



**MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO**  
**DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE**  
**UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI**

|                                     |                        |
|-------------------------------------|------------------------|
| <b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b> | <b>102010901860436</b> |
| <b>Data Deposito</b>                | <b>23/07/2010</b>      |
| <b>Data Pubblicazione</b>           | <b>23/01/2012</b>      |

Classifiche IPC

Titolo

USO DI SEQUENZE AMMINOACIDICHE DA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS O DEI LORO CORRISPONDENTI ACIDI NUCLEICI PER LA DIAGNOSI E LA PREVENZIONE DI INFEZIONE TUBERCOLARE, RELATIVO KIT DIAGNOSTICO E VACCINO.

- 1 -

Uso di sequenze amminoacidiche da *Mycobacterium tuberculosis* o dei loro corrispondenti acidi nucleici per la diagnosi e la prevenzione di infezione tubercolare, relativo kit diagnostico e vaccino

-----

La presente invenzione concerne l'uso di sequenze amminoacidiche da *Mycobacterium tuberculosis* o dei loro corrispondenti acidi nucleici per la diagnosi e la prevenzione di infezione tubercolare, relativo kit diagnostico e vaccino.

Più in particolare l'invenzione si riferisce all'uso di sequenze geniche o di loro parti caratterizzate dal fatto di appartenere alle classi di geni indotti, repressi o conservati *in vitro* ed *ex vivo* in macrofagi umani in corso di infezione da *Mycobacterium tuberculosis* e dei loro corrispondenti peptidi o peptidi consenso o proteine per la preparazione di bio-marcatori specifici per la diagnosi e per la prevenzione della malattia attiva o latente.

La diagnosi di laboratorio dell'infezione tubercolare e della malattia attiva al suo esordio è molto importante per garantire la specificità, la rapidità e l'efficacia dell'intervento terapeutico.

Per quanto riguarda la malattia attiva tubercolare, i protocolli diagnostici attuali sono basati su metodi microscopici, colturali o molecolari. Per quanto riguarda l'esame microscopico, è necessaria una elevata concentrazione di micobatteri nel campione biologico (da 5 a 10.000 per ml) per poter ottenere un risultato positivo e la sensibilità è generalmente inferiore al 60% con specificità ridotta dall'incapacità del test di discriminare MTB dai micobatteri non tubercolari.

Per quanto riguarda i test colturali, essi non

-2-

garantiscono l'emissione del referto in tempi accettabili. Infatti, le colonie di MTB risultano visibili solo dopo 10-24 giorni dalla semina nei terreni di coltura liquidi o solidi (1), in quanto il batterio cresce lentamente *in vitro*. Per di più, i test colturali, per quanto siano considerati altamente sensibili, producono un tasso di falsi negativi del 10-30% e sono costosi.

I test di biologia molecolare sono altamente sensibili e specifici, con una sensibilità sovrapponibile a quella dei test colturali, e la capacità di discriminare rapidamente MTB dai micobatteri non tubercolari. Tuttavia, la loro sensibilità è significativamente minore nei campioni con bassa concentrazione di micobatteri, ossia quelli negativi all'esame microscopico, inoltre necessitano di laboratori altamente specialistici e sono molto costosi.

La tubercolosi è ancora un'emergenza della sanità pubblica mondiale a causa della mancanza delle risorse economiche necessarie all'allestimento di programmi di diagnosi e di cura efficienti nei paesi ad elevata incidenza ed a causa della difficoltà diagnostica nei segmenti di popolazione affetti nei paesi industrializzati a bassa incidenza tubercolare.

Attualmente, nei paesi ad alta incidenza, la diagnosi di TB attiva si basa sull'esame microscopico (sensibilità 40-90%) e colturale per MTB (sensibilità 70-90%) con tempi di attesa per la conferma colturale tra le 2-6 settimane. Nei paesi industrializzati a bassa incidenza, la diagnosi di TB attiva si basa sui test microscopico, colturale e, per la discriminazione fra MTB e micobatteri non tubercolari o per i campioni microscopicamente negativi, sui test molecolari

- 3 -

(sensibilità 70-90%).

Per quanto riguarda la diagnosi di infezione tubercolare latente, o non attiva, il classico test diagnostico è il test cutaneo alla tubercolina, un saggio diagnostico *in vivo* economico e rapido che, standardizzato negli anni '50 offre la possibilità di rilevare accuratamente e rapidamente l'infezione permettendo così essenziali rilevazioni epidemiologiche di incidenza e prevalenza dell'infezione tubercolare. Il test tubercolinico ha permesso, dal punto di vista della sanità pubblica, di monitorare la incidenza e prevalenza dell'infezione al fine di un controllo globale della malattia e, dal punto di vista della medicina preventiva e clinica, di identificare i contatti infetti da portatori di TB attiva, consentendo di instaurare rapidamente i presidi terapeutici contro l'infezione tubercolare al fine di impedire l'insorgenza di nuovi casi. La diagnosi di infezione latente è quindi un elemento fondamentale della lotta contro la tubercolosi sia nei paesi ad alta che a bassa incidenza di malattia.

Le numerose osservazioni di immunologia cellulare e molecolare hanno dimostrato che il contatto con MTB, o con i suoi antigeni, *in vitro* evoca una forte risposta cellulo-mediata caratterizzata da un'alta produzione di interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ). Ciò ha suggerito che l'identificazione dei linfociti T che rilasciano IFN- $\gamma$  o la misura della stessa citochina, in risposta al micobatterio, o ai suoi antigeni, rappresenta un modo per diagnosticare l'avvenuta infezione in maniera equivalente al test tubercolinico.

A questo proposito sono stati recentemente messi in commercio due kit per la diagnosi di infezione tubercolare, il QuantiFERON-TB Gold ed il T-SPOT TB,

-4-

che utilizzano proteine o peptidi disegnati su geni di MTB, appartenenti alla regione di differenziazione RD1 del genoma di MTB, per stimolare la produzione di IFN- $\gamma$  nei linfociti T del circolo sanguigno. Il costo dei kit è abbastanza elevato per essere impiegato su larga scala nei paesi ad alta incidenza di tubercolosi. La sensibilità dei due kit commerciali è simile, con una gamma di sensibilità fra 70 e 90% ed una gamma di specificità fra 80 e 95%. (2). Peraltro, è ancora abbastanza controversa la sensibilità e specificità di questi kit impiegati nelle aree ad alta incidenza di tubercolosi, rispetto al test tubercolinico, tradizionalmente impiegato. Ci sono infatti casi in cui il test cutaneo si dimostra addirittura più sensibile del Quantiferon (3) e casi in cui i due test sono esattamente paragonabili (4).

Il test diagnostico ancora più largamente in uso, il test cutaneo alla tubercolina, eseguito con il metodo multi puntura o con iniezione intradermica di Mantoux, trova i suoi maggiori limiti nella complessità operativa e nella insufficiente specificità. Infatti, il test comporta per il paziente una visita per l'iniezione della tubercolina ed una seconda visita per la lettura del test da parte di personale sanitario specializzato. Per il personale sussiste il rischio di contaminazione con le siringhe per iniezione intradermica in caso di co-infezione TB-HIV. Per quanto riguarda le specificità del test tubercolinico, è noto che il derivato proteico purificato della tubercolina (Purified protein derivative, PPD) mostra cross-reattività con *M.bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) utilizzato per la vaccinazione anti-tubercolare e con diversi micobatteri non tubercolari ambientali, che mostrano un'elevata omologia di sequenza con il genoma

- 5 -

del bacillo di Kock (5, 6). Quindi, gli individui vaccinati con BCG, od anche coloro che siano recentemente entrati in contatto con la specie virulenta di MTB, rappresentata nei laboratori di ricerca dal ceppo di collezione H37Rv, (ATCC 27294), risulteranno positivi al test tubercolinico, anche se con una intensità di reazione minore di coloro che siano infettati da MTB. Per questo motivo, sono stati stabiliti limiti di intensità di positività discriminanti la reattività verso MTB da quella risultante dall'immunità anti *M-bovis* BCG o micobatteri non tubercolari.

Tali limiti di intensità, tuttavia, non sono sufficientemente specifici per diagnosticare con sicurezza l'infezione tubercolare in una popolazione vaccinata od esposta intensamente a micobatteri ambientali.

Per quanto riguarda la prevenzione dell'infezione da MTB, l'unico vaccino ad oggi esistente per la profilassi della malattia tubercolare è il *M. bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) (ATCC 27291), vaccino basato su un ceppo di *M.bovis* avirulento, utilizzato in tutto il mondo da circa 75 anni.

Alla luce di quanto esposto sopra risulta pertanto evidente la necessità di poter disporre di nuovi kit diagnostici e vaccini basati sull'impiego di peptidi specifici in grado di superare gli svantaggi della tecnica finora nota.

Numerosi sono gli studi che hanno correlato la risposta dei linfociti del sangue periferico a proteine e peptidi di MTB con la presenza di infezione latente, o di recente contatto con pazienti TB, e di malattia attiva tubercolare utilizzando la tecnica dell'ELISPOT per il rilevamento delle cellule mononucleate del

- 6 -

sangue capaci di produrre IFN- $\gamma$  in seguito a stimolazione (7-15). L'ELISPOT è una tecnica che permette, attraverso la stimolazione di cellule mononucleate del sangue, su piastra di coltura sensibilizzata con anticorpi diretti contro una citochina (ad esempio IFN- $\gamma$ ), di rilevare la frequenza dei linfociti T che producono la citochina in risposta a stimolazione con uno o più antigeni, che possono essere rappresentati da proteine, peptidi o altre molecole bersaglio.

I linfociti T riconoscono l'antigene con il loro recettore T per l'antigene (TCR) quando l'antigene è presentato in forma di peptide (di 8-12 aminoacidi di lunghezza), che rappresenta l'epitopo, legato ad una delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), una famiglia di recettori espressi sulla membrana plasmatica di tutte le cellule nucleate (per quanto riguarda le molecole MHC di classe I) e delle cellule presentanti antigene quali cellule dendritiche, macrofagi etc. (per quanto riguarda le molecole MHC di classe II). Nell'uomo il sistema MHC è rappresentato da diverse varianti isotipiche, HLA-A, HLA-B e HLA-C per le molecole di classe I; HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR per le molecole di classe II. Ognuna di queste presenta un diverso numero di varianti alleliche. Poiché il repertorio di antigeni riconosciuto dal TCR delle cellule T è determinato dalla capacità dei recettori MHC delle cellule presentanti antigene dell'individuo di legare peptidi derivati dalla digestione delle proteine antigeniche, condizione indispensabile perché il peptide sia riconosciuto come antigene e sia pertanto capace di attivare i linfociti T specifici per la proteina antigenica è la sua capacità di essere legato dai

-7-

recettori MHC.

I geni codificanti per le molecole HLA sono fra i geni maggiormente polimorfici presenti nel genoma umano. Importante è al riguardo la nozione che molte delle differenze nei singoli prodotti allelici di queste molecole sono rappresentate da cambi di base codificanti per cambiamenti della sequenza amminoacidica delle aree deputate al legame del peptide antigenico. Questi cambiamenti di sequenza determinano le proprietà di legame delle differenti varianti alleliche delle molecole HLA e quindi il repertorio di peptidi antigenici con i quali dette varianti alleliche saranno capaci di formare un complesso trimolecolare con il TCR dei linfociti T ed attivare i linfociti medesimi.

Nel contesto del riconoscimento di antigeni proteici di MTB, è importante considerare che ogni singolo epitopo del micobatterio può essere legato da una o più varianti alleliche dell'HLA, ma non necessariamente da tutte le varianti alleliche espresse in una popolazione. Inoltre, poiché ogni individuo non omozigote esprime almeno due varianti alleliche di HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ e da due a quattro varianti di HLA-DR, nei soggetti che compongono la popolazione in esame epitopi diversi possono essere riconosciuti nel contesto della stessa variante allelica o di varianti alleliche dei diversi isotipi.

Appare quindi chiaramente come il set di peptidi capace di legarsi alle varianti alleliche dei diversi isotipi HLA espressi da ogni singolo soggetto in una popolazione possa essere diverso. Da ciò deriva la necessità di impiegare set di peptidi antigenici capaci di rappresentare nel modo più esaustivo possibile il repertorio di epitopi peptidici di MTB riconosciuto dai



- 8 -

linfociti T dei soggetti della popolazione in esame. Al riguardo va rilevato che, sebbene l'intero genoma di MTB sia stato sequenziato e sia disponibile per la consultazione, gli antigeni fino ad oggi impiegati nei test immunologici per la diagnosi di infezione tubercolare derivano da studi della caratterizzazione biochimica del micobatterio durante la sua fase di crescita in mezzo di coltura *in vitro*, e non da studi *ex vivo*.

La domanda di brevetto US2006/0115847 concerne un metodo diagnostico immunologico della infezione da *M. tuberculosis* basato sulla combinazione di epitopi da proteine codificate da regioni del genoma di *M. tuberculosis* che non sono presenti nel vaccino BCG o nei più comuni micobatteri non tubercolari. La parte sperimentale della domanda di brevetto riporta i risultati relativi a diverse proteine testate, tuttavia la distribuzione della risposta dei pazienti ai singoli peptidi è piuttosto disomogenea, infatti, osservando la figura 1 si nota che diversi pazienti TB non rispondono ai peptidi. Per quanto riguarda la frequenza di risposta dei pazienti ai peptidi selezionati, nella tabella 6 si osserva che il peptide migliore CFP10 testato singolarmente induce una risposta in 10 pazienti su 15, quindi una frequenza di risposta di circa 66,66%. Inoltre, mediante la combinazione di alcuni peptidi, come mostrato nella tabella 7, la sensibilità raggiunta è 92% nella TB latente, ossia nei pazienti PPD+, 88% nella TB attiva, 90% nei pazienti TB in corso di trattamento antibiotico.

Nel corso di precedenti lavori, gli autori della presente invenzione hanno identificato un gruppo di geni preferenzialmente trascritti da MTB in corso di infezione di macrofagi umani e aventi la caratteristica

- 9 -

di appartenere a regioni di delezione della specie vaccinale *M.bovis*-BCG (WO 2005/021790).

Gli autori della presente invenzione hanno ora analizzato le proteine espresse da MTB in corso di infezione, sia in macrofagi umani da colture primarie *in vitro*, sia *ex vivo*, in campioni di lavaggio bronco alveolare (BAL) di pazienti con TB polmonare attiva. Mediante l'impiego di un software sviluppato dagli autori che permette l'analisi delle capacità di legame delle molecole di istocompatibilità di classe II per i peptidi dell'intero genoma di MTB, sono state selezionate alcune proteine che si sono dimostrate sorprendentemente efficaci dal punto di vista immunologico. Brevemente, lo studio ha confrontato l'espressione genica di *M.tuberculosis* in tre diversi ambienti di crescita: il terreno sintetico (Sauton's), il macrofago umano monocito derivato (MDM), infettato in coltura con *M.tuberculosis*, e il macrofago alveolare (AM) da campioni di Bronco Lavaggio (BAL) di pazienti con TB polmonare prima della terapia antibiotica.

Ne sono risultati così 9 gruppi di geni, dai quali sono state selezionate le prime 100 proteine in base ad una combinazione di criteri (immunogenicità, specificità per il Complesso tubercolare, etc). Da questo gruppo di 100 proteine, ne sono state ulteriormente selezionate un gruppo di 30, per le quali è stata ottenuta una risposta positiva in test immunologici su sangue intero di pazienti con TB (vedere tabella 1).

Dopo una ulteriore selezione sono stati inizialmente disegnati, sintetizzati e testati 43 peptidi su 4 gruppi di soggetti: TB polmonare prima della terapia antibiotica (n=13), Contatti sani esposti di recente (familiari di pazienti TB)PPD+

- 10 -

(n=8); Contatti sani esposti da lungo periodo a pazienti TB (esposizione professionale di operatori ospedalieri) PPD+ (n=5); controlli negativi, BCG vaccinati, PPD- (n=4).

I migliori 6 peptidi in termini di sensibilità e specificità sono stati quindi selezionati (vedere tabella 2), e lo studio è stato ripetuto su un campione allargato di soggetti (vedere tabelle 2-4 e figure 1-7).

I risultati ottenuti con i sei peptidi sono stati confrontati con quelli ottenuti con un peptide appartenenti alla proteina ESAT6, proteina di elevata immunogenicità presente in entrambi i test commerciali citati.

In sommario, tutti i peptidi selezionati hanno dimostrato reattività T-cellulare. In particolare, il peptide #3 presenta una elevata sensibilità comparabile, se non più elevata di quella del peptide multiepitopico di controllo derivato dalla proteina ESAT-6. E' interessante notare che, valutati in pannello (cioè valutando ex-post la somma dei dati di ogni singolo peptide), i 6 peptidi multiepitopici sono riconosciuti da circa il 75% dei soggetti con TB attiva (un risultato paragonabile, in questa serie, al Quantiferon TB gold in tube). Il dato è risultato perfettamente sovrapponibile ai risultati ottenuti in un sottogruppo di pazienti in cui i 6 peptidi sono stati testati contemporaneamente nello stesso pozzetto.

Alla ottima sensibilità diagnostica i peptidi associano anche un ottima specificità. Infatti, la risposta dei peptidi è confinata ai soggetti con TB attiva, ai contatti di recente esposizione ed al personale sanitario esposto. Interessante notare che, sebbene il dato debba essere consolidato su una

- 11 -

popolazione più ampia, nessuno dei soggetti di controllo vaccinati con il vaccino antitubercolare *M.bovis* BCG singolarmente risponde ai peptidi, neppure i tre soggetti che risultano positivi al test quantiferon TB Gold in tube.

Inoltre, i peptidi permettono di migliorare la sensibilità del test commerciale, l'attuale gold standard di riferimento per la diagnosi di infezione tubercolare (figura 9). Sia quando valutati in pannello che direttamente testati nello stesso pozzetto, i 6 peptidi selezionati permettono di aumentare la risposta del Quantiferon TB gold in tube dal 75% al 89% (+14%) e dal 71% al 83% (+13%), rispettivamente, in soggetti con TB attiva.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione l'uso di un biomarcatore scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico;

in un saggio *in vitro* per la rilevazione della

- 12 -

infezione da *Mycobacterium* in un soggetto.

Tra le specie di *Mycobacterium* possono essere impiegate quelle scelte tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum subsp. acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*,

- 13 -

*M. canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotonense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

Preferibilmente, la presente invenzione si riferisce alla specie *Mycobacterium tuberculosis*.

Il soggetto sopra menzionato può essere un soggetto è umano oppure un animale non umano.

Secondo una particolare forma di realizzazione, il peptide come definito in (iii) comprende una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPE (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22). Questi peptidi possono essere impiegati da soli o in associazione tra loro o tutti insieme.

L'uso sopra menzionato può comprendere ulteriormente l'uso di una proteina di un *Mycobacterium* o di un suo frammento peptidico o un loro analogo chimico scelti tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e PPD.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso di un biomarcatore scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990,

- 14 -

Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; e

(iv) una proteina derivata da *Mycobacterium* o un suo frammento o un suo analogo chimico scelto nella lista consistente in:

- (a) ESAT;
- (b) CFP10;
- (c) TB7.7; e
- (d) PPD;

in un saggio *in vitro* per la rilevazione dell'infezione da *Mycobacterium* in un soggetto.

Le specie di *Mycobacterium* possono essere scelte tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M.*

- 15 -

celatum, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*,  
*M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M.*  
*lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M.*  
*chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*,  
*M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M.*  
*marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*,  
*M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*,  
*M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*,  
*M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*,  
*M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. boenickei*,  
*M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M.*  
*septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M.*  
*mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M.*  
*cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M.*  
*diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M.*  
*frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M.*  
*fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M.*  
*madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*,  
*M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M.*  
*komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M.*  
*aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M.*  
*canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M.*  
*duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M.*  
*holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M.*  
*moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M.*  
*vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M.*  
*aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M.*  
*fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotonense*, *M.*  
*novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M.*  
*poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

Preferibilmente, la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*.

Il soggetto menzionato sopra può essere un soggetto è umano oppure un animale non umano.



Secondo una forma particolare di realizzazione, il peptide come definito in (iii) comprende una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPE (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22). Questi peptidi possono essere impiegati da soli o in associazione tra loro o tutti insieme.

La presente invenzione concerne inoltre l'uso di un acido nucleico che codifica per un biomarcatore scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo di cellule T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico;

in un saggio *in vitro* per la rilevazione della infezione da *Mycobacterium* in un soggetto.

Le specie di *Mycobacterium* possono essere scelte tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M.*

- 17 -

*pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum subsp. acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M. canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M.*

- 18 -

*vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotonense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

Preferibilmente la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*.

Il soggetto sopra menzionato può essere un soggetto è umano oppure un animale non umano.

Secondo una particolare forma di realizzazione il peptide in (iii) comprende una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPE (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22). Questi peptidi possono essere impiegati da soli o in associazione tra loro o tutti insieme.

L'uso sopra menzionato può comprendere ulteriormente l'uso di un acido nucleico che codifica per una proteina di *Mycobacterium* o un frammento peptidico da essa derivato scelti tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e PPD o un loro omologo.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione una proteina isolata scelta nella lista che consiste in Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* e comprendente un epitopo riconosciuto da linfociti T. Inoltre, l'invenzione concerne un peptide isolato della proteina come definita sopra o

- 19 -

un suo analogo chimico comprendente un epitopo riconosciuto da linfociti T. Il peptide isolato può comprendere una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPEs (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22). Questi peptidi possono essere impiegati da soli o in associazione tra loro o tutti insieme.

La presente invenzione concerne inoltre una molecola di acido nucleico che codifica per una proteina come definita sopra o per un peptide come definito sopra.

Inoltre, l'invenzione concerne un vettore comprendente la molecola di acido nucleico come definito sopra e una cellula isolata comprendente il vettore.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un kit comprendente un contenitore, detto contenitore comprendendo una proteina o un peptide o un acido nucleico come definiti sopra.

Secondo una forma di realizzazione, la presente invenzione concerne un metodo per la diagnosi *in vitro* della infezione da una specie di *Mycobacterium* in un soggetto, detto metodo comprendendo l'incubazione di un campione di sangue comprendente linfociti di detto soggetto in presenza di un biomarcatore scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una

- 20 -

specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico;

per un periodo di tempo e sotto condizioni sufficienti per stimolare i linfociti a produrre una molecola effettrice, in cui la presenza o il livello della molecola effettrice è indicativa dei linfociti derivati da un soggetto infettato o precedentemente esposto alla specie *Mycobacterium*. L'incubazione tra sangue e biomarcatore può avvenire in una provetta. Inoltre, l'incubazione può avvenire in presenza ulteriormente di eparina e/o di un carboidrato aggiunto e/o di una proteina di *Mycobacterium* o un suo frammento peptidico o analogo chimico da essa derivato scelti tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e PPD.

Le specie di *Mycobacterium* possono essere scelte tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M.*

- 21 -

celatum, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*,  
*M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M.*  
*lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M.*  
*chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*,  
*M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M.*  
*marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*,  
*M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*,  
*M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*,  
*M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*,  
*M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. boenickei*,  
*M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M.*  
*septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M.*  
*mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M.*  
*cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M.*  
*diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M.*  
*frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M.*  
*fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M.*  
*madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*,  
*M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M.*  
*komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M.*  
*aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M.*  
*canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M.*  
*duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M.*  
*holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M.*  
*moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M.*  
*vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M.*  
*aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M.*  
*fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotonense*, *M.*  
*novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M.*  
*poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

Preferibilmente, la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*. Il soggetto sopra menzionato può essere un soggetto umano o un animale non umano.

- 22 -

Secondo una forma di realizzazione il peptide come definito in (iii) comprende una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPEs (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22). Questi peptidi possono essere impiegati da soli o in associazione tra loro o tutti insieme.

La molecola effettrice può essere scelta tra interferone- $\gamma$ , una citochina, una interleuchina e TNF $\alpha$ , preferibilmente interferone- $\gamma$ .

La presente invenzione concerne inoltre un anticorpo isolato specifico per la proteina o il peptide come definiti sopra.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un metodo per la diagnosi in vitro dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* in un soggetto, detto metodo comprendendo l'incubazione di un campione di sangue comprendente linfociti del soggetto con uno o più tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e/o PPD e misurazione del rilascio di interferone- $\gamma$  da parte dei linfociti, detto metodo essendo caratterizzato dal fatto che l'incubazione è condotta in presenza ulteriormente di un biomarcatore scelto tra:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo

- 23 -

riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; in cui il livello di sensibilità e/o selettività per la rilevazione di *Mycobacterium tuberculosis* è maggiore rispetto alla sensibilità e/o selettività ottenuta mediante l'uso di uno o più tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e/o PPD da soli.

La presente invenzione concerne inoltre un vaccino per il trattamento o la profilassi dell'infezione da specie di *Mycobacterium*, detto vaccino comprendendo un agente scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico;



e uno o più coadiuvanti, veicoli, eccipienti e/o diluenti.

La specie di *Mycobacterium* può essere scelta tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum subsp. acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M.*

- 25 -

*aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M. canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotonense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

Preferibilmente, la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*.

Il soggetto sopra menzionato può essere un soggetto è umano oppure un animale non umano.

Il peptide come definito in (iii) può comprendere una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPEs (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22). Questi peptidi possono essere impiegati da soli o in associazione tra loro o tutti insieme.

La presente invenzione concerne inoltre l'uso del vaccine come definitio sopra nella preparazione di un medicamento per la prevenzione dell'infezione da specie *Mycobacterium*.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso di un agente scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c,

- 26 -

Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; nella preparazione di un medicamento per il trattamento o la prevenzione dell'infezione da specie di *Mycobacterium*.

Secondo una particolare forma di realizzazione, la presente invenzione concerne un metodo per determinare in vitro la capacità di un soggetto di scatenare una risposta immunitaria cellulo mediata, detto metodo comprendendo mettere in contatto un campione comprendente i linfociti T resi sensibili nei confronti della specie di *Mycobacterium* o antigeni o proteine comprendenti epitopi di linfociti T da essi derivati con un agente scelto tra:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno

- 27 -

l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico;

per un periodo di tempo e sotto condizioni sufficienti per stimolare i linfociti a produrre una molecola effettrice, in cui la presenza o il livello della molecola effettrice è indicativa della capacità del soggetto di scatenare una risposta immunitaria cellulo mediata. La molecola effettrice può essere scelta tra interferone- $\gamma$ , una citochina, una interleuchina e TNF $\alpha$ , preferibilmente interferone- $\gamma$ .

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

**Figura 1.** Analisi della produzione di IFN-gamma in risposta al PPD confrontando quattro popolazioni di soggetti: a. pazienti con TB polmonare di primo accertamento; b. contatti sani, esposti alla TB, PPD positivi; c. controlli sani, esposti professionalmente alla TB, Quantiferon positivi; d. controlli negativi, Quantiferon negativi, vaccinati con BCG.

**Figura 2.** Analisi della produzione di IFN-gamma in risposta al peptide TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO 24) dei 4 gruppi di individui esaminati.

**Figura 3.** Analisi della produzione di IFN-gamma in risposta al peptide ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO 21) dei 4 gruppi di individui esaminati.

**Figura 4.** Analisi della produzione di IFN-gamma in risposta al peptide RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO 70) dei 4 gruppi di individui esaminati.

**Figura 5.** Analisi della produzione di IFN-gamma in

- 28 -

risposta al peptide SALLRRLSTCPPEs (SEQ ID NO 71) dei 4 gruppi di individui esaminati.

**Figura 6.** Analisi della produzione di IFN-gamma in risposta al peptide GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO 13) dei campioni esaminati.

**Figura 7.** Analisi della produzione di IFN-gamma in risposta al peptide AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO 22) dei campioni esaminati

**Figura 8.** Analisi della produzione di IFN-gamma in risposta ad ESAT6 (QQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSL - SEQ ID NO:84)dei campioni esaminati.

**Figura 9.** Frequenza dei test risultati positivi con i soli 6 peptidi SEQ ID NO:24,21,70,71,13,22.

**Figura 10.** Aumento della sensibilità del test commerciale in uso Quantiferon TB-plus dopo aggiunta nel test dei peptidi SEQ ID NO:24,21,70,71,13,22.

**Figura 11.** Utilizzo combinato dei peptidi 1-6, che consentono di raggiungere una sensibilità del 90% su individui TB+, del 76,6% su contatti esposti PPD+, e del 63,6 % su HCWs, in confronto ad una sensibilità, rispettivamente, del 55%, 33% e 45,5% ottenuta con un peptide multiepitopico dell'RD1 (ESAT6).

**Figura 12.** Percentuale di individui positivi per la produzione di IFN-gamma su sangue intero, indicata per ogni singolo peptide.

**Esempio 1:** *Identificazione di proteine espresse da M. tuberculosis in macrofagi umani infettati in campioni biologici analizzati in vitro ed ex vivo*

MATERIALI E METODI)

*Test immunodiagnostico in ELISPOT*

L'intera procedura di esecuzione del test richiede: piastra da 96 pozzetti (MAIPS45, Millipore, Sunnyvale, CA, USA); anticorpo primario (IFN-gamma coating monoclonal, M-700A, Pierce-Endogen Inc,

- 29 -

Rockford, IL, USA); anticorpo biotinilato (M-701B, Pierce-Endogen Inc); streptavidina-HRP (Pierce-Endogen); substrato (AEC Staining kit, Sigma); stimoli (peptidi, PHA ed altri antigeni) alla concentrazione pronta per l'uso.

La metodica ELISPOT è suddivisa nelle seguenti fasi:

*Coating:* trattamento della piastra da 96 pozzetti con l'anticorpo primario diluito in tampone fosfato (PBS) sterile alla concentrazione di 5 µg/mL, dispensando 100 µL/pozzetto; copertura della piastra e incubare a 4°C per 20 ore; lavaggio della piastra 4 volte con 200 µL/pozzetto di PBS sterile, all'ultimo lavaggio eliminare l'eccesso di liquido picchiettando la piastra su carta assorbente

*Blocking:* aggiunta 200 µL/pozzetto di "blocking solution" [PBS sterile contenente il 10% di siero bovino fetale (FCS)], per prevenire la formazione di legami proteici non specifici; incubazione della piastra per 2 ore a temperatura ambiente; aspirazione della "blocking solution"

*Preparazione e incubazione delle cellule*

1. isolamento delle cellule mononucleate (PBMC) da sangue venoso (7 ml con EDTA) tramite centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque, Pharmacia; Uppsala; Swedewn), utilizzando un metodo rapido basato sull'impiego di tubi con filtro per la separazione dei leucociti (LeucoSep<sup>TM</sup>, ARNIKA, Milano). Dopo due lavaggi con PBS (phosphate buffered saline) 1x, il pellet viene risospeso in terreno completo (RPMI 1640 con HEPES 25 mM, 10% v/v FCS, 2 mM L-Glutammina, 10 U/mL penicillina/streptomicina) per ottenere una concentrazione cellulare di  $2 \times 10^5$  cellule in 100 µL.

2. aggiungere nei pozzetti 100 µL di sospensione

- 30 -

cellulare insieme con 100 µL dei vari stimoli;

3. incubare la piastra per 40 ore a 37°C in incubatore al 5% CO<sub>2</sub>;

4. rimuovere le cellule;

5. lavare la piastra 4 volte con 200 µL/pozzetto di PBS e 4 volte con 200 µL/pozzetto di "Wash buffer" [PBS/0,05% Tween 20 (Sigma)];

6. all'ultimo lavaggio eliminare l'eccesso di liquido picchiettando la piastra su carta assorbente.

#### *Incubazione con l'anticorpo biotinilato*

Sono stati dispensati 100 µl/pozzetto di anticorpo biotinilato diluito in PBS/4% albumina serica bovina (fraction V, Sigma) alla concentrazione di 1 µg/ml. Successivamente la piastra è stata incubata per 100 minuti a 37°C in incubatore al 5% CO<sub>2</sub>; la piastra è stata lavata 4 volte con "Wash buffer". All'ultimo lavaggio l'eccesso di liquido è stato eliminato picchiettando la piastra su carta assorbente.

#### *Rivelazione*

Per la rivelazione sono stati impiegati 100 µl/pozzetto di "Streptavidina-HRP" diluita 1: 1000 in "Wash buffer". La piastra è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente al buio, poi è stata lavata 4 volte con "Wash buffer". All'ultimo lavaggio l'eccesso di liquido è stato eliminato picchiettando la piastra su carta assorbente. Sono stati dispensati 100 µL/pozzetto di substrato. Viene effettuato parallelamente un controllo sul funzionamento della reazione enzima-substrato incubando per pochi minuti 100 µl di substrato appena preparato con 100 µl di "Streptavidina-HRP" diluita. Se la reazione funziona il substrato dal colore marrone chiaro diviene rosa.

Infine, la piastra è stata incubata per 10-20 minuti a temperatura ambiente al buio. Il substrato

- 31 -

viene scartato, la piastra viene lavata con acqua, e l'eccesso di liquido viene eliminato e asciugato all'aria per 20 ore.

Test ELISA per l'identificazione di IFN-gamma umano e animale in campioni di sangue intero stimolati con peptidi e proteine selezionate (protocollo del test CMI).

#### RISULTATI

Gli autori hanno identificato il gruppo di proteine espresse da *M.tuberculosis* in macrofagi umani infettati in campioni biologici analizzati *in vitro* ed *ex vivo*. Lo studio ha confrontato l'espressione genica di *M.tuberculosis* in tre diversi ambienti di crescita: il terreno sintetico (Sauton's), il macrofago umano monocito derivato (MDM), infettato in coltura con *M.tuberculosis*, e il macrofago alveolare (AM) da campioni di Bronco Lavaggio (BAL) di pazienti con TB polmonare prima della terapia antibiotica.

Ne sono risultati così 9 gruppi di geni, dai quali sono state selezionate le prime 100 proteine in base ad una combinazione di criteri (immunogenicità, specificità per il Complesso tubercolare, etc). Da questo gruppo di 100 proteine, ne sono state ulteriormente selezionate un gruppo di 30, per le quali è stata ottenuta una risposta positiva in test immunologici su sangue intero di pazienti con TB (vedere lista riportata in tabella 1).

Tabella 1

| Rv      | Modulaz.<br>in vivo | ID Sequenza<br>Aminoacidica<br>(UNIPROT) | Peptidi già testati                                                          |
|---------|---------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Rv0023  | B                   | <u>P67704</u>                            | EMWDIRNRGVIPAGALPRVR (SEQ ID NO:1)                                           |
| Rv0182c | A                   | <u>O07426</u>                            | AKFRSVRVVVITGVSVAAPVRVSETLRRLI (SEQ ID NO:2),<br>ESVRLAFVAALQH (SEQ ID NO:3) |



- 32 -

|                |   |               |                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------|---|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rv0290         | D | <u>O86362</u> | GLLITIRSPRSGIA (SEQ ID NO:4),<br>AQLLWQLPLLSIG (SEQ ID NO:5)                                                                                                                                                                                                    |
| Rv0601c        | A | <u>O07777</u> | ADLVRELVTILPIVLVIAAVAAYLLSR<br>(SEQ ID NO:6)<br>AAAYLLSRAALRPVDRIRAAA (SEQ ID NO:7)<br>TTLNTMLTRLQRALAHEQQF (SEQ ID NO:8)<br>DLFVSIDPDHLRRILTAVLDN (SEQ ID NO:9)<br>SGLGLAIVAALTTHGG (SEQ ID NO:10)                                                             |
| Rv0647c        | B | <u>P96936</u> | GRLPRKGPWQQKVIKELPQ (SEQ ID NO:11),<br>GKIVVLMGAVGTMKPETQAA (SEQ ID NO:12)                                                                                                                                                                                      |
| <b>Rv0724A</b> | A | <u>Q79FX1</u> | GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13)                                                                                                                                                                                                                                   |
| Rv0890c        | A | <u>Q10550</u> | ARVRSMSPLEIAD (SEQ ID NO:14),<br>EQILFRRLAPFVGGF (SEQ ID NO:15),<br>AALVRALTACGCSS (SEQ ID NO:16),<br>DKWTLCQILYWRGVGTCISGD (SEQ ID NO:17),<br>TKVLGLYTQAQVLAYCG (SEQ ID NO:18),<br>DQVTMHQVLMAQLALAGG (SEQ ID NO:19),<br>EGVRLLGAAAALRQQTRQVRFK (SEQ ID NO:20) |
| <b>Rv1251c</b> | C | <u>O50466</u> | ELMARA AVLGSAH (SEQ ID NO:21),<br>AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22)                                                                                                                                                                                                  |
| Rv1398c        | D | <u>P64835</u> | GTLRHLDPPVRRSGGREQHL (SEQ ID NO:23)                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Rv1478</b>  | A | <u>O53169</u> | TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24)                                                                                                                                                                                                                                    |
| Rv1497         | B | <u>P71778</u> | APMVFSATKGMTA (SEQ ID NO:25),<br>TCAMRRLAHRFSGG (SEQ ID NO:26)                                                                                                                                                                                                  |
| Rv1575         | B | <u>O06615</u> | SVVRRKQTLLSAQ (SEQ ID NO:27)                                                                                                                                                                                                                                    |
| Rv1578c        | B | <u>O06612</u> | GVVHRNPAVTVAE (SEQ ID NO:28)                                                                                                                                                                                                                                    |
| Rv1899c        | D | <u>O07733</u> | PGVVATHAVRTLGTGSRAIGL (SEQ ID NO:29),<br>PQWRRARVRLCGRWWRRSNTTRGAS (SEQ ID NO:30),<br>ARLMVGAVRRHRPGSLQR (SEQ ID NO:31)                                                                                                                                         |
| Rv2137c        | D | <u>O06238</u> | aaMRNMKSTSHE (SEQ ID NO:32)                                                                                                                                                                                                                                     |
| Rv2333c        | A | <u>P71879</u> | QTIVMLWTA AVGCA (SEQ ID NO:33),<br>LCMLMLGLLMLIFSEHRSS (SEQ ID NO:34),<br>SALVLVGLGLCGSGVALCLT (SEQ ID NO:35)                                                                                                                                                   |
| Rv2548         | A | <u>P95005</u> | SELVRFELLAGVRESE (SEQ ID NO:36),<br>VDYLIAATAIVVDA (SEQ ID NO:37)                                                                                                                                                                                               |
| Rv2557         | A | <u>P65003</u> | QGIEYYKSSVLPQIE (SEQ ID NO:38),<br>EGWIVYARSTTIQAQS (SEQ ID NO:39),<br>TRRMYSNYGF (SEQ ID NO:40)                                                                                                                                                                |
| Rv2816c        | A | <u>P71637</u> | FGYRVQESAFEAMLT KGQLAKLV (SEQ ID                                                                                                                                                                                                                                |

- 33 -

|               |   |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------|---|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |   |                               | NO:41),<br>DNIRIYKIRGVAAVTFYGRGRLVSAE (SEQ ID NO:42)                                                                                                                                                                                                                                         |
| Rv2990        | A | <u><a href="#">Q53239</a></u> | RSYLIRAGISSLFRYIEGVHGER (SEQ ID NO:43),<br>SAMRPQDRLLVGNWVDDSL (SEQ ID NO:44),<br>LYLVGLEPYVQFE (SEQ ID NO:45),<br>AGFRILEARRFPI (SEQ ID NO:46),<br>IRYRARYVNGQLNMCLARI (SEQ ID NO:47)                                                                                                       |
| Rv3094c       | A | <u><a href="#">Q05773</a></u> | ALLVAYLPARSREEMF (SEQ ID NO:48),<br>NRLRLAATHAVRT (SEQ ID NO:49),<br>APLQRRFRDAFTATAHFQVNE (SEQ ID NO:50),<br>SRELPGRVLLDQPADVSM (SEQ ID NO:51)                                                                                                                                              |
| Rv3107c       | A | <u><a href="#">Q05784</a></u> | EPVVTVDVTAMSAVLEID (SEQ ID NO:52)                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Rv3188        | B | <u><a href="#">Q53334</a></u> | AVIQVSDRAVRGWRTGDIRPERY (SEQ ID NO:53)                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Rv3239c       | C | <u><a href="#">Q05884</a></u> | PDLRGALLLAVTLGLVT (SEQ ID NO:54),<br>PDWGWLSVATVGSFLA (SEQ ID NO:55)<br>GAVLGVAVMVILIGKPEHGTA (SEQ ID NO:56),<br>AAICFIAVAVAAAVL (SEQ ID NO:57),<br>TKLVRLTKAQFDEIA (SEQ ID NO:58),<br>ADLVLAGPAASREH (SEQ ID NO:59),<br>YAYEYFIRHNPLSDYA (SEQ ID NO:60),<br>FPVRGLVRGRRTLLEA (SEQ ID NO:61) |
| Rv3296        | A | <u><a href="#">P96901</a></u> | EVLRLRRRSLAALRA (SEQ ID NO:62),<br>RVILHSPYGLRVHGPLAL (SEQ ID NO:63)                                                                                                                                                                                                                         |
| Rv3425        | B | <u><a href="#">Q50703</a></u> | AAWVINGLANAYNDT (SEQ ID NO:64),<br>DQYRARNVAVMNAYVSWTRSALSDLPR (SEQ ID NO:65),<br>SDLLADAVERYLQWLSKSSSQLKHA (SEQ ID NO:66)                                                                                                                                                                   |
| Rv3446c       | A | <u><a href="#">Q06263</a></u> | GPVVVHPSWWSAA (SEQ ID NO:67),<br>ITAVVLIDVPSTVAGA (SEQ ID NO:68),<br>AAVVRHGATTLP (SEQ ID NO:69)                                                                                                                                                                                             |
| <b>Rv3479</b> | C | <u><a href="#">Q06342</a></u> | RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70),<br>SALLRRLSTCPES (SEQ ID NO:71)                                                                                                                                                                                                                           |
| Rv3482c       | A | <u><a href="#">Q06345</a></u> | GAVLRLVVRFAEPLPPSP (SEQ ID NO:72),<br>AGYLLTYTIANNNGKEFAEL (SEQ ID NO:73)                                                                                                                                                                                                                    |
| Rv3780        | D | <u><a href="#">P65091</a></u> | aaVRKRMVIGLSTGSDDD (SEQ ID NO:74)                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Cons FS       |   |                               | ALLLRDVLQWKSAEVADAIG (SEQ ID NO:75)                                                                                                                                                                                                                                                          |
|               |   |                               | NSLLQRARSQQTVPSPAADRLSAA (SEQ ID NO:76)                                                                                                                                                                                                                                                      |

- 34 -

|                 |  |  |                                            |
|-----------------|--|--|--------------------------------------------|
| Cons<br>PE_PGRS |  |  | MSWVMVSPELVVAAAADLAG (SEQ ID NO:77)        |
|                 |  |  | AAFYAQFVQALTSGGAY (SEQ ID NO:78)           |
| Cons REG        |  |  | ALLVRMPTSLPAVA (SEQ ID NO:79)              |
| Cons CW         |  |  | SRLRTHVRPDAPLVPLALRVDGLRSRW (SEQ ID NO:80) |
|                 |  |  | AAVLTMLGVAGYGW (SEQ ID NO:81)              |
|                 |  |  | GLFMIFLDALIVNVALPDIQR (SEQ ID NO:82)       |
|                 |  |  | SWVVASYSLGMAVFIMSAGTLADLL (SEQ ID NO:83)   |

- A: up-regolato in AM vs MDM;  
 B: espresso in AM e MDM;  
 C: up-regolato in MDM vs AM;  
 D: up-regolato in Sauton vs in vivo;  
 E: variabile

Dopo una ulteriore selezione sono stati inizialmente disegnati, sintetizzati e testati 43 peptidi su 4 gruppi di soggetti: TB polmonare prima della terapia antibiotica (n=13); Contatti sani esposti di recente (familiari di pazienti TB)PPD+ (n=8); Contatti sani esposti da lungo periodo a pazienti TB (esposizione professionale di operatori ospedalieri)PPD+ (n=5); controlli negativi, BCG vaccinati, PPD- (n=4).

I migliori 6 peptidi in termini di sensibilità e specificità sono stati quindi selezionati (tabella 2), e lo studio è stato ripetuto su un campione allargato di soggetti (vedere tabelle 3-5 e figure 1-7).

La Tabella 2 riporta i geni di MTB selezionati, i peptidi scelti per il saggio su cellule T CD4+, ed il loro corrispondente numero identificativo.

- 35 -  
Tabella 2

| N°           | Peptide            | Gene                      | Modulazione in vivo  |
|--------------|--------------------|---------------------------|----------------------|
| SEQ ID NO:24 | TAWITAVVPGLMV      | Consensus<br>VIR (Rv1478) | Indotto in AM vs MDM |
| SEQ ID NO:21 | ELMARAAVLGSAH      | Rv1251c                   | Indotto in MDM vs AM |
| SEQ ID NO:70 | RPVRRVLLFVVPSSGPAP | Rv3479                    | Indotto in MDM vs AM |
| SEQ ID NO:71 | SALLRRLSTCPPEs     | Rv3479                    | Indotto in MDM vs AM |
| SEQ ID NO:13 | GEIIFISGRNLNGaa    | Rv0724A                   | Indotto in AM vs MDM |
| SEQ ID NO:22 | AVIVRSELLTQYL      | Rv1251c                   | Indotto in MDM vs AM |

Tabella 3

|                                                                                       | <b>Pazienti TB confermati microbiologicamente (prima dell'inizio della terapia)</b> | <b>Soggetti esposti di recente ad MTB</b> | <b>Operatori sanitari</b> | <b>Controlli BCG-vaccinati</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| N soggetti esaminati                                                                  | 58                                                                                  | 63                                        | 21                        | 15                             |
| Soggetti anergici (bassa risposta al mitogeno o risposta assente a tutti gli stimoli) | 3/58                                                                                | 2/63                                      | 0/21                      | 0/15                           |
| Quantiferon TB-Gold in tube                                                           | 41/55                                                                               | 25/61                                     | 11/21                     | 3/15                           |
| PPD                                                                                   | 55/55                                                                               | 61/61                                     | 21/21                     | 15/15                          |
| ESAT-6 peptide di controllo                                                           | 28/55                                                                               | 17/61                                     | 7/21                      | 0/15                           |
| Peptide #1                                                                            | 12/55                                                                               | 14/61                                     | 6/21                      | 0/15                           |
| Peptide #2                                                                            | 11/55                                                                               | 8/61                                      | 1/21                      | 0/15                           |
| Peptide #3                                                                            | 27/55                                                                               | 20/61                                     | 7/21                      | 0/15                           |
| Peptide #4                                                                            | 10/55                                                                               | 13/61                                     | 6/21                      | 0/15                           |
| Peptide #5                                                                            | 18/55                                                                               | 11/61                                     | 5/21                      | 0/15                           |
| Peptide #6                                                                            | 14/55                                                                               | 6/61                                      | 3/21                      | 0/15                           |

- 36 -

Tabella 4

|                                                                                       | <b>Pazienti TB confermati microbiologicamente (prima dell'inizio della terapia)</b> | <b>Soggetti esposti di recente ad MTB</b> | <b>Operatori sanitari</b> | <b>Controlli BCG-vaccinati</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| N soggetti esaminati                                                                  | 58                                                                                  | 63                                        | 21                        | 15                             |
| Soggetti anergici (bassa risposta al mitogeno o risposta assente a tutti gli stimoli) | 3/58                                                                                | 2/63                                      | 0/21                      | 0/15                           |
| Quantiferon TB-Gold in tube                                                           | 41/55                                                                               | 25/61                                     | 11/21                     | 3/15                           |
| Peptidi 1-6 in pannello                                                               | 40/55                                                                               | 30/61                                     | 11/21                     | 0/15                           |
| QFT Gold+peptidi 1-6 in pannello                                                      | 49/55                                                                               | 34/61                                     | 13/21                     | 3/15                           |

Tabella 5

|                                            | <b>Pazienti TB confermati microbiologicamente (prima dell'inizio della terapia)</b> | <b>Soggetti esposti di recente ad MTB</b> | <b>Operatori sanitari</b> | <b>Controlli BCG-vaccinati</b> |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| N soggetti esaminati                       | 38                                                                                  | 32                                        | 10                        | 10                             |
| Anergici                                   | 3                                                                                   | 1                                         | 0                         | 0                              |
| Peptidi 1-6 (in pool)                      | 22/35                                                                               | 10/31                                     | 4/10                      | 1/10                           |
| QFT Gold                                   | 25/35                                                                               | 11/31                                     | 4/10                      | 2/10                           |
| QFT Gold+peptidi 1-6 nello stesso pozzetto | 29/35                                                                               | 13/31                                     | 5/10                      | 2/10                           |

I risultati ottenuti con i sei peptidi sono stati

- 37 -

confrontati con quelli ottenuti con un peptide appartenente alla proteina ESAT6, proteina di elevata immunogenicità presente in entrambi i test commerciali citati.

I geni di MTB che sono stati osservati come indotti, o repressi, sia in corso di infezione di macrofagi umani sia in campioni di macrofagi alveolari di pazienti con TB polmonare attiva, sono indicati nella seguente lista:

Geni indotti in corso di replicazione intra-cellulare in MDM vs AM: Rv0724A, Rv1478.

Geni repressi in AM vs MDM (o anche indotti in MDM vs AM): Rv1251c, Rv3479.

Ciò che accomuna i due gruppi di geni di MTB è il loro probabile ruolo nella sopravvivenza all'interno della cellula ospite umana (sia macrofagi primari di donatori sani infettati *in vitro*, che macrofagi alveolari di pazienti TB), designandoli come biomarcatori di sopravvivenza intra-cellulare di MTB, laddove la definizione di virulenza di MTB è basata proprio sulla capacità del patogeno di invadere, sopravvivere e replicare all'interno della cellula ospite.

Inoltre, gli autori della presente hanno disegnato dei peptidi su alcuni gruppi di geni appartenenti alla stessa categoria metabolica, per trovare delle sequenze proteiche "consenso" per le categorie stesse. Il presupposto su cui è stata basata la ricerca è che, per proteine con funzione simile presenti nelle varie specie batteriche, i domini funzionali sono conservati. Per trovare tali motivi conservati viene generato l'allineamento multiplo di sequenza (PSSM), tramite PSI-BLAST (Position Specific Iterated Basic Local Alignment Search Tool,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Individuate le sequenze con maggior grado di similarità con la sequenza inserita è possibile selezionare le proteine che contribuiranno alla creazione del profilo utilizzato nella ricerca successiva nella banca dati; in questo modo il numero delle sequenze che contribuiscono alla creazione del profilo è diverso nelle diverse posizioni della sequenza.

Un multi-allineamento ci permette di individuare residui importanti dal punto di vista strutturale e funzionale perché estremamente conservati, e il loro insieme costituirà la, o le sequenze "consenso" per ogni gruppo funzionale di proteine di MTB.

Per i gruppi metabolici funzionali (ad esempio le proteine regolatorie, le proteine deputate al metabolismo dei lipidi, etc.) che si sono rivelati "modulati" da *M.tuberculosis* in corso di infezione, sono state quindi analizzate le proteine (indotte o represses nel macrofago umano) per la ricerca di sequenze conservate. Tramite PSI-BLAST sono stati ottenuti diversi allineamenti multipli di sequenza, dai quali abbiamo ricavato le migliori sequenze "consensus" per la sintesi di peptidi.

I peptidi derivati dalle proteine prescelte sono stati sintetizzati ed impiegati per il rilevamento e la quantificazione dei linfociti T CD4+ specifici per MTB tramite sistema di rilevamento delle cellule che producono IFN- $\gamma$  sia con la tecnica dell'ELISPOT sia con un test ELISA ad alta sensibilità in uso per la diagnosi di TB, Quantiferon TB-Plus e Quantiferon CMI. Questa tecnica permette di calcolare la frequenza delle cellule T che producono una determinata citochina (per esempio IFN- $\gamma$ ) in risposta ad uno specifico stimolo antigenico suggerendo che il sistema immunitario dei

- 39 -

soggetti testati è stato in grado di evocare una risposta immune verso questi peptidi quando ha incontrato l'agente infettivo (MTB) che li codifica. La seconda tecnica permette di quantificare la produzione di IFN-gamma totale prodotto dai linfociti T specifici in risposta agli antigeni selezionati.

Sebbene questo test non rappresenti la prova della loro capacità di indurre protezione dalla infezione da MTB, l'aver rilevato la presenza di linfociti che riconoscono questi peptidi specificamente e in maniera diversa in soggetti infetti da MTB o con tubercolosi attiva è indice della loro immunogenicità, caratteristica minima indispensabile affinché un vaccino e un test diagnostico possano rilevarsi efficaci. Inoltre tali peptidi, da soli o in aggiunta ad altri antigeni micobatterici, permettono di mettere a punto un test sensibile e specifico per la diagnosi di TB, e di migliorare la sensibilità del test commerciale, l'attuale gold standard di riferimento per la diagnosi tubercolare (figura 9). Sia quando valutati in pannello che direttamente testati nello stesso pozzetto, i 6 peptidi selezionati permettono di aumentare la risposta del Quantiferon TB gold in tube dal 75% al 89% (+14%) e dal 71% al 83% (+13%), rispettivamente, in soggetti con TB attiva.



## BIBLIOGRAFIA

1. EW Koneman, SD Allen, WM Janda, P. Schreckenberger, WC Winn. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5<sup>a</sup> edizione. Lippincot, 1997
2. Menzies D, Pai M, Comstock G. Ann Intern Med. 2007 Mar 6;146(5):340-54. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research
3. Bellete B, Coberly J, Barnes GL, Ko C, Chaisson RE, Comstock GW, Bishai WR. Clin Infect Dis. 2002 34 :1449-56.
4. Pai M, Gokhale K, Joshi R, Dogra S, Kalantri S, Mendiratta DK, Narang P, Daley CL, Granich RM, Mazurek GH, Reingold AL, Riley LW, Colford JM Jr. JAMA. 2005 293 :2746-55.
5. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. Lancet. 2001; 357: 2017-21.
6. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 1997 Sep 5;46(RR-15):1-10.
7. Ulrichs T, Munk ME, Mollenkopf H, et al. Eur J Immunol 1998; 28:3949-3958.
8. Ravn P, Demissie A, Eguale T, et al. J Infect Dis 1999; 179:637-645.
9. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al. J Clin Microbiol 2002; 40:704-706.
10. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, et al. Lancet 2001; 357:2017-2021.
11. Lalvani A, Nagvenkar P, Udwadia Z, et al. J Infect Dis 2001; 183:469-477.
12. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, et al.

- 41 -

AIDS 2002; 16:2285-2293.

13. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:824-828.

14. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, et al. J Immunol 2001; 167:5217-5225.

15. LinksLawn SD, Bangani N, Vogt M, Bekker LG, Badri M, Ntobongwana M, Dockrell HM, Wilkinson RJ, Wood R. Utility of interferon-gamma ELISPOT assay responses in highly tuberculosis-exposed patients with advanced HIV infection in South Africa. BMC Infect Dis. 2007 Aug 28;7:99

16. De Groot AS, Bosma A, Chinai N, Frost J, Jesdale BM, Gonzalez MA, Martin W, Saint-Aubin C. Vaccine 2001, 19:4385-4395.

17. Brander C, Goulder PJR. Edited by Korber BTM, Brander C, Haynes B, Koup RA, Kuiken C, Moore J, Walker B, Watkins D. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.Mex. 2000; I1-I3.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

## RIVENDICAZIONI

1. Uso di un biomarcatore scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico;

in un saggio *in vitro* per la rilevazione della infezione da *Mycobacterium* in un soggetto.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui la specie di *Mycobacterium* è scelta tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M.*

- 43 -

*haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M. canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotonense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

3. Uso secondo la rivendicazione 2 in cui la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*.

4. Uso secondo la rivendicazione 1 o 2 o 3 in cui

- 44 -

il soggetto è umano.

5. Uso secondo la rivendicazione 1 o 2 o 3 in cui il soggetto è un animale non umano.

6. Uso secondo la rivendicazione 3 in cui il peptide come definito in (iii) comprende una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPE (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22).

7. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-6 comprendente ulteriormente l'uso di una proteina di un *Mycobacterium* o di un suo frammento peptidico o un loro analogo chimico scelti tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e PPD.

8. Uso di un biomarcatore scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

- 45 -

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; e

(iv) una proteina derivata da *Mycobacterium* o un suo frammento o un suo analogo chimico scelto nella lista consistente in:

- (a) ESAT;
- (b) CFP10;
- (c) TB7.7; e
- (d) PPD;

in un saggio *in vitro* per la rilevazione dell'infezione da *Mycobacterium* in un soggetto.

9. Uso secondo la rivendicazione 8 in cui la specie di *Mycobacterium* è scelta tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoides*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M.*

- 46 -

*intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*,  
*M. fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*,  
*M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M.*  
*senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M.*  
*houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M.*  
*brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M.*  
*austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M.*  
*neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*,  
*M. chitae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*,  
*M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M.*  
*goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M.*  
*gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M.*  
*agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*,  
*M. canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M.*  
*duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M.*  
*holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M.*  
*moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M.*  
*vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M.*  
*aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M.*  
*fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotonense*, *M.*  
*novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M.*  
*poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

10. Uso secondo la rivendicazione 9 in cui la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*.

11. Uso secondo la rivendicazione 9 in cui il soggetto è umano.

12. Uso secondo la rivendicazione 9 in il soggetto è un animale non umano.

13. Uso secondo la rivendicazione 8 in cui il peptide come definito in (iii) comprende una sequenza

- 47 -

amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPEs (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22).

14. Uso di un acido nucleico che codifica per un biomarcatore scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo di cellule T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico;

in un saggio *in vitro* per la rilevazione della infezione da *Mycobacterium* in un soggetto.

15. Uso secondo la rivendicazione 14 in cui la specie di *Mycobacterium* è scelta tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M.*



- 48 -

*nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoides*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M. canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotoense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M.*

- 49 -

*poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

16. Uso secondo la rivendicazione 15 in cui la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*.

17. Uso secondo la rivendicazione 15 in cui il soggetto è umano.

18. Uso secondo la rivendicazione 15 in cui il soggetto è un animale non umano.

19. Uso secondo la rivendicazione 14 in cui il peptide in (iii) comprende una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPES (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22).

20. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni da 14 a 19 che comprende ulteriormente l'uso di un acido nucleico che codifica per una proteina di *Mycobacterium* o un frammento peptidico da essa derivato scelti tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e PPD o un loro omologo.

21. Una proteina isolata scelta nella lista che consiste in Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* e comprendente un epitopo riconosciuto

da linfociti T.

22. Un peptide isolato della proteina secondo rivendicazione 21 o un suo analogo chimico comprendente un epitopo riconosciuto da linfociti T.

23. Peptide isolato secondo la rivendicazione 22 comprendente una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPEs (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22).

24. Molecola di acido nucleico che codifica per una proteina secondo la rivendicazione 21 o peptide secondo la rivendicazione 22 o 23.

25. Vettore comprendente la molecola di acido nucleico secondo la rivendicazione 24.

26. Cellula isolata comprendente il vettore secondo la rivendicazione 25.

27. Kit comprendente un contenitore, detto contenitore comprendendo una proteina secondo la rivendicazione 21 o un peptide secondo la rivendicazione 22 o 23 o un acido nucleico secondo la rivendicazione 24.

28. Metodo per la diagnosi *in vitro* della infezione da una specie di *Mycobacterium* in un soggetto, detto metodo comprendendo l'incubazione di un campione di sangue comprendente linfociti di detto soggetto in presenza di un biomarcatore scelto nella lista

- 51 -

consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; per un periodo di tempo e sotto condizioni sufficienti per stimolare i linfociti a produrre una molecola effettrice, in cui la presenza o il livello della molecola effettrice è indicativa dei linfociti derivati da un soggetto infettato o precedentemente esposto alla specie *Mycobacterium*.

29. Metodo secondo la rivendicazione 28 in cui l'incubazione tra sangue e biomarcatore avviene in una provetta.

30. Metodo secondo la rivendicazione 28 o 29 in cui l'incubazione avviene in presenza ulteriormente di eparina.

31. Metodo secondo la rivendicazione 28 o 29 o 30 in cui l'incubazione avviene in presenza ulteriormente

- 52 -

di un carboidrato aggiunto.

32. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 28 a 31 in cui l'incubazione avviene ulteriormente in presenza di una proteina di *Mycobacterium* o un suo frammento peptidico o analogo chimico da essa derivato scelti tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e PPD.

33. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 28 a 32 in cui la specie di *Mycobacterium* è scelta tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum subsp. acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M.*

- 53 -

*cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M. canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenivorans*, *M. kumamotonense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

34. Metodo secondo la rivendicazione 33 in la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*.

35. Metodo secondo la rivendicazione 33 in cui il soggetto è umano.

36. Metodo secondo la rivendicazione 33 in cui il soggetto è un animale non umano.

37. Metodo secondo la rivendicazione 28 in cui il peptide come definito in (iii) comprende una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPE (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22).

38. Metodo secondo la rivendicazione 28 in cui la molecola effettrice è scelta tra interferone- $\gamma$ , una citochina, una interleuchina e TNF $\alpha$ .

39. Metodo secondo a rivendicazione 38 in cui la molecola effettrice è interferone- $\gamma$ .

40. Anticorpo isolato specifico per la proteina secondo la rivendicazione 21 o il peptide secondo la rivendicazione 22 o 23.

41. Metodo per la diagnosi in vitro dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* in un soggetto, detto metodo comprendendo l'incubazione di un campione di sangue comprendente linfociti del soggetto con uno o più tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e/o PPD e misurazione del rilascio di interferone- $\gamma$  da parte dei linfociti, detto metodo essendo caratterizzato dal fatto che l'incubazione è condotta in presenza ulteriormente di un biomarcatore scelto tra:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

- 55 -

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; in cui il livello di sensibilità e/o selettività per la rilevazione di *Mycobacterium tuberculosis* è maggiore rispetto alla sensibilità e/o selettività ottenuta mediante l'uso di uno o più tra ESAT6, CFP10, TB7.7 e/o PPD da soli.

42. Vaccino per il trattamento o la profilassi dell'infezione da specie di *Mycobacterium*, detto vaccino comprendendo un agente scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; e uno o più coadiuvanti, veicoli, eccipienti e/o diluenti.

43. Vaccino secondo la rivendicazione 42 in cui la specie di *Mycobacterium* è scelta tra *M. tuberculosis*,



- 56 -

*M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. chitae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M. canariasense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M.*

- 57 -

*moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenvivorans*, *M. kumamotonense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* e *M. tokaiense*.

44. Vaccino secondo la rivendicazione 43 in cui la specie di *Mycobacterium* è *Mycobacterium tuberculosis*.

45. Vaccino secondo la rivendicazione 44 in cui il soggetto è umano.

46. Vaccino secondo la rivendicazione 43 in cui il soggetto è un animale non umano.

47. Vaccino secondo la rivendicazione 43 in cui il peptide come definito in (iii) comprende una sequenza amminoacidica scelta tra TAWITAVVPGLMV (SEQ ID NO:24), ELMARAAVLGSAH (SEQ ID NO:21), RPVRRVLLFVVPSSGPAP (SEQ ID NO:70), SALLRRLSTCPPEs (SEQ ID NO:71), GEIIFISGRLNGaa (SEQ ID NO:13), AVIVRSELLTQYL (SEQ ID NO:22).

48. Uso del vaccine secondo ognuna delle rivendicazioni da 42 a 47 nella preparazione di un medicamento per la prevenzione dell'infezione da specie *Mycobacterium*.

49. Uso di un agente scelto nella lista consistente in:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c,

- 58 -

Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; nella preparazione di un medicamento per il trattamento o la prevenzione dell'infezione da specie di *Mycobacterium*.

50. Metodo per determinare in vitro la capacità di un soggetto di scatenare una risposta immunitaria cellulo mediata, detto metodo comprendendo mettere in contatto un campione comprendente i linfociti T resi sensibili nei confronti della specie di *Mycobacterium* o antigeni o proteine comprendenti epitopi di linfociti T da essi derivati con un agente scelto tra:

(i) una proteina scelta tra Rv0023, Rv0182c, Rv0290, Rv0601c, Rv0647c, Rv0724A, Rv0890c, Rv1251c, Rv1398c, Rv1478, Rv1497, Rv1575, Rv1578c, Rv1899c, Rv2137c, Rv2333c, Rv2548, Rv2557, Rv2816c, Rv2990, Rv3094c, Rv3107c, Rv3188, Rv3239c, Rv3296, Rv3425, Rv3446c, Rv3479, Rv3482c, Rv3780, derivata da una specie di *Mycobacterium* o da un organismo ad esso correlato e comprendente almeno un epitopo riconosciuto da linfociti T;

- 59 -

(ii) un omologo della proteina come definita in (i) avente una sequenza amminoacidica con almeno l'80% di similarità rispetto a una di detta proteina dopo allineamento ottimale; e

(iii) un frammento peptidico della proteina come definita in (i) o (ii) avente un epitopo riconosciuto da linfociti T o un suo analogo chimico; per un periodo di tempo e sotto condizioni sufficienti per stimolare i linfociti a produrre una molecola effettrice, in cui la presenza o il livello della molecola effettrice è indicativa della capacità del soggetto di scatenare una risposta immunitaria cellulo mediata.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

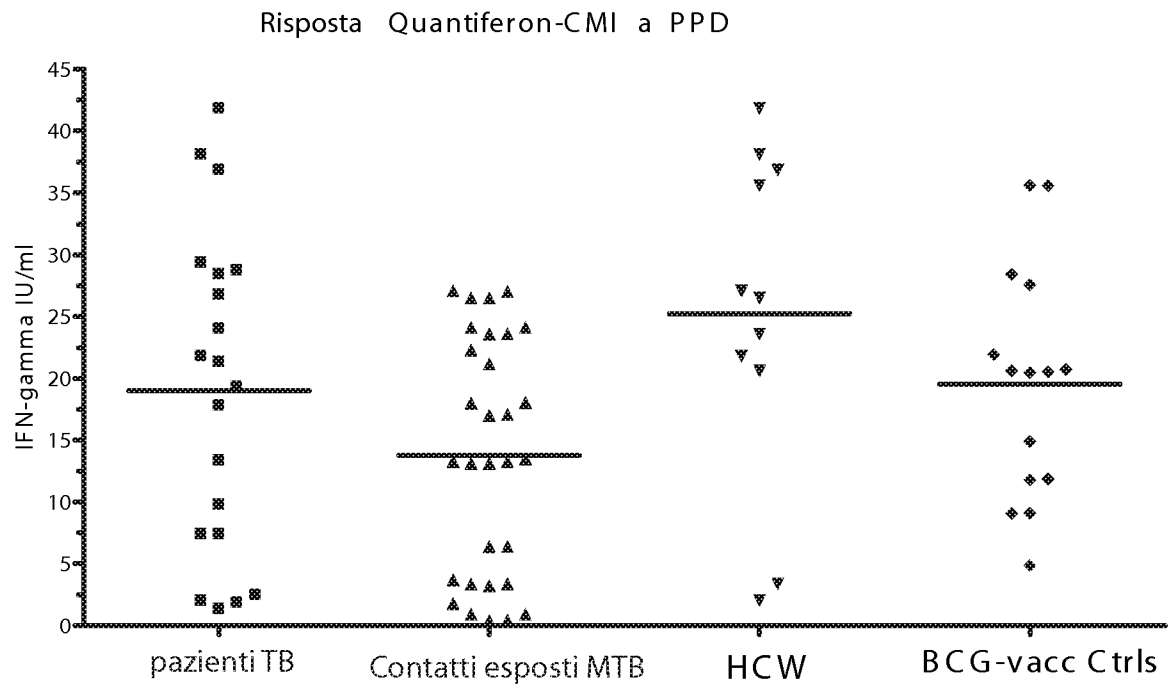


Fig. 1

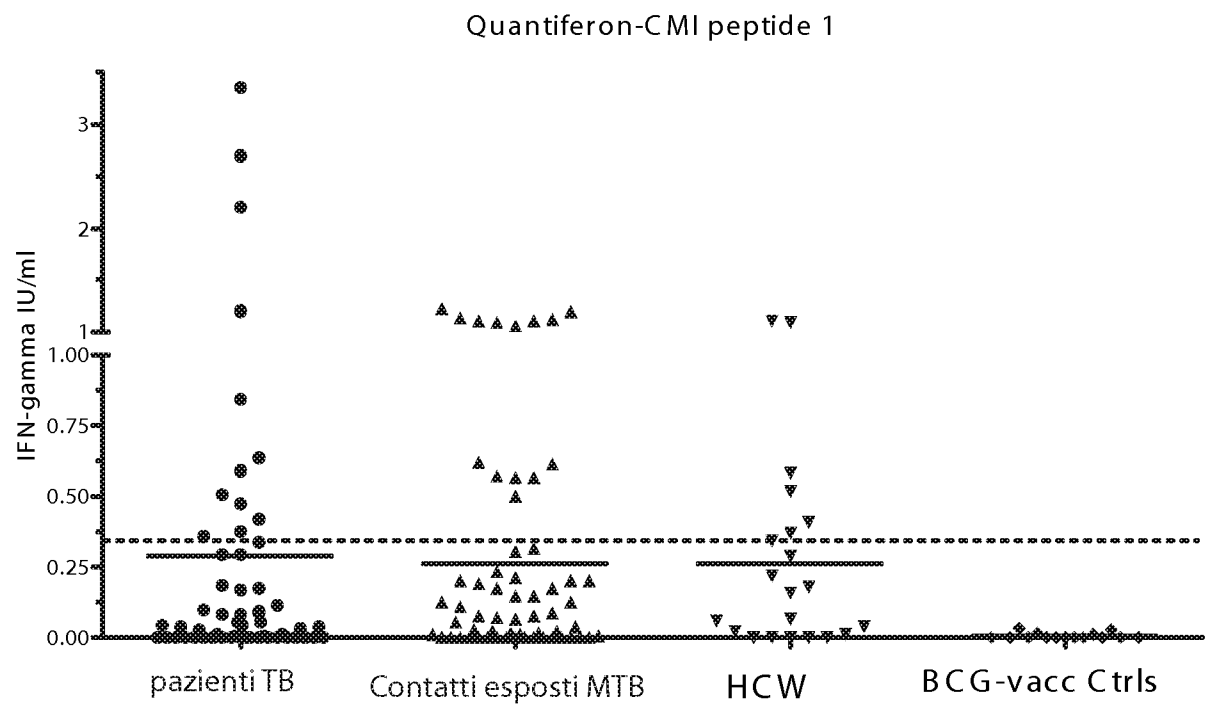


Fig. 2

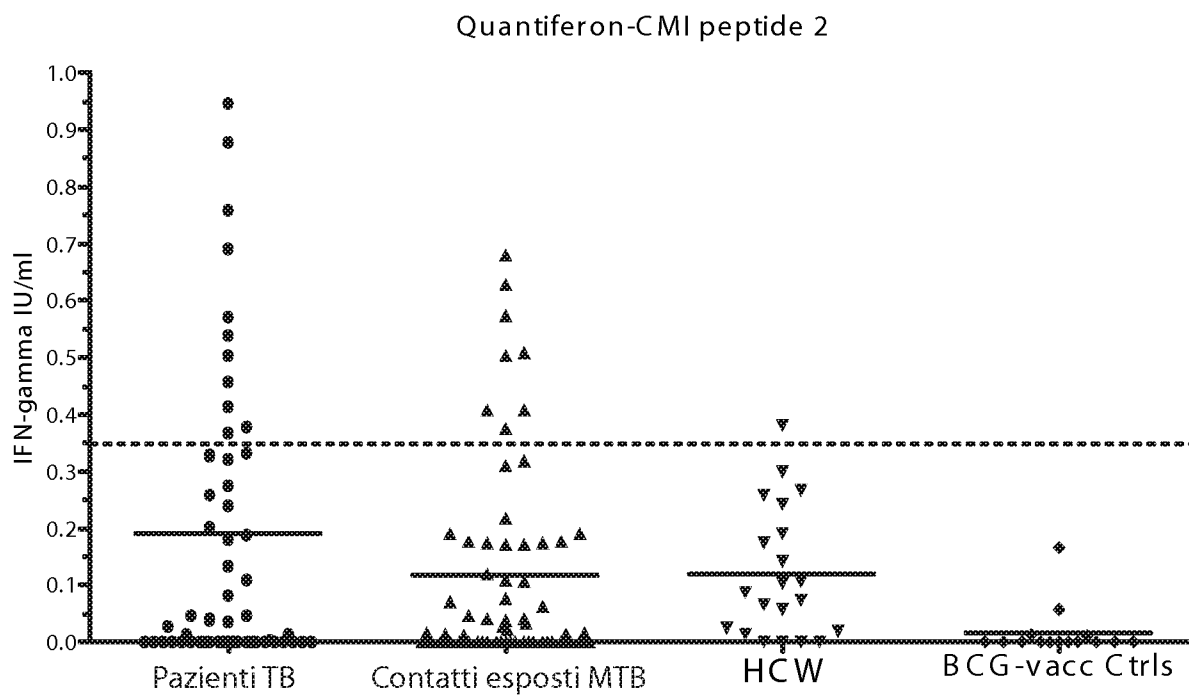


Fig. 3

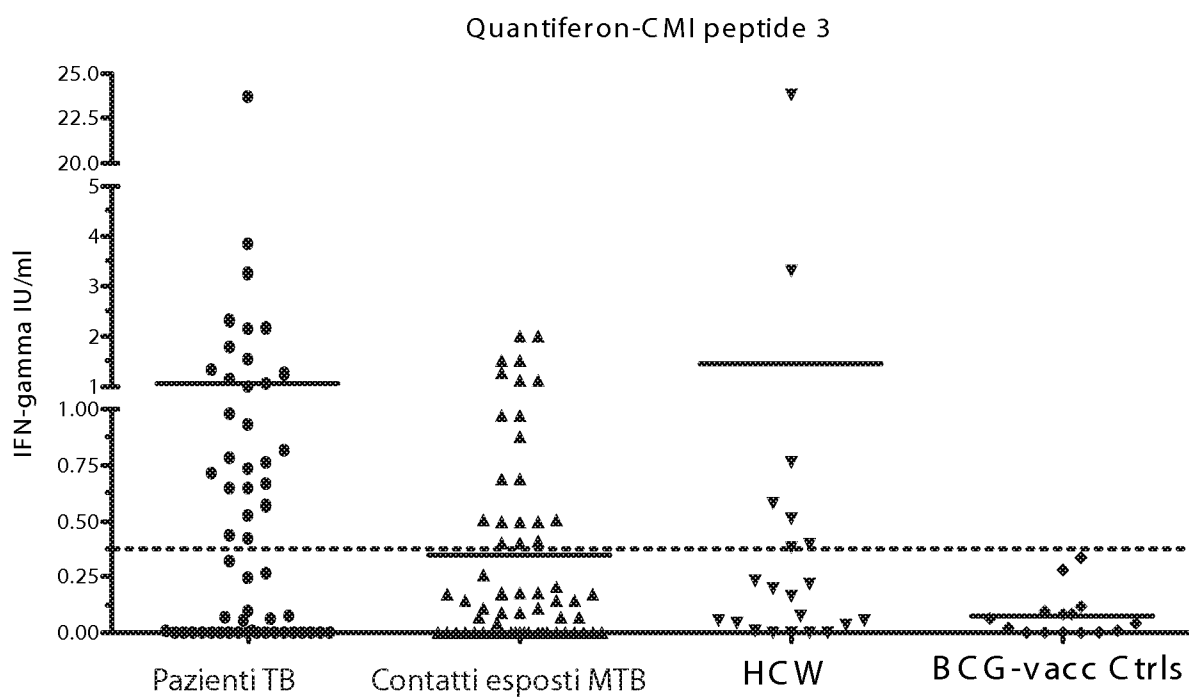


Fig. 4

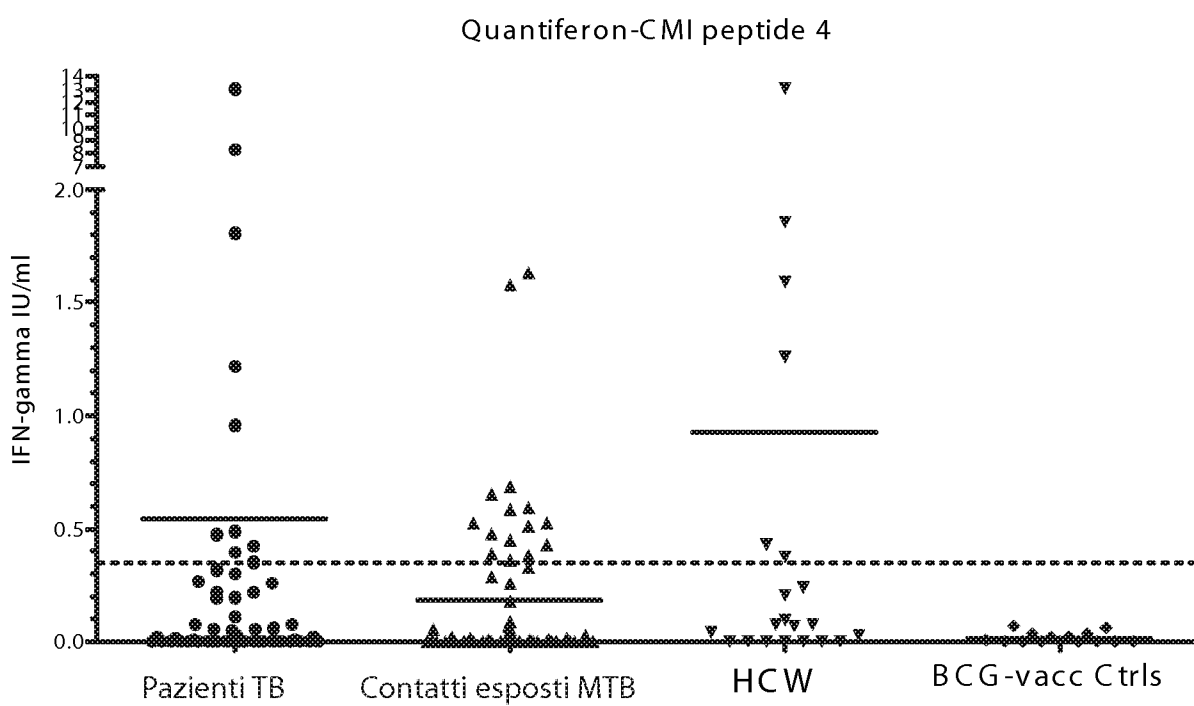


Fig. 5

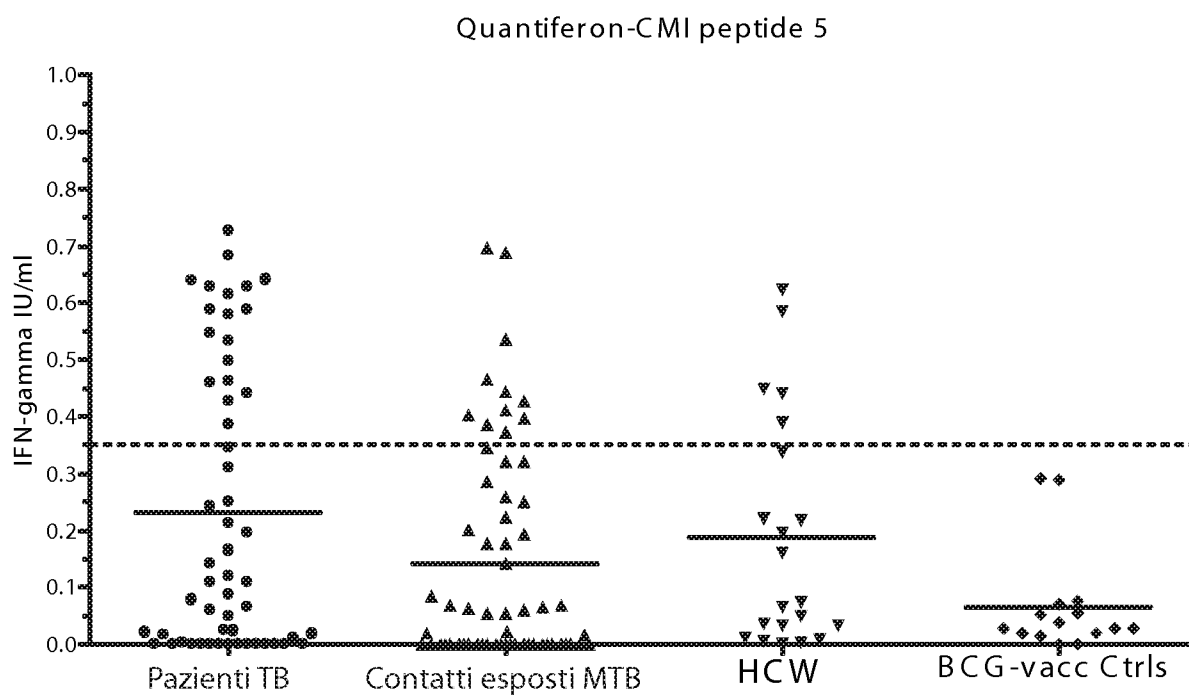


Fig. 6

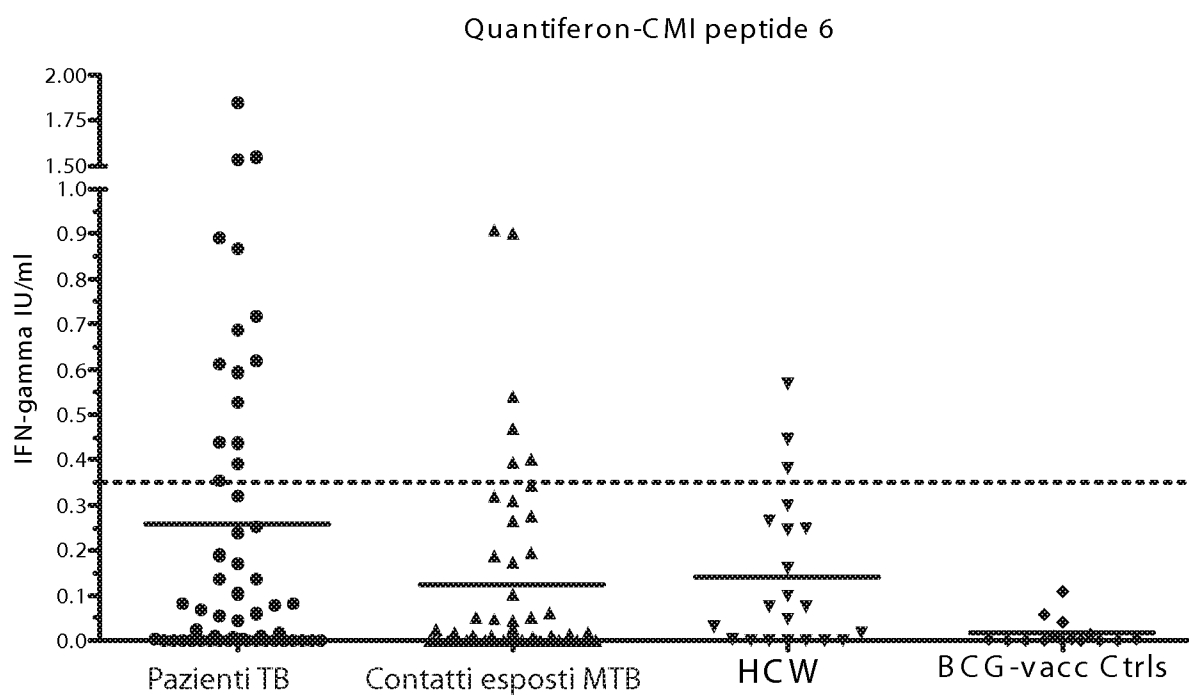


Fig. 7



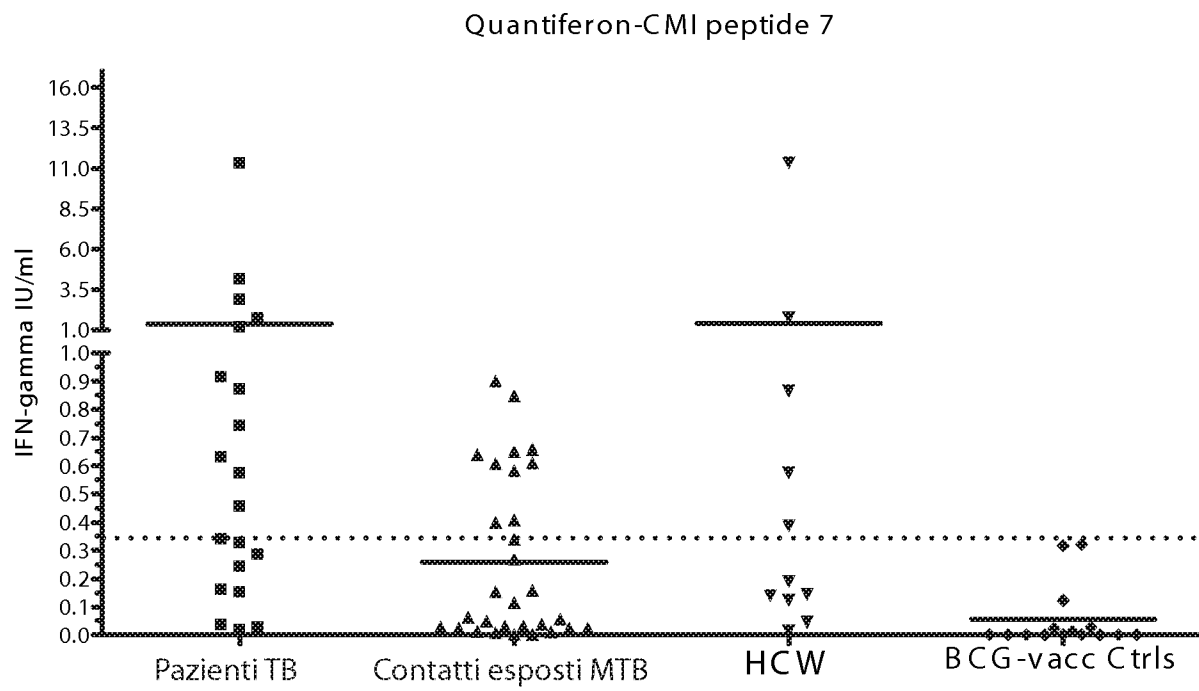


Fig. 8

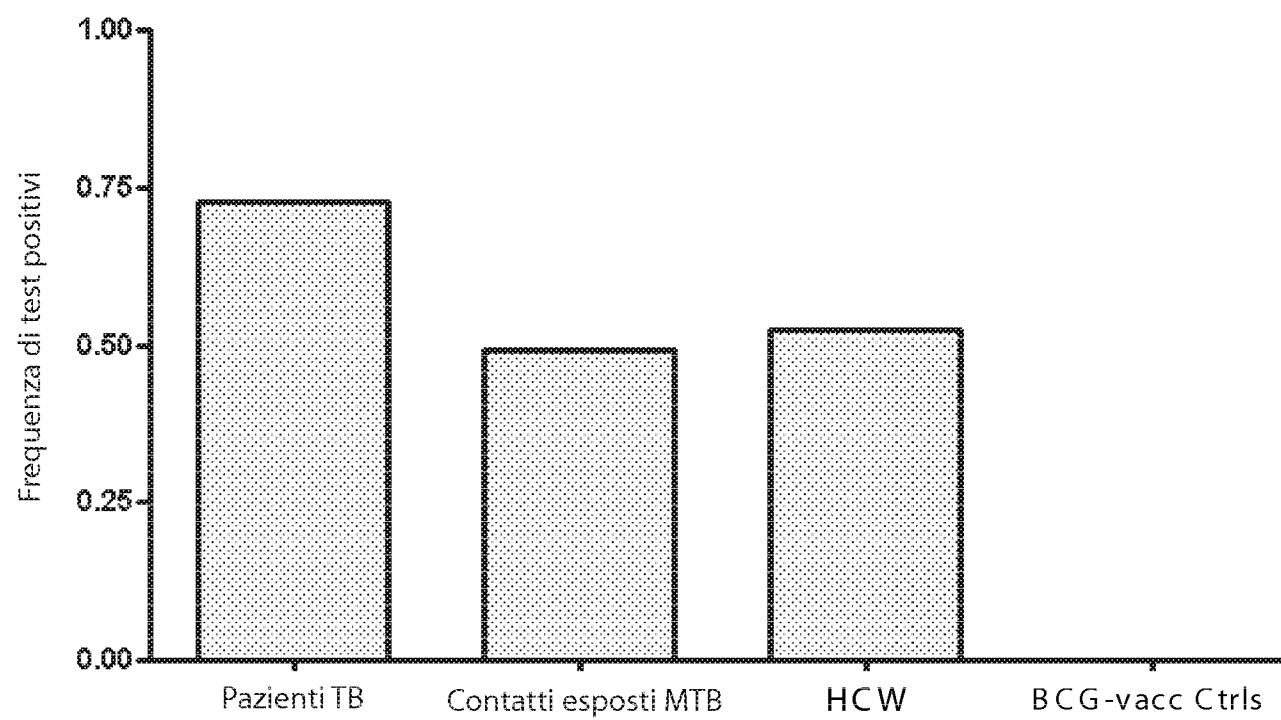


Fig. 9

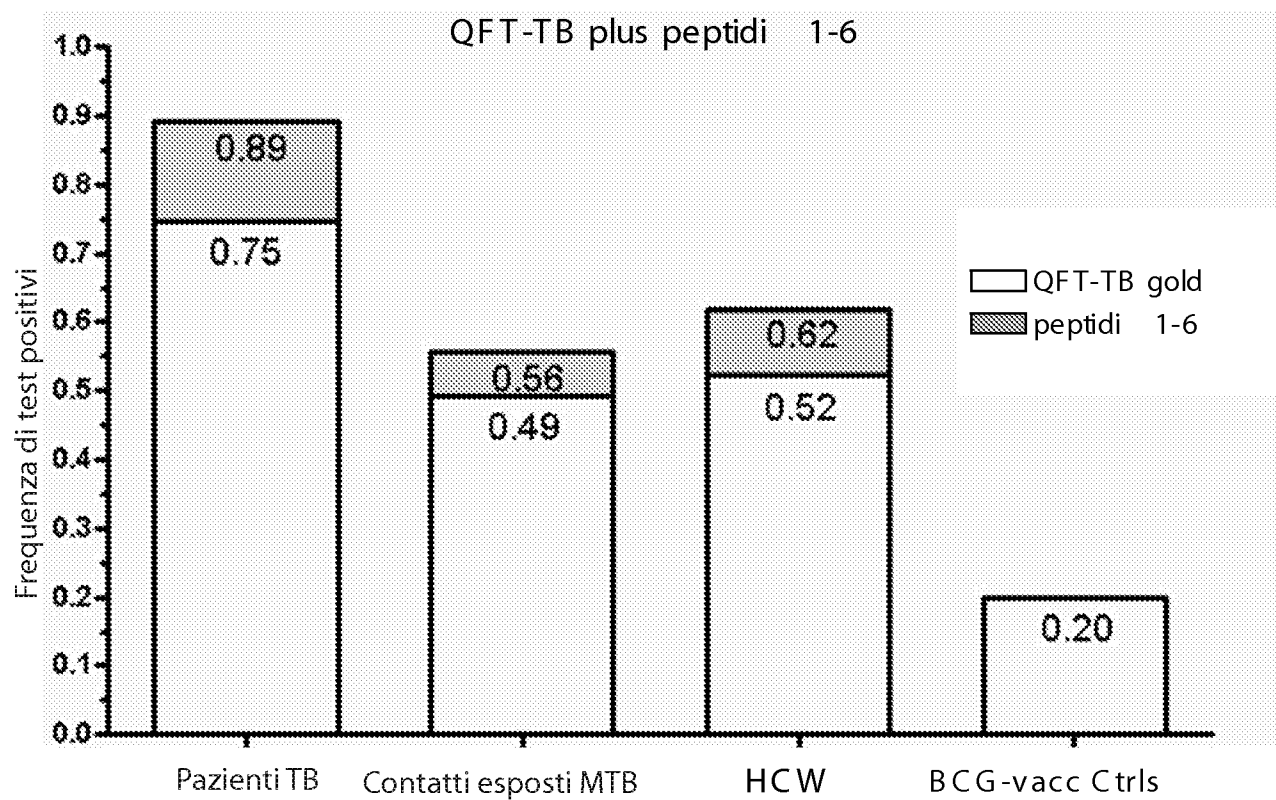


Fig. 10

| pazienti TB      |    |    |    |    |    |    | TB esposti     |    |    |    |    |    |    | HCWs             |    |    |    |    |    |    |
|------------------|----|----|----|----|----|----|----------------|----|----|----|----|----|----|------------------|----|----|----|----|----|----|
|                  | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |                | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |                  | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| TB1              |    |    |    |    |    |    | Exp1           |    |    |    |    |    |    | HCW1             |    |    |    |    |    |    |
| TB2              |    |    |    |    |    |    | Exp2           |    |    |    |    |    |    | HCW2             |    |    |    |    |    |    |
| TB3              |    |    |    |    |    |    | Exp3           |    |    |    |    |    |    | HCW3             |    |    |    |    |    |    |
| TB4              |    |    |    |    |    |    | Exp4           |    |    |    |    |    |    | HCW4             |    |    |    |    |    |    |
| TB5              |    |    |    |    |    |    | Exp5           |    |    |    |    |    |    | HCW5             |    |    |    |    |    |    |
| TB6              |    |    |    |    |    |    | Exp6           |    |    |    |    |    |    | HCW6             |    |    |    |    |    |    |
| TB7              |    |    |    |    |    |    | Exp7           |    |    |    |    |    |    | HCW7             |    |    |    |    |    |    |
| TB8              |    |    |    |    |    |    | Exp8           |    |    |    |    |    |    | HCW8             |    |    |    |    |    |    |
| TB9              |    |    |    |    |    |    | Exp9           |    |    |    |    |    |    | HCW9             |    |    |    |    |    |    |
| TB10             |    |    |    |    |    |    | Exp10          |    |    |    |    |    |    | HCW10            |    |    |    |    |    |    |
| TB11             |    |    |    |    |    |    | Exp11          |    |    |    |    |    |    | HCW11            |    |    |    |    |    |    |
| TB12             |    |    |    |    |    |    | Exp12          |    |    |    |    |    |    | HCW12            |    |    |    |    |    |    |
| TB13             |    |    |    |    |    |    | Exp13          |    |    |    |    |    |    | HCW13            |    |    |    |    |    |    |
| TB14             |    |    |    |    |    |    | Exp14          |    |    |    |    |    |    | HCW14            |    |    |    |    |    |    |
| TB15             |    |    |    |    |    |    | Exp15          |    |    |    |    |    |    | HCW15            |    |    |    |    |    |    |
| TB16             |    |    |    |    |    |    | Exp16          |    |    |    |    |    |    | HCW16            |    |    |    |    |    |    |
| TB17             |    |    |    |    |    |    | Exp17          |    |    |    |    |    |    | HCW17            |    |    |    |    |    |    |
| TB18             |    |    |    |    |    |    | Exp18          |    |    |    |    |    |    | HCW18            |    |    |    |    |    |    |
| TB19             |    |    |    |    |    |    | Exp19          |    |    |    |    |    |    | HCW19            |    |    |    |    |    |    |
| TB20             |    |    |    |    |    |    | Exp20          |    |    |    |    |    |    | HCW20            |    |    |    |    |    |    |
| TB21             |    |    |    |    |    |    | Exp21          |    |    |    |    |    |    | HCW21            |    |    |    |    |    |    |
| TB22             |    |    |    |    |    |    | Exp22          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB23             |    |    |    |    |    |    | Exp23          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB24             |    |    |    |    |    |    | Exp24          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB25             |    |    |    |    |    |    | Exp25          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB26             |    |    |    |    |    |    | Exp26          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB27             |    |    |    |    |    |    | Exp27          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB28             |    |    |    |    |    |    | Exp28          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB29             |    |    |    |    |    |    | Exp29          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB30             |    |    |    |    |    |    | Exp30          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB31             |    |    |    |    |    |    | Exp31          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB32             |    |    |    |    |    |    | Exp32          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB33             |    |    |    |    |    |    | Exp33          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB34             |    |    |    |    |    |    | Exp34          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB35             |    |    |    |    |    |    | Exp35          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB36             |    |    |    |    |    |    | Exp36          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB37             |    |    |    |    |    |    | Exp37          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB38             |    |    |    |    |    |    | Exp38          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB39             |    |    |    |    |    |    | Exp39          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB40             |    |    |    |    |    |    | Exp40          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB41             |    |    |    |    |    |    | Exp41          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB42             |    |    |    |    |    |    | Exp42          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB43             |    |    |    |    |    |    | Exp43          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB44             |    |    |    |    |    |    | Exp4           |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB45             |    |    |    |    |    |    | Exp45          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB46             |    |    |    |    |    |    | Exp46          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB47             |    |    |    |    |    |    | Exp47          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB48             |    |    |    |    |    |    | Exp48          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB49             |    |    |    |    |    |    | Exp49          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB50             |    |    |    |    |    |    | Exp50          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB51             |    |    |    |    |    |    | Exp51          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB52             |    |    |    |    |    |    | Exp52          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB53             |    |    |    |    |    |    | Exp53          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB54             |    |    |    |    |    |    | Exp54          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| TB55             |    |    |    |    |    |    | Exp55          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
|                  |    |    |    |    |    |    | Exp56          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
|                  |    |    |    |    |    |    | Exp57          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
|                  |    |    |    |    |    |    | Exp58          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
|                  |    |    |    |    |    |    | Exp59          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
|                  |    |    |    |    |    |    | Exp60          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
|                  |    |    |    |    |    |    | Exp61          |    |    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |    |    |
| 43 su 55 (78,2%) |    |    |    |    |    |    | 36 su 61 (59%) |    |    |    |    |    |    | 11 su 21 (52,4%) |    |    |    |    |    |    |

Fig. 11

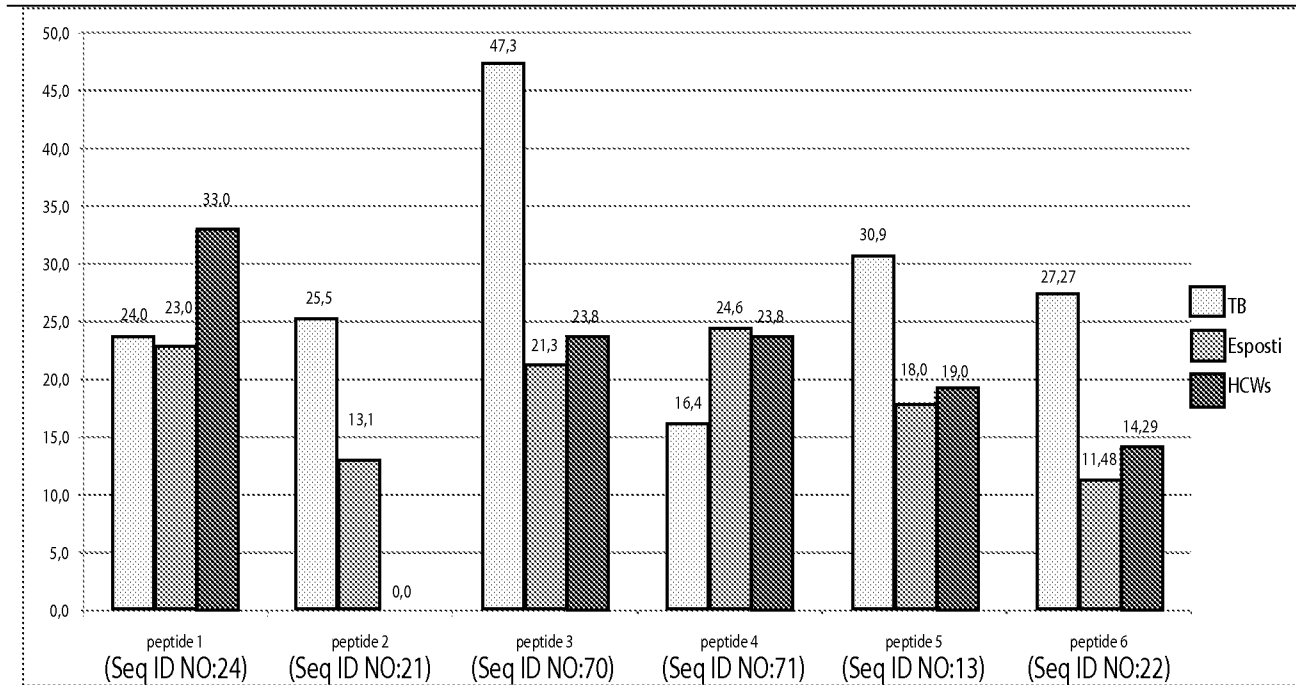


Fig. 12