pro Val Cys Asn Ala Gly Leu
 65                  70                  75                  80

Glu Ser Leu Thr Val Asp Ala Tyr Gln Leu Gly Leu Leu Leu Gly Gly
                 85                  90                  95

Phe Leu Ser Ala Met Asn Tyr Ile Ser Tyr Ser Tyr Pro Cys Tyr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Asp Cys Cys Asp Arg Asn Tyr Tyr Asp Cys Cys His Lys Asn Ala
        115                 120                 125

Cys Tyr Tyr Asn Cys Cys Asp Cys Ala
    130                 135
```

<210> 20

<211> 72

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 20

catttactg gtcctactag ttttgaagtt aatctttctg aagaagaaaa aatggagtta 60
caagaagtat ct 72

Referencias

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta especificación son indicativas del nivel de los experimentados en la técnica a los cuales es pertinente la invención.

Patentes y solicitudes de patente

Patente de los Estados Unidos 5, 440,013

Patente de los Estados Unidos 5, 618,914

Patente de los Estados Unidos 5, 670,155

Patente de los Estados Unidos 5, 446,128

Patente de los Estados Unidos 5, 710,245

Patente de los Estados Unidos 5, 840,833

Patente de los Estados Unidos 5, 859,184

Patente de los Estados Unidos 5, 929,237

Patente de los Estados Unidos 5, 475,085

Patente de los Estados Unidos 5, 672,681

Patente de los Estados Unidos 5, 674,976

Patente de los Estados Unidos 5, 554,101

Publicaciones

Alleman, A. R., A. F. Barbet, M. V. Bowie, H. L. Sorenson, S. J. Wong, and M. Belanger. 2000. Expression of a gene encoding the major antigenic protein 2 homolog of Ehrlichia chaffeensis and potential application for serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 38:3705-3709.

Alleman, A. R., L. J. McSherry, A. F. Barbet, E. B. Breitschwerdt, H. L. Sorenson, M. V. Bowie, and M. Belanger. 2001. Recombinant major antigenic protein 2 of Ehrlichio canis: a potential diagnostic tool. J. Clin. Microbiol. 39: 2494-2499.

Barnewall, R. E., N. Ohashi, and Y. Rikihisa. 1999. Ehrlichia chaffeensis and E. sennetsu, but not the human granulocytic erhlichiosis agent, colocalize with transferrin receptor and up-regulate transferrin receptor mRNA by activating iron-responsive protein 1. Infect.Immun. 67:2258-2265.

Belanger, M., H. L. Sorenson, M. K. France, M. V. Bowie, A. F. Barbet, E. B. Breitschwerdt, and A. R. Alleman. 2002. Comparison of serological detection methods for diagnosis of Ehrlichia canis infections in dogs. J Clin Microbiol. 40:3506-3508.

Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze ADN sequences. Nucleic Acids Res. 27:573-580.

Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty, and S. I. Hancock. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, or Bartonella vinsonii. J.Clin.Microbiol. 36:2645-2651.

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

Chen, S. M., V. L. Popov, H. M. Feng, J. Wen, and D. H. Walker. 1995. Cultivation of Ehrlichia chaffeensis in mouse embryo, Vero, BGM, and L929 cells and study of Ehrlichia-induced cytopathic effect and plaque formation. Infect.Immun. 63:647-655.

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.

Codner, E. C. and L. L. Farris-Smith. 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. J.Am.Vet.Med.Assoc. 189:47-50.

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.

Corner, J. A., W. L. Nicholson, J. G. Olson, and J. E. Childs. 1999. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. J.Clin.Microbiol. 37:558-564.

Cowell, R. L., R. D. Tyler, K. D. Clinkenbeard, and J. H. Meinkoth. 1988. Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. J.Am.Vet.Med.Assoc. 192:1093-1095.

Dawson, J. E. and S. A. Ewing. 1992. Susceptibility of dogs to infection with Ehrlichia chaffeensis, causative agent of human ehrlichiosis. Am.J Vet.Res. 53:1322-1327.

Dawson, J. E., K. L. Biggie, C. K. Warner, K. Cookson, S. Jenkins, J. F. Levine, and J. G. Olson. 1996. Polymerase chain reaction evidence of Ehrlichia chaffeensis, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. Am.J.Vet.Res. 57:1175-1179.

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 dispar early antibody responses to epitopes on glicosylated tandem repeats. Infect. Immun. 74:711-720.

Doyle, C. K., M. B. Labruna, E. B. Breitschwerdt, Y. W. Tang, R. E. Corstvet, B. C. Hegarty, K. C. Bloch, P. Li, D. H. Walker, and J. W. McBride. 2005. Detection of medically important Ehrlichia spp. by quantitative multicolor Taqman real-time PCR of the dsb gene. J.Mol.Diagn. 10:504-510.

Doyle, C. K., X. Zhang, V. L. Popov, and J. W. McBride. 2005. An immunoreactive 38-kilodalton protein of Ehrlichia canis shares structural homology and iron-binding capacity with the ferric ion-binding protein family. Infect. Immun. 73:62-69.

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.

Gaunt, S. D., R. E. Corstvet, C. M: Berry, and B. Brennan. 1996. Isolation of Ehrlichia canis from dogs following subcutaneous inoculation. J.Clin.Microbiol. 34:1429-1432.

Goldman, E. E., E. B. Breitschwerdt, C. B. Grindem, B. C. Hegarty, J. J. Walls, and J. S. Dumler. 1998. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. J Vet Intern Med 12:61-70.

Harrus, S., A. R. Alleman, H. Bark, S. M. Mahan, and T. Waner. 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis. Vet.Microbiol. 86:361-368.

Hinc, K., K. Nagorska, A. Iwanicki, G. Wegrzyn, S. J. Seror, and M. Obuchowski. 2006. Expression of genes coding for GerA and GerK spore germination receptors is dependent on the protein phosphatase PrpE. J Bacteriol 188:4373-4383.

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-glicosylation sites. Glicobiology 15:153-164.

Knowles, T. T., A. R. Alleman, H. L. Sorenson, D. C. Marciano, E. B. Breitschwerdt, S. Harrus, A. F. Barbet, and M. Belanger. 2003. Characterization of the major antigenic protein 2 of Ehrlichia canis and Ehrlichia chaffeensis and its application for serodiagnosis of ehrlichiosis. Clin. Diagn. Lab Immunol. 10:520-524.

Kordick, S. K., E. B. Breitschwerdt, B. C. Hegarty, K. L. Southwick, C. M. Colitz, S. I. Hancock, J. M. Bradley, R. Rumbough, J. T. Mcpherson, and J. N. MacCormack. 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker hound kennel in North Carolina. J.Clin.Microbiol. 37:2631-2638.

Kuehn, N. F. and S. D. Gaunt. 1985. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. J.Am.Vet.Med.Assoc. 186:355-358.

Levine, A., F. Vannier, C. Absalon, L. Kuhn, P. Jackson, E. Scrivener, V. Labas, J. Vinh, P. Courtney, J. Garin, and S. J. Seror. 2006. Analysis of the dynamic Bacillus subtilis Ser/Thr/Tyr phosphoproteome implicated in a wide varietyJ.Am.Vet.Med.Assoc. 189:47-50. of cellular processes. Proteomics. 6:2157-2173.

Li, J. S., E. Yager, M. Reilly, C. Freeman, G. R. Reddy, A. A. Reilly, F. K. Chu, and G. M. Winslow. 2001. Outer membrane protein-specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracelular bacterial pathogen Ehrlichia chaffeensis. J.Immunol. 166:1855-1862.

Li, J. S., F. Chu, A. Reilly, and G. M. Winslow. 2002. Antibodies highly effective in SCID mice during infection by the intracellular bacterium Ehrlichio chaffeensis are of picomolar affinity and exhibit preferential epitope and isotype utilization. J.Immunol. 169:1419-1425.

Madec, E., A. Laszkiewicz, A. Iwanicki, M. Obuchowski, and S. Seror. 2002. Characterization of a membranelinked Ser/Thr protein kinase in Bacillus subtilis, implicated in developmental processes. Mol. Microbiol. 46:571-586.

Mahan, S. M., T. C. McGuire, S. M. Semu, M. V. Bowie, F. Jongejan, F. R. Rurangirwa, and A. F. Barbet. 1994. Molecular cloning of a gene encoding the immunogenic 21 kDa protein of Cowdria ruminantium. Microbiol. 140 (Pt 8):2135-2142.

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. Kypides. 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 glicoprotein ortholog of E. chaffeensis. variable length PCR target contains a single serine-rich epitope defined by a carbohydrate immunodetermiant. Infect.Immun.

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

McBride JW, R. E. Corstvet, S. D. Gaunt, C. Boudreaux, 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 glicoprotein 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., 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. Glicosylation 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.

Ndip, L. M., R. N. Ndip, S. N. Esemu, V. L. Dickmu, E. B. Fokam, D. H. Walker, and J. W. McBride. 2005. ehrlichial infection in Cameroonian canines by Ehrlichia canis and Ehrlichia ewingii. Vet. Microbiol. 111:59-66.

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 glicoprotein (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., Doyle C.K., X. F. Zhang, and McBride J.W. 2006. Ehrlichia canis gap200 contains five major B cell epitopes defined by O-linked carbohydrate immunodeterminants. Infect.Immun.

Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng 10:1-6.

Obuchowski, M., E. Madec, D. Delattre, G. Boel, A. Iwanicki, D. Foulger, and S. J. Seror. 2000. Characterization of PrpC from Bacillus subtilis, a member of the PPM phosphatase family. J Bacteriol 182:5634-5638.

O'Connor, T. P., Esty K.J., MacHenry P., and Hanscom J.L. 2002. Performance evaluation of Ehrlichia canis and Borrelia burgdorferi peptides in a new Dirofilaria immitis combinantion assay., p. 77-84. In Recent advances in heartworm disease: symposium '01. American Heartworm Society, Batavia, I11.

O'Connor, T. P., J. L. Hanscom, B. C. Hegarty, R. G. Groat, and E. B. Breitschwerdt. 2006. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of Ehrlichia canis antibodies in canine sera. Am.J Vet.Res. 67:206-210.

Ohashi, N., A. Unver, N. Zhi, and Y. Rikihisa. 1998. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of Ehrlichia canis and application of the recombinant protein for serodiagnosis, J.Cin.Microbiol. 36:2671-2680.

Ohashi, N., N. Zhi, Y. Zhang, and Y. Rikihisa. 1998. Immunodominant major outer membrane proteins of Ehrlichia chaffeensis are encoded by a polymorphic multigene family. Infect.Immun. 66:132-139.

Reddy, G. R. and C. P. Streck. 2000. Variability in the 28-kDa surface antigen protein multigene locus of isolates of the emerging disease agent Ehrlichia chaffeensis suggests that it plays a role in immune evasion [published erratum appears in Mol Cell Biol Res Commun 2000 Jan;3(1):66]. Mol.Cell.Biol.Res.Commun. 1:167-175.

Reddy, G. R., C. R. Sulsona, A. F. Barbet, S. M. Mahan, M. J. Burridge, and A. R. Alleman. 1998. Molecular characterization of a 28 kDa surface antigen gene family of the tribe Ehrlichieae. Biochem.Biophys.Res.Commun. 247:636-643.

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.

Sirigireddy, K. R. and R. R. Ganta. 2005. Multiplex detection of Ehrlichia and Anaplasma species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Mol Diagn 7:308-316.

Stockham, S. L., D. A. Schmidt, K. S. Curtis, B. G. Schauf, J. W. Tyler, and S. T. Simpson. 1992. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to Ehrlichia canis, Ehrlichia equi and Borrelia burgdorferi. Am.J.Vet.Res. 53:63-68.

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.

Troy, G. C. and S. D. Forrester. 1990. Canine ehrlichiosis, p. 404-418. In C. E. Green (ed.), Infectious diseases of the dog and cat. W.B. Sauders Co., Philadelphia.

UniProt Database, "Major outer membrane protein p19; XP 00 24 88937 retrieved from EBI accession No. UNIPROT: Q3Yse1 Database accession No. Q 3y5z1, september 27, 2005

Unver, A., Y. Rikihisa, R. W. Stich, N. Ohashi, and S. Felek. 2002. The omp-1 major outer membrane multigene family of Ehrlichia chaffeensis is differentially expressed in canine and tick hosts. Infect.Immun. 70:4701-4704.

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

Waner, T., S. Harrus, F. Jongejan, H. Bark, A. Keysary, and A. W. Cornelissen. 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis. Vet.Parasitol. 95:1-15.

Weisshoff et al., 1999, "Mimicry of beta II'-turns of proteins in cyclic pentapeptides with one and without Damino 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, 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. Crocquet-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. Crocquet-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. Crocquet-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.

Zhang, X. F., J. Z. Zhang, S. W. Long, R. P. Ruble, and X. J. Yu. 2003. Experimental Ehrlichia chaffeensis infection in beagles. J.Med.Microbiol. 52:1021-1026.

REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende uno o más de los siguientes:

(a) un polipéptido aislado que consiste de SEQ ID NO: 13, o una parte inmunogénica del mismo; o

(b) un polipéptido aislado que es al menos 75% idéntico a SEQ ID NO: 13 y que tiene de 24 a 50 aminoácidos de longitud.

2. Una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos 75% de identidad con SEQ ID NO: 13 y que tiene de 24 a 50 aminoácidos de longitud, en donde dicho polipéptido es codificado por:

(a) un polinucleótido de SEQ ID NO: 20; o

(b) un polinucleótido que es capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas al polinucleótido de (a).

3. La composición de la reivindicación 1 o 2, definida adicionalmente como una composición farmacéutica, en donde dicho polipéptido está disperso en un diluyente farmacéuticamente aceptable.

4. La composición de las reivindicaciones 1–3, en donde dicha composición se define adicionalmente como una composición de vacuna, o en donde el polipéptido está definido adicionalmente por comprender una o más unidades estructurales carbohidratos.

5. La composición de las reivindicaciones 1–3, en donde el polipéptido de (b) está definido adicionalmente por ser al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95% idéntico a SEQ ID NO: 13.

6. Un polinucleótido aislado de SEQ ID NO: 20; o un polinucleótido que es capaz de hibridar bajo condiciones restrictivas a dicho polinucleótido y que codifica un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 13 y que tiene de 24 a 50 aminoácidos de longitud, en donde dicha molécula de ácido nucleico está enlazada operativamente a un promotor heterólogo.

7. El polinucleótido aislado de la reivindicación 6, en donde se define adicionalmente como un polinucleótido que codifica un polipéptido que es al menos 75%, o al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95% idéntico a SEQ ID NO: 13.

8. El polinucleótido aislado de la reivindicación 6, en donde el promotor heterólogo es un promotor eucariota o un promotor procariota, o en donde dicho polinucleótido está definido adicionalmente por estar comprendido en un vector, en particular en donde dicho vector es un vector viral o un vector no viral, más en particular en donde dicho vector viral comprende un vector adenoviral, un vector retroviral, o un vector viral adenoasociado, o en donde dicho polinucleótido está comprendido en un liposoma.

9. Un anticuerpo aislado que reacciona inmunológicamente con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13 en donde dicho anticuerpo es monoclonal o es un fragmento de anticuerpo.

10. Un método para producir un polipéptido, que comprende:

proveer a una célula huésped que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 6-8; y

cultivar la célula bajo condiciones adecuadas para que la célula huésped exprese el polinucleótido para producir el polipéptido codificado, en particular que comprende adicionalmente aislar el polipéptido.

11. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para uso en un método para inducir una respuesta inmune en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de dicha composición.

12. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para uso en un método para inhibir infección por *E, canis* en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto antes de la exposición o sospechoso de estar expuesto a o infectado con *E. canis*, una cantidad efectiva de dicha composición.

13. Un método para identificar una infección por *E, canis* en un individuo, que comprende la etapa de probar una muestra del individuo para uno o ambos de los siguientes:

(a) un polipéptido de SEQ ID NO: 13; o

(b) un anticuerpo que reacciona inmunológicamente con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

14. El método de la reivindicación 13, en donde (b) está definido adicionalmente como el ensayo para un anticuerpo por ELISA, en particular en donde ELISA permite probar uno o más anticuerpos de *E*. *canis* diferentes al anticuerpo de (b), más en particular en donde los otros anticuerpos de *E. canis* se seleccionan del grupo consistentes de anticuerpos para gp36, gp19, gp28/30 y gp200.

15. Un kit, que comprende una o más de las siguientes composiciones:

(a) un polipéptido aislado consistente de SEQ ID NO: 13;

(b) un polipéptido aislado que es al menos 75% idéntico a SEQ ID NO: 13 y que tiene de 24 a 50 aminoácidos de longitud; o

(c) un anticuerpo aislado que reacciona inmunológicamente con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en donde dicho anticuerpo es monoclonal o es un fragmento de anticuerpo.

FIG. 1

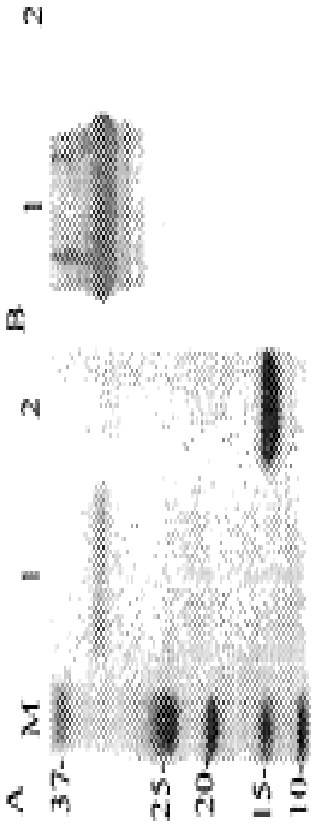

FIG. 2

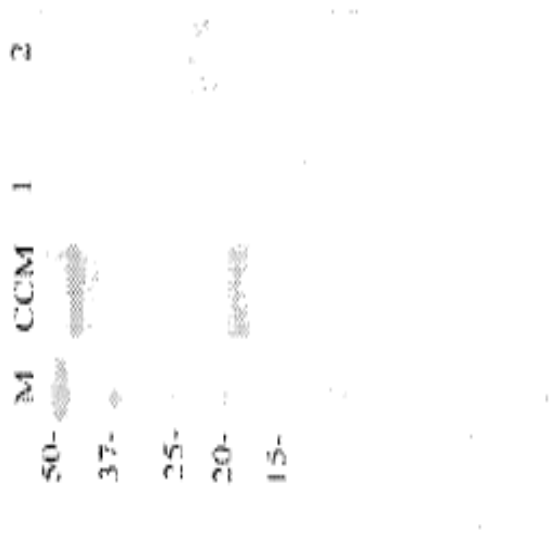

FIG. 3

FIG. 4

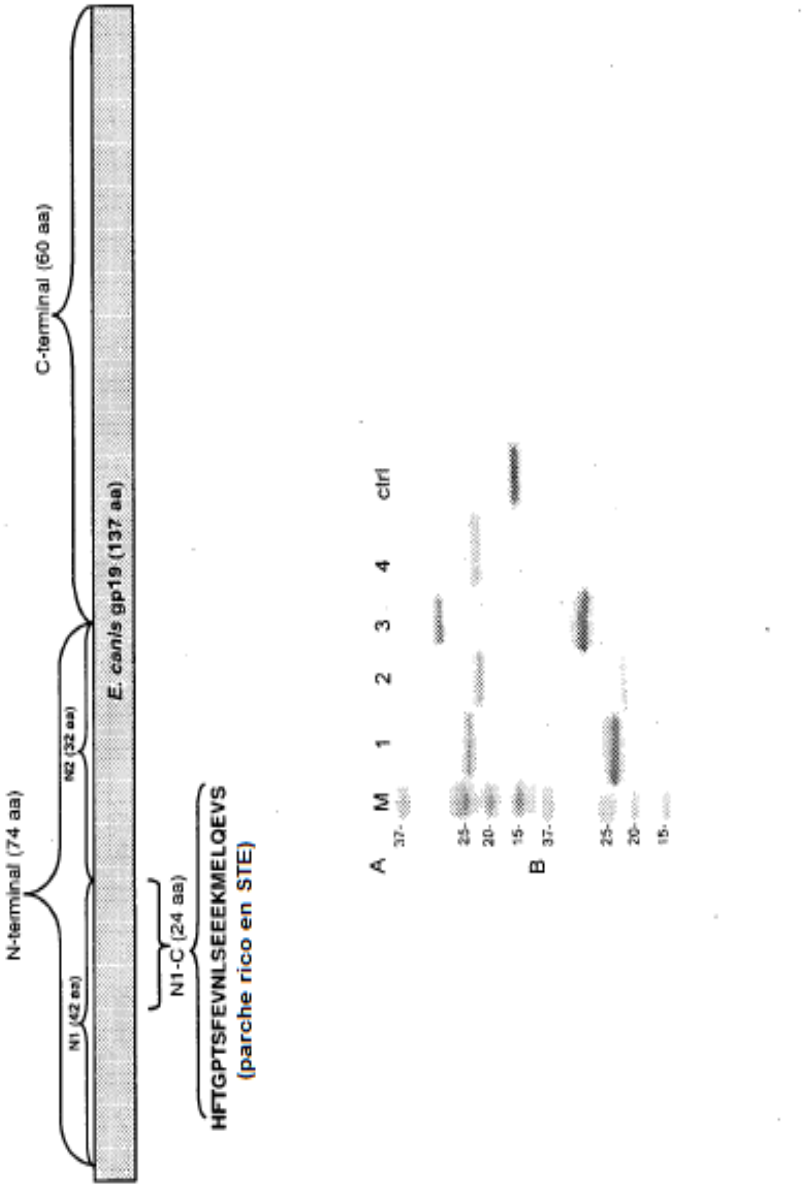
N-terminal (74 aa)
N1 (42 aa)
N2 (32 aa)
C-terminal (60 aa)
E. canis gp19 (137 aa)
N1-C (24 aa)
HFTGPTSFEVNLSEEEKMELQEVS
(parche rico en STE)
A
M
1
2
3
4
ctrl
37-
25-
20-
15-
B
37-
25-
20-
15-

FIG. 5

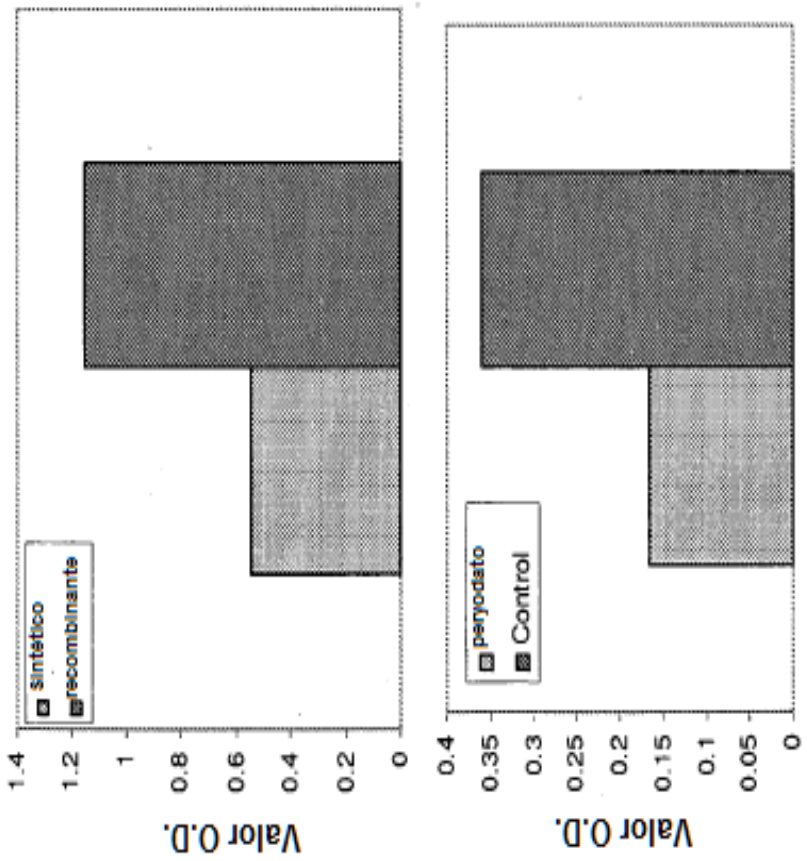
Valor O.D.
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
sintético
recombinante
Valor O.D.
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
penyodato
Control

FIG. 6

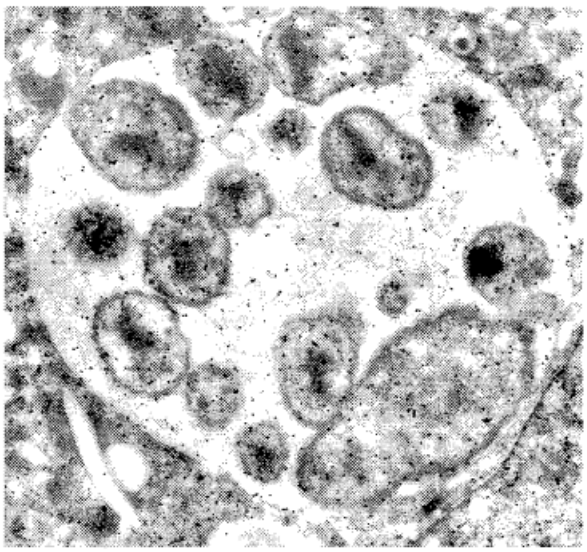

FIG. 7

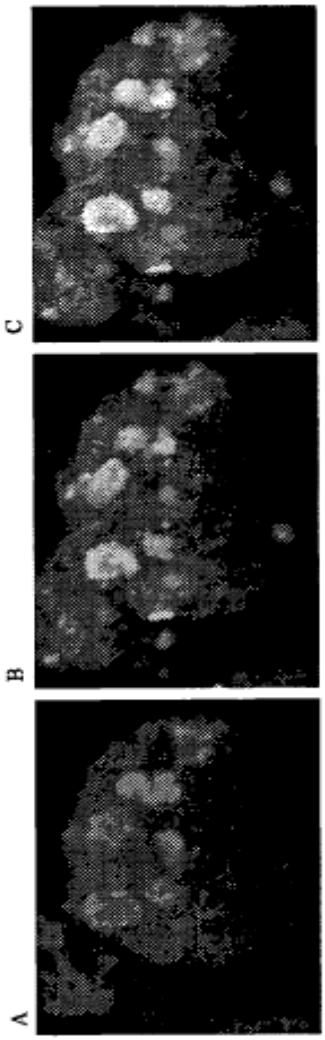

FIG. 8

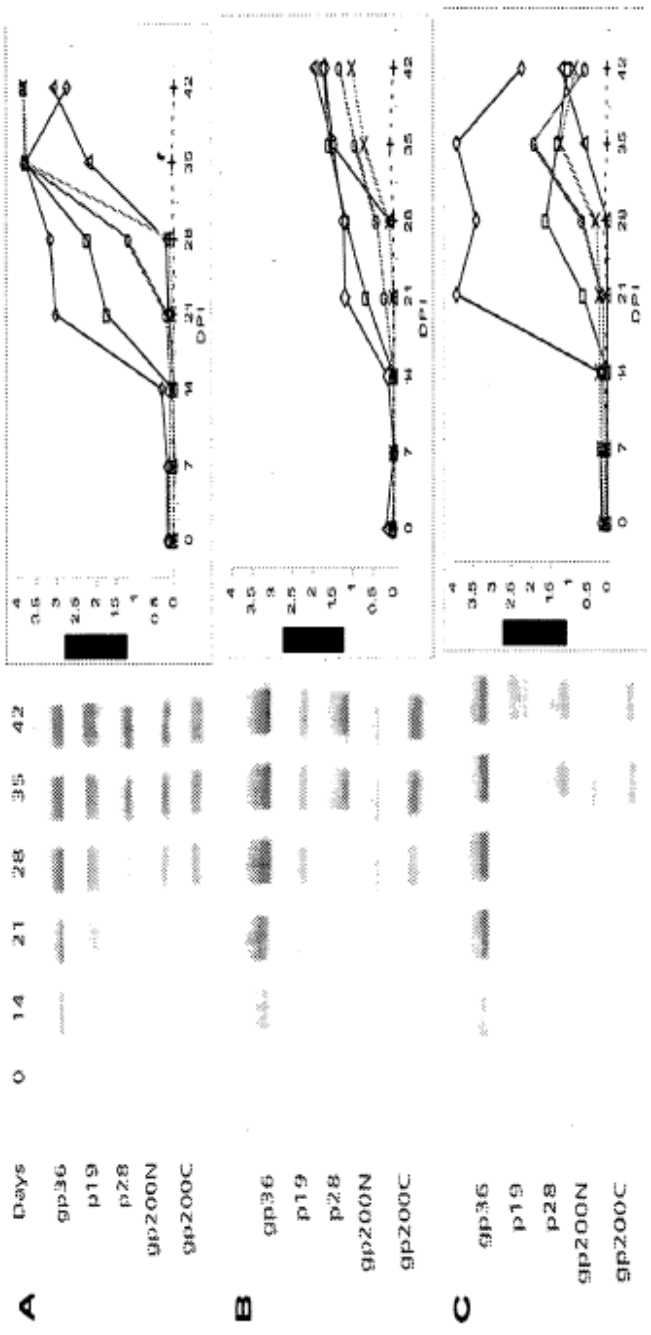

FIG. 9