

(11) Número de Publicação: **PT 637335 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/31 (2006.01) **C12N 9/88** (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) **A61K 39/10** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 1993.04.21	(73) Titular(es): INSTITUT PASTEUR 25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS CÉDEX 15 FR
(30) Prioridade(s): 1992.04.21 US 871795 1993.01.29 US 11644	
(43) Data de publicação do pedido: 1995.02.08	(72) Inventor(es): CLAUDE LECLERC FR DANIEL LADANT FR PETER SEBO FR AGNÈS ULLMAN FR
(45) Data e BPI da concessão: 2007.07.25 112/2007	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MUTANTES RECOMBINANTES PARA INDUZIR RESPOSTAS IMUNITÁRIAS ESPECÍFICAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"Mutantes recombinantes para induzir respostas imunitárias específicas"

Plasmídeo recombinante que inclui os genes *cyaC* e *cyaA* de *Bordetella* que dirige a expressão da adenilato-ciclase de *Bordetella* numa célula hospedeira transformada. Uma molécula de ADN recombinante pode incluir o gene *cyaA* de *Bordetella* contendo pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo em pelo menos um local permissivo. Adicionalmente, uma adenilato-ciclase recombinante de *Bordetella* inclui um epítipo heterólogo num local permissivo. Proporcionam-se métodos para induzir uma resposta imunitária específica de células B, células T auxiliaadoras e CTL.

DESCRIÇÃO

"Mutantes recombinantes para induzir respostas imunitárias específicas"

ANTECEDENTES DO INVENTO

O invento refere-se a uma composição para induzir resposta imunitária em que a referida composição inclui uma adenilato-ciclase recombinante obtida por expressão do gene *cyaC* da espécie *Bordetella* ligado operativamente a uma sequência de controlo da expressão e de um gene *cyaA* recombinante da espécie *Bordetella* que codifica uma adenilato-ciclase ligada operativamente a uma sequência de controlo da expressão, em que o referido gene *cyaA* contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo em pelo menos um local permissivo e em que a adenilato-ciclase está desprovida de actividade catalítica; e em que adicionalmente a referida expressão é efectuada numa célula hospedeira seleccionada do grupo de bactérias, células eucarióticas e leveduras.

O presente pedido descreve uma molécula de ADN recombinante incluindo o gene de toxina de adenilato-ciclase (*cyaA*) ou um seu fragmento contendo uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo num local permissivo, em que o fragmento codifica um polipéptido apresentando as mesmas propriedades imunológicas que o produto do gene *CyaA*. Em concretizações específicas do presente invento a sequência de ADN heterólogo codifica um epítipo imunológico. O *CyaA* pode ser obtido de qualquer microorganismo ou de outro modo.

O presente pedido também descreve uma adenilato-ciclase recombinante incluindo um epítipo heterólogo num local permissivo. Em concretizações específicas do presente invento o epítipo heterólogo é inserido no domínio catalítico N-terminal da adenilato-ciclase recombinante e pode ser apresentado ao sistema imunitário em associação com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I. Noutras concretizações do presente invento o epítipo heterólogo é inserido no domínio catalítico C-terminal e pode ser apresentado ao sistema imunitário em associação com o MHC de classe II.

Revelam-se igualmente métodos para induzir respostas imunitárias específicas em animais imunizados com composições imunológicas incluindo adenilato-ciclases recombinantes. Em concretizações específicas do presente invento são especificamente induzidas respostas de células B, de CD4⁺ e de células T citotóxicas. Com o advento de técnicas de ADN recombinante para modificar sequências de proteínas, tem-se dedicado uma quantidade considerável de trabalho à alteração ou melhoria específicas de proteínas existentes. A modificação de aminoácidos específicos de enzimas de estrutura conhecida para alterar a especificidade tem sido conseguida por mutagénese dirigida ao local. Apesar do conhecimento da estrutura tridimensional estar restrito a um número limitado de proteínas, as comparações de sequências entre membros de famílias de proteínas homólogas assim como previsões cada vez mais exactas de estruturas secundárias e terciárias, oferecem uma base útil para redesenhar a função enzimática.

Outra abordagem com grande interesse potencial é a inserção de novas sequências peptídicas no interior de uma determinada proteína. A mutagénese por inserção tem sido utilizada eficazmente para estudar a topologia de proteínas de membrana (Charbit *et al.*, 1986, 1991) e no caso de proteínas solúveis para determinar regiões de flexibilidade natural (Barany, 1985a, 1985b; Freimuth e Ginseberg, 1986; Starzyk *et al.*, 1989; Freimuth *et al.*, 1990; Kumar e Black, 1991). Além disso, a inserção de um péptido exógeno específico no interior de uma enzima pode alterar as suas propriedades catalíticas ou de regulação, proporcionando assim uma base racional para engenharia de proteínas. Adicionalmente, pode utilizar-se a engenharia de proteínas para alterar ou dirigir especificamente a resposta imunitária para um epítopo definido por alteração do ambiente do epítopo.

A resposta imunitária pode ser dividida em dois sistemas distintos, imunidade celular e imunidade humoral. A imunidade humoral é mediada por moléculas solúveis, principalmente anticorpos. Contrariamente, a imunidade celular é mediada por células intactas, maioritariamente linfócitos T. A resposta imunitária exacta gerada por um antigénio heterólogo depende da natureza do antigénio e do ambiente no qual o antigénio ou um epítopo do antigénio se apresentam ao sistema imunitário.

O evento de iniciação numa resposta imunitária humoral é a ligação de um epítopo B a uma imunoglobulina (Ig) associada à membrana num subconjunto específico de células B. Esta ligação estimula a entrada das células B no ciclo celular, resultando eventualmente na produção de anticorpos que reconhecem especificamente o epítopo B. A resposta de anticorpos desencadeada por um epítopo B pode ser dependente de células T ou independente de células T. As respostas dependentes de células T caracterizam-se por uma resposta primária muito baixa seguida por uma resposta de memória de IgG. A resposta independente de células T, por outro lado, caracteriza-se por uma resposta de anticorpos IgM rápida, intensa e prolongada.

A resposta imunitária mediada por células é activada por epítomos T. Os epítomos T dividem-se de um modo geral em duas categorias. Muitos epítomos podem activar tanto células T como células B e são por isso tanto epítomos T como epítomos B. Outros epítomos T são formas desnaturadas de determinantes antigénicos nativos e não podem activar uma resposta imunitária humoral mediada por células B.

Para activar uma resposta imunitária mediada por células o epítopo T tem que se associar a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). O MHC é uma região de genes altamente polimórficos cujos produtos são expressos à superfície de diferentes células. Existem dois grupos principais de MHC. O MHC de classe I é uma proteína transmembranar formada por duas cadeias polipeptídicas. A molécula contém uma região de ligação a péptidos extracelulares que é polimórfica no local de ligação ao péptido, uma região do tipo imunoglobulina, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático que contém locais de fosforilação para uma proteína-quinase dependente de AMPc.

Encontra-se o MHC de classe I em virtualmente todas as células nucleadas. O MHC de classe I está geralmente associado a epítomos T sintetizados endogenamente para apresentação ao sistema imunitário mediado por células. Dado que esta associação de MHC de classe I a antigénios específicos ocorre no retículo endoplasmático, os antigénios que são internalizados por uma célula apresentadora de antigénios através da via endocitótica não se associam geralmente ao MHC

de classe I. A associação de um epítopo T específico ao MHC de classe I e a incorporação do complexo antígeno-MHC de classe I na superfície de uma célula estimulam linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos. Os linfócitos T citotóxicos estimulados podem então matar a célula que expressa o complexo antígeno-MHC por exocitose de grânulos de uma proteína formadora de poros de membrana que causa lise celular e excreção de uma toxina celular que activa enzimas de degradação de ADN. Contudo, a activação das células CTL também requer, em certos casos, a activação de células T auxiliaadoras.

A outra classe principal de proteínas MHC é o MHC de classe II. As MHC de classe II são também proteínas transmembranares. Tal como o MHC de classe I, o MHC de classe II inclui duas cadeias polipeptídicas e inclui uma região de ligação a péptidos polimórfica, uma região do tipo imunoglobulina, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático. Contudo, contrariamente ao MHC de classe I, as moléculas de classe II são apenas expressas em "células apresentadoras de antígeno" tais como linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e algumas outras. Os epítotos T associam-se ao MHC de classe II quando um antígeno incluindo o epítoto T se liga à superfície de uma célula apresentadora de antígeno. O antígeno entra na célula através de fagocitose ou por endocitose mediada por receptores em vesículas revestidas de clatrina. Alternativamente, os antígenos solúveis podem ser internalizados por pinocitose de fase fluida. Após internalização do antígeno, este é processado por proteases celulares em vesículas ácidas resultando em péptidos com 10-20 aminoácidos de comprimento. Estes epítotos ligam moléculas de MHC de classe II em vesículas intracelulares e o complexo é transportado para a superfície celular. A presença do complexo MHC de classe II-antígeno à superfície de células apresentadoras de antígenos resulta no estímulo de subpopulações de células T auxiliaadoras. Estas células auxiliam a função das CTL assim como respostas de células B. Adicionalmente, as células T auxiliaadoras podem mediar respostas inflamatórias.

Dois factores importantes na determinação do carácter de uma resposta imunitária são a natureza do antígeno que é

reconhecido e o atingimento intracelular ou extracelular do antigénio. Assim, um epítopo de célula T que possa direccionado para entrar numa célula apresentadora de antigénios de um modo dependente de endocitose mediada por receptores, ficará associado com o MHC de classe II e activará células T auxiliaadoras mas não células CTL. Além disso, se um epítopo de célula T estranho puder ser direccionado para o citoplasma de uma célula alvo de um modo independente de endocitose mediada por receptores e, o epítopo ficará associado ao MHC de classe I e permitirá a activação de células CTL. Consequentemente, existe uma necessidade na arte de direccionar especificamente epítopos de modo a activar selectivamente uma resposta imunitária mediada por células ou humoral.

SUMÁRIO DO INVENTO

O invento refere-se a uma composição para induzir uma resposta imunitária, em que a referida composição inclui uma adenilato-ciclase recombinante obtida por expressão do gene *cyaC* da espécie *Bordetella* ligado operativamente a uma sequência de controlo da expressão e de um gene *cyaA* recombinante da espécie *Bordetella* que codifica uma adenilato-ciclase ligada operativamente a uma sequência de controlo da expressão, em que o referido gene *cyaA* contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo em pelo menos um local permissivo e em que a adenilato-ciclase está desprovida de actividade catalítica; e em que adicionalmente a referida expressão é efectuada numa célula hospedeira seleccionada do grupo de bactérias, células eucarióticas e leveduras.

Revela-se um plasmídeo recombinante útil para expressar adenilato-ciclase, em que o plasmídeo inclui os genes *cyaA* e *cyaC* da adenilato-ciclase de espécie *Bordetella*, ou seus homólogos, ligados operativamente a uma sequência de controlo da expressão, em que o plasmídeo recombinante dirige a expressão da adenilato-ciclase da espécie *Bordetella* numa célula hospedeira transformada seleccionada do grupo que consiste em bactérias, células eucarióticas e leveduras. Numa concretização específica do presente invento, o gene *cyaA* e o gene *cyaC* são o gene *cyaA* e o gene *cyaC* de *Bordetella pertussis*. Noutras concretizações específicas do presente

invento, a célula hospedeira é *E. coli*, a sequência de controlo da expressão inclui o promotor lac ou o gene *cyaA* inclui ADN que codifica um epítopo heterólogo. Numa concretização específica o plasmídeo recombinante é pCACT3.

O presente pedido também descreve uma molécula de ADN recombinante incluindo o gene *cyaA* de adenilato-ciclase da espécie *Bordetella* ou seus homólogos, em que o gene *cyaA* contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo em pelo menos um local permissivo. Em concretizações do presente invento a sequência de ADN heterólogo codifica menos de 25 aminoácidos, entre 10-20 aminoácidos e 16 aminoácidos. Em concretizações específicas do presente invento, a sequência de ADN heterólogo é um epítopo de poliovírus, vírus VIH, vírus *influenza* ou vírus da coriomeningite linfocítica e é inserido no domínio catalítico N-terminal ou no domínio C-terminal.

O presente pedido revela adicionalmente uma adenilato-ciclase recombinante de *Bordetella pertussis* incluindo um epítopo heterólogo num local permissivo. Numa concretização do presente invento a adenilato-ciclase está na forma desintoxicada. Em concretizações específicas do presente invento o epítopo heterólogo é inserido no domínio catalítico N-terminal e o epítopo heterólogo é apresentado a linfócitos T CD8⁺ em associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I. Noutras concretizações específicas do presente invento o epítopo heterólogo é inserido no domínio C-terminal e é apresentado a linfócitos T CD4⁺ em associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II.

Numa concretização específica do presente invento, o local permissivo da adenilato-ciclase de *Bordetella pertussis* é seleccionado do grupo que consiste nos resíduos 137-138, resíduos 224-225, resíduos 228-229, resíduos 235-236 e resíduos 317-318. Noutras concretizações específicas do presente invento o epítopo heterólogo da adenilato-ciclase recombinante de *Bordetella pertussis* é o epítopo 118-132 da nucleoproteína do vírus da coriomeningite linfocítica, um epítopo do vírus VIH, nomeadamente o epítopo incluído na

ansa V3, um epítopo do vírus *influenza* ou um epítopo de poliovírus, nomeadamente epítopo 103-116 de poliovírus.

Além disso, este pedido descreve um método para induzir a resposta imunitária de células B incluindo imunização de animais com bactérias vivas que expressam uma adenilato-ciclase recombinante ou uma composição imunológica incluindo uma adenilato-ciclase recombinante ou um fragmento de AC, em que a adenilato-ciclase recombinante inclui um epítopo B heterólogo.

Em concretizações específicas do presente invento, as bactérias utilizadas no método para induzir resposta imunitária de células B são *E. coli*. Numa concretização adicional, os animais imunizados com a composição imunológica ou bactérias são seres humanos. Em concretizações específicas, o epítopo B heterólogo é um epítopo B de poliovírus B, um epítopo B de VIH, um epítopo B de vírus da coriomeningite linfocítica ou um epítopo B de vírus *influenza*.

Descreve-se igualmente um método para induzir uma resposta imunitária de células T CD4⁺, em que o método inclui imunização de animais com uma composição imunológica incluindo uma adenilato-ciclase recombinante, em que a referida adenilato-ciclase recombinante inclui um epítopo T heterólogo num local permissivo no domínio terminal C da referida adenilato-ciclase recombinante.

Numa concretização específica do presente invento, a composição imunológica inclui adicionalmente um adjuvante adequado. Numa concretização adicional, o epítopo T heterólogo é um epítopo T de poliovírus, VIH, vírus *influenza* ou vírus da coriomeningite linfocítica.

O presente pedido revela adicionalmente um método para induzir resposta imunitária de células T CD8⁺, em que o método inclui imunização de animais com uma composição imunológica incluindo uma adenilato-ciclase recombinante, em que a adenilato-ciclase recombinante inclui pelo menos um epítopo CTL heterólogo em pelo menos um local permissivo no domínio catalítico N-terminal da adenilato-ciclase recombinante.

Numa concretização específica do presente invento, a composição imunológica inclui adicionalmente um adjuvante adequado tal como hidróxido de alumínio. Numa concretização adicional, o epítipo T heterólogo é um epítipo T de poliovírus, VIH, vírus da coriomeningite, nomeadamente o epítipo 118-132 da nucleoproteína do vírus da coriomeningite ou vírus *influenza*.

DESCRIÇÃO SUCINTA DA FIGURA

A figura representa esquematicamente um método para construir o plasmídeo pCACT3.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

O invento refere-se a uma composição para induzir uma resposta imunitária, em que a referida composição inclui uma adenilato-ciclase recombinante obtida por expressão do gene *cyaC* da espécie *Bordetella* ligado operativamente a uma sequência de controlo da expressão e de um gene *cyaA* recombinante da espécie *Bordetella* que codifica uma adenilato-ciclase ligado operativamente a uma sequência de controlo da expressão, em que o referido gene *cyaA* contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo em pelo menos um local permissivo e em que a adenilato-ciclase está desprovida de actividade catalítica; e em que adicionalmente a referida expressão é efectuada numa célula hospedeira seleccionada do grupo de bactérias, células eucarióticas e leveduras.

O presente pedido revela moléculas de ADN recombinantes incluindo o gene *cyaA* de *Bordetella pertussis*, em que o gene *cyaA* contém uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo num local permissivo. O presente invento também se refere a uma adenilato-ciclase recombinante de *Bordetella pertussis* incluindo um epítipo heterólogo num local permissivo.

Descreve-se igualmente um método para induzir uma resposta imunitária de células T CD4⁺ incluindo imunização de animais com uma composição imunológica, em que a composição imunológica inclui uma adenilato-ciclase recombinante de *Bordetella pertussis* com um epítipo T heterólogo num local permissivo no interior do domínio C-terminal. Também se revela

um método para induzir resposta imunitária de células T CD8⁺ incluindo imunização de animais com uma composição imunológica em que a composição imunológica inclui a adenilato-ciclase recombinante de *Bordetella pertussis* com um epítipo T heterólogo num local permissivo no interior do domínio catalítico N-terminal.

Tal como aqui utilizada, a expressão "sequência de controlo da expressão" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que regula a transcrição e/ou a tradução de um gene estrutural. Esta regulação pode ser directa ou indirecta. Assim, constituem exemplos de sequências de controlo da expressão, entre outras, promotores, operadores, locais de ligação ao ribossoma e ADN que codifica locais de ligação ao ribossoma.

Tal como aqui utilizada, a expressão "sequência de ADN heterólogo" refere-se a uma sequência de ADN derivada do ADN de uma espécie diferente do ADN da porção remanescente da molécula ou gene na/no qual se localiza a sequência heteróloga. A sequência de ADN heterólogo pode ser sintetizada enzimática ou quimicamente. Alternativamente, a sequência de ADN heterólogo pode ser directamente isolada a partir de um organismo de origem.

Tal como aqui utilizada em referência a uma proteína, a expressão "local permissivo" refere-se a um local no interior da molécula da proteína ao qual se podem adicionar aminoácidos exógenos sem afectar apreciavelmente as propriedades funcionais da proteína.

Tal como aqui utilizada em referência a um ácido nucleico, a expressão "local permissivo" refere-se a um local no interior do ácido nucleico ao qual se podem adicionar nucleótidos exógenos mantendo o quadro de leitura sem afectar apreciavelmente as propriedades funcionais de uma proteína expressa a partir do ácido nucleico.

Tal como aqui utilizado, o termo "epítipo" refere-se a uma sequência de aminoácidos ou outra molécula ou seu fragmento, que pode induzir uma resposta imunitária.

Tal como aqui utilizada, a expressão "epítopo B" refere-se a uma sequência de aminoácidos ou outra molécula ou seu fragmento, que pode induzir uma resposta imunitária envolvendo linfócitos B.

Tal como aqui utilizada, a expressão "epítopo heterólogo" refere-se a um epítopo que pode ser inserido numa proteína por técnicas recombinantes em que o epítopo inserido não se encontra naturalmente nessa proteína.

Depositou-se a estirpe XL-1 de *E. coli* contendo pCACT3 na "Collection Nationale de Cultures de Micro-organisms" do Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, Cedex 15, França, com o número de acesso I-1201 a 8 de Abril de 1992.

Os mecanismos pelos quais se controla a imunogenicidade de epítopos peptídicos definidos envolvem tanto as características intrínsecas de um determinado epítopo como factores ambientais. Estes factores ambientais dependem da exposição do epítopo como parte de estruturas complexas e organizadas tais como parasitas ou bactérias. Por expressão de determinado epítopo peptídico em diferentes locais permissivos de diferentes proteínas bacterianas, é possível alterar os factores ambientais e assim modificar especificamente a imunogenicidade do epítopo peptídico.

A adenilato-ciclase de *Bordetella pertussis* representa um veículo adequado para especificar a resposta imunogénica de um epítopo peptídico heterólogo em concretizações do presente invento. A adenilato-ciclase de *Bordetella pertussis* constitui uma das toxinas essenciais deste organismo que é o agente causador da tosse convulsa. A adenilato-ciclase é excretada por *Bordetella pertussis* e apresenta a capacidade de entrar em células eucarióticas alvo onde, activada pela calmodulina (CaM), catalisa a síntese de AMP cíclico (AMPC) impedindo assim o metabolismo celular. A adenilato-ciclase (AC) é sintetizada e excretada na forma de um polipéptido de 1706 aminoácidos: a actividade catalítica dependente da calmodulina localiza-se nos primeiros 400 aminoácidos. A porção C-terminal com aproximadamente 1300 resíduos é responsável pela ligação às células alvo e pela translocação

do domínio catalítico N-terminal através da membrana citoplasmática destas células. Adicionalmente, esta porção C-terminal apresenta uma actividade hemolítica fraca.

Várias características da AC de *Bordetella pertussis* indicam que esta toxina pode ser utilizada como um veículo para induzir uma resposta imunogénica específica:

- 1) esta adenilato-ciclase é capaz de entrar em várias células diferentes, nomeadamente diferentes tipos de células associadas com o sistema imunitário;
- 2) a adenilato-ciclase pode ser internalizada pelas células alvo independentemente de um processo de endocitose mediado por receptor, o que sugere que o domínio catalítico da toxina é capaz de penetrar directamente através da membrana citoplasmática das células alvo;
- 3) o domínio catalítico N-terminal sofre proteólise rápida no interior das células alvo, o que permite que epítomos associados a este domínio entrem na via do MHC de classe I de apresentação de antigénios; e
- 4) foram identificados vários aminoácidos envolvidos na actividade catalítica da AC, permitindo a construção de toxinas AC modificadas que estão desprovidas de actividade enzimática e portanto já não são citotóxicas. Consultar Sakamoto, H., Sebo, P., Ladant., J. Biol. Chem., 267:13598-13602 (1992).

O locus genético (*cya*) de codificação da toxina adenilato-ciclase (*Cya*) de *Bordetella pertussis* é composto por cinco genes (*cyaA-E*). O gene *cyaA* codifica a adenilato-ciclase. A expressão do gene *cyaA* em *E. coli* leva à produção de um produto génico de 200 kDa apresentando actividade catalítica, mas isento de actividades invasiva e hemolítica. Contudo, a co-expressão do produto génico de *cyaC* torna a holotoxina *cyaA* invasiva e hemolítica numa sistema de expressão reconstituído em *E. coli*. A co-expressão dos genes *cyaB*, *D* e *E* em *trans* relativamente a *cyaA* não confere capacidade invasiva e actividade hemolítica à holotoxina nem potencia as actividades apresentadas pelo produto génico *cyaC*.

Pensa-se que a activação de *CyaA* mediada por *CyaC* resulta de uma modificação pós-tradução. Esta modificação não é

perdida durante a purificação da toxina a partir de *B. pertussis* por um procedimento incluindo extracção com ureia 8 M ou separação por SDS-PAGE (Hewlett *et al.*, 1989). Esta revelação indica que a modificação é covalente.

Compararam-se as actividades invasiva e hemolítica das toxinas CyaA produzidas de forma recombinante em *E. coli* ou de forma natural em *B. pertussis*. Os resultados indicam que as proteínas activadas por cyac produzidas em *E. coli* apresentam 5 vezes menos actividade hemolítica do que a toxina produzida em *B. pertussis*. A razão entre a actividade invasiva e a actividade hemolítica não se alterou significativamente com a purificação das proteínas indicando que a diminuição da actividade hemolítica não se deve a qualquer factor de inibição presente nos extractos de *E. coli*, mas pelo contrário reflecte um propriedade intrínseca das toxinas produzidas em *E. coli*. Dois argumentos adicionais apoiam esta interpretação. Primeiro, o desenrolar temporal da hemólise é praticamente linear independentemente da fonte das toxinas o que indica que a estabilidade das proteínas purificadas de *E. coli* e *B. pertussis* é semelhante. Em segundo lugar, podem excluir-se possíveis diferenças na conformação inicial das toxinas produzidas nos dois organismos dado que os procedimentos de purificação envolvem desnaturação completa em ureia 8 M.

Estes dados indicam que as actividades invasiva e hemolítica da toxina CyaA podem ser separadas. Tal sugere o envolvimento nas actividades invasiva e hemolítica de diferentes determinantes estruturais do interior da toxina CyaA. A diminuição da actividade hemolítica da toxina produzida em *E. coli* poderia também ser explicada por uma diferença na natureza das modificações pós-tradução que ocorrem em ambos os organismos ou pela presença de um factor adicional presente em *B. pertussis* que é necessário para conferir actividade hemolítica completa à toxina.

Construíram-se vectores de expressão que dirigem a expressão tanto do gene *cyaA* como do gene *cyaC* (Sebo *et al.*, 1991). Adicionalmente, construiu-se outro vector de expressão de plasmídeo, pCACT3, que contém ambos os genes *cyaA* e *cyaC*. Este vector de expressão permite um segundo plasmídeo compatível transportando genes necessários para a excreção da

AC citotóxica em *E. coli*, tal como hlyB e hlyD tal como descrito em Meckman et al., 1985.

O plasmídeo pCACT3 foi construído em várias etapas (consultar a figura 1):

- 1) construiu-se o plasmídeo pAHL1 por inserção, entre os locais únicos *Pst*I e *Eco*RI do plasmídeo pACM384, do oligonucleótido 5'CTG CAGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCT AAG TAAC TAA GAA TTC3';
- 2) subclonou-se o fragmento *Pvu*II-*Eco*RI de 1,4 kb de pAHL1 no local de clonagem múltipla do fagemídeo pTZ19R (Pharmacia) entre o local *Pst*I (convertido para extremidades lisas com polimerase de T4) e o local *Eco*RI. O plasmídeo resultante é pACDL21;
- 3) inseriu-se um fragmento *Bcl*II-*Sca*I de 5,4 kb originário do plasmídeo pACT7 (Sebo et al., 1991) entre os locais únicos *Bcl*II-*Sca*I de pACDL21 para originar o plasmídeo pDLACT1;
- 4) subclonou-se um fragmento *Nae*I-*Dde*I de 0,636 kb do plasmídeo pDIA4 (Glaser et al., 1988) contendo o gene *cya*C no local *Sma*I do vector pTZ18R (Pharmacia) para originar o plasmídeo pCYAC1 no qual o gene *cya*C está sob o controlo do promotor *lac*;
- 5) subclonou-se o fragmento *Hind*III-*Sca*I de pDLACT1 contendo o gene *cya*A (6,2 kb) entre os locais *Hind*III e *Sca*I de pCYAC1 para originar o plasmídeo pCACT3.

Assim, a toxina AC pode ser expressa em *E. coli* e/ou excretada por esta bactéria em grandes quantidades e é facilmente purificada (cromatografia de afinidade em resina CaM Affi-Gel).

Desenvolvemos uma metodologia que torna possível identificar rapidamente, utilizando uma selecção dupla (resistência a um antibiótico e ensaio calorimétrico em placas por complementação α) a inserção de oligonucleótidos (que mantêm o quadro de leitura) na porção do gene que codifica o domínio catalítico N-terminal da toxina. As consequências funcionais destas mutações sobre a actividade catalítica da toxina podem ser facilmente analisadas genética (complementação funcional de uma estirpe *cya*- de *E. coli*) e bioquimicamente (caracterização da estabilidade das AC

modificadas, da sua actividade enzimática, da sua interacção com CaM, etc.). Esta metodologia permitiu o rastreio de um elevado número de mutações de modo a identificar os locais que são potencialmente vantajosos para a inserção de determinantes antigénicos. Os plasmídeos que foram utilizados para esta identificação foram derivados de pDIA5240 (P. Sebo, P. Glaser, H. Sakamoto e A. Ullman, *Gene* 1991, 104, 19-24, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência) contendo os primeiros 459 codões do gene *cyaA* e que expressaram a porção N-terminal da AC (399 aminoácidos) desprovida de quaisquer actividades invasiva ou citotóxica.

Especificamente, ligou-se um fragmento *PvuII-Bst* de pDIA5240 incluindo 373 pb de codões de *CyaA* à porção do 3'-terminal do gene (3999 pares de bases - 1333 codões). A proteína resultante torna assim a adquirir, na presença do produto do gene *cyac*, o seu poder invasivo. Inseriram-se então sequências peptídicas adicionais de 10 a 20 aminoácidos nos locais previamente identificados de modo a analisar a citotoxicidade das toxinas recombinantes. Em concretizações específicas do presente invento esta inserção está em locais de restrição do gene *cyaA*. As toxinas modificadas que mantêm a sua citotoxicidade (ou seja, cujo domínio catalítico N-terminal é normalmente transportado para o citoplasma das células alvo) podem ser utilizadas como um veículo para apresentação de determinantes antigénicos. Consultar Ladant *et al.*, 1992, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Definimos deste modo cinco locais permissivos na porção N-terminal da AC (inserção entre os aminoácidos 137-138, 224-225, 228-236, 228-229, 235-236 e 317-318). Um mapeamento mais exaustivo permitirá que o perito na especialidade localize outros locais permissivos utilizando os métodos aqui descritos.

Desenvolvemos uma segunda metodologia (resistência a um antibiótico e ensaio de hemólise em placas de Petri contendo sangue) que permite inserções de oligonucleótidos em quadro de leitura na porção do gene que codifica para a porção C-terminal hemolítica da toxina a identificar. Estas inserções são efectuadas num plasmídeo que permite a co-expressão de ambos os genes *cyaA* e *cyaC*, tal como pCACT3. Consultar acima. A vantagem de caracterizar locais "permissivos" para a

inserção de sequências peptídicas adicionais na porção carboxilo-terminal da toxina reside no facto de, contrariamente ao domínio N-terminal, este domínio permanecer associado com a superfície exterior da membrana citoplasmática. Assim, epítomos inseridos nesta região da toxina podem ser dirigidos para a via de apresentação de antigénios específica para o MHC de classe II. Assim, podem construir-se toxinas que são duplamente modificadas - no domínio catalítico N-terminal e no domínio C-terminal - e capazes de apresentar tanto epítomos dirigidos contra o MHC de classe I como outros epítomos dirigidos contra o MHC de classe II.

A/ ADENILATO-CICLASES RECOMBINANTES QUE EXPRESSAM EPÍTOMOS HETERÓLOGOS: APLICAÇÕES EM VACINAS

1. Inserção de epítomos B ou T.

Utiliza-se a toxina AC de *B. pertussis* para apresentar epítomos com importância de vacinas ao sistema imunitário. Esta toxina recombinante pode ser utilizada como uma componente da vacina, sozinha ou na presença de outra(s) preparação(ões) antigénica(s). Pode ser utilizada na forma tóxica ou na forma desintoxicada. A forma desintoxicada pode obter-se por mutagénese dirigida. Por exemplo, por substituição de Lys58 ou Lys65 (Glaser et al., 1989, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência) por um resíduo Gln. Alternativamente, a forma desintoxicada pode ser obtida por inserção do oligonucleótido CTG CAG no local *EcoRV* na posição 564 da fase de codificação do gene *cyaA*. Consultar Ladant et al., 1992.

Pode obter-se ADN que codifica o derivado de adenilato-ciclase de *B. pertussis* do invento, por exemplo, do seguinte modo.

Lineariza-se o plasmídeo pDIA5240 num local de restrição em que o ADN que codifica um epítomo heterólogo vai ser inserido. Em concretizações específicas do presente invento, o local de restrição é *NruI* quando o local permissivo é nos resíduos 137-138 ou nos resíduos 235-236. Noutras concretizações o local de restrição é *HindIII* quando o local permissivo está nos resíduos 224-225, nos resíduos 228-229 ou

nos resíduos 317-318. O derivado de pDIA5240 resultante contendo epítipo(s) heterólogo(s) num local permissivo é restringido com *PvuII* e *BstBI*. Isola-se um fragmento de 1,4 Kb contendo a porção do gene da adenilato-ciclase que codifica o domínio catalítico N-terminal e incluindo um epítipo heterólogo. O fragmento de restrição é então fundido ao remanescente do gene *cyaA* por inserção entre o local *HindIII* (ligado a uma extremidade lisa por ADN-polimerase de T4) e o local *BstBI* de pCACT3. O epítipo heterólogo pode ser inserido em pDIA5240 como parte de um ligante que é compatível com um local permissivo apropriado. Em concretizações específicas do presente invento o ligante codifica cerca de 16 aminoácidos.

Qualquer epítipo reconhecido pelas células do sistema imunitário, linfócitos B ou T, pode ser introduzido nos locais permissivos da AC. Cada molécula de toxina pode incluir uma ou mais cópias do mesmo epítipo ou uma combinação de diferentes epítipos, B ou T, localizados em diferentes locais da toxina.

1.1 Epítipos B:

Qualquer epítipo reconhecido por linfócitos B e capaz de induzir anticorpos apresentando actividade biológica pode ser introduzido na toxina. Assim, por exemplo, o epítipo C3 de poliovírus ou o epítipo V3 do vírus VIH, que são capazes de induzir anticorpos neutralizantes desses vírus, serão introduzidos na toxina. Numa concretização preferida do presente invento, o epítipo V3 do vírus VIH a ser inserido é RIQRGPGRAFTIGK (resíduos 315-329). No caso do epítipo V3, podem ser introduzidos em diferentes locais da toxina epítipos V3 correspondentes aos diferentes isolados do vírus.

De modo semelhante, podem preparar-se toxinas recombinantes apresentando outros epítipos do vírus VIH (e nomeadamente epítipos conservados). Cada molécula de toxina pode então apresentar epítipos B diferentes, na presença ou ausência de outros epítipos (e nomeadamente de epítipos T). As preparações para vacinas podem incluir moléculas de toxina recombinante apresentando diferentes epítipos.

Alternativamente, estes epítipos podem ser expressos no interior de outras proteínas vector. Por exemplo, podem utilizar-se as duas proteínas de envelope de *E. coli* LamB e

MalE. Quando o epítopo é expresso à superfície de bactérias transformadas como parte da proteína da membrana externa LamB, é induzida uma resposta de anticorpos independente de células T caracterizada por uma indução rápida de anticorpos IgM e IgG. Contrariamente, quando o epítopo é expresso como parte da proteína periplasmática MalE, é induzida uma resposta de anticorpos dependente de células T pertencente à classe IgG.

A imunização com as moléculas de toxina recombinantes e detecção de anticorpos é efectuada tal como descrito em Leclerc *et al.*, 1991, que é aqui incorporado por referência.

1.2 Epítomos T auxiliares (CD4⁺):

As moléculas de toxina recombinante podem também ser utilizadas para apresentar epítomos reconhecidos por linfócitos T CD4⁺. Estes epítomos serão inseridos quer sozinhos quer em combinação com outros epítomos T ou B. Podem então inserir-se os epítomos T 103-116 de poliovírus, sozinhos ou em continuidade com o epítopo B 93-103, epítomos T do vírus VIH e nomeadamente o epítopo T incluído na ansa V3 ou o epítopo T do vírus da coriomeningite linfocítica incluído na região 118-132 da nucleoproteína. A sequência da região 118-132 da nucleoproteína do vírus da coriomeningite linfocítica é RPQASGVYMGNLTAQ.

A sequência do epítopo B 93-103 de poliovírus (epítopo C3) é: DNPASTTNKDK

A sequência do epítopo T é: KLFAVWKITYKDT.

Para a geração de respostas T CD4⁺ auxiliares, os epítomos T serão preferencialmente inseridos na região C-terminal da toxina capaz de entrar na célula apresentadora por uma via de endocitose. Podem utilizar-se moléculas de toxina apresentando actividade de AC ou mutadas para perderem esta actividade, dependendo do tipo de resposta CD4⁺ pretendida. A molécula recombinante pode consistir num fragmento ou na proteína adenilato-ciclase completa que expresse epítopo(s) heterólogo(s).

1.3 Detecção de respostas CD4⁺ após imunização com moléculas de adenilato-ciclase apresentando um ou mais epítomos T reconhecidos por linfócitos CD4⁺:

Imunizam-se animais, tais como ratinhos de diferentes estirpes, com as moléculas de toxina recombinante na presença de um adjuvante adequado tal como adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund ou hidróxido de alumínio. Duas semanas mais tarde, as respostas T CD4⁺ são determinadas pela proliferação de linfócitos (baço ou gânglios linfáticos de drenagem) cultivados com o péptido correspondente ao epítomo T inserido tal como descrito anteriormente. Consultar Fayolle, et al., 1991. Contrariamente, o reconhecimento por linfócitos de ratinhos imunizados com péptidos de moléculas de toxina recombinante *in vitro* é determinado por incorporação de timidina. Consultar Leclerc, et al. 1991.

1.4 Inserção de epítomos T reconhecidos por linfócitos T citotóxicos:

A toxina AC apresenta a capacidade de entrar no citoplasma de células alvo. Tal torna possível entregar epítomos T reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ ao citoplasma dessas células e permite a associação desses epítomos com moléculas do MHC de classe I. Constituem fontes de AC a espécie *Bordetella*, suas homólogas ou outros organismos que expressam AC. Em concretizações do presente invento, a adenilato-ciclase é uma AC dependente de calmodulina. Em concretizações específicas, a AC é AC de *Bordetella pertussis*.

1.5 Indução de células T citotóxicas:

Podem obter-se respostas T citotóxicas por imunização com toxina recombinante, sozinha ou na presença de um adjuvante tal como hidróxido de alumínio. As vias podem ser a via oral, a via subcutânea ou a via intramuscular.

A toxina recombinante expressa um ou mais epítomos reconhecidos por células T citotóxicas. Podem inserir-se na mesma molécula de toxina outros epítomos, nomeadamente epítomos reconhecidos por linfócitos T auxiliares CD4⁺. A identificação de um epítomo como um epítomo CTL ou um epítomo T auxiliador é determinada experimentalmente.

Como exemplo, inserimos no interior da toxina o epítopo 118-132 da nucleoproteína do vírus da coriomeningite linfocítica (Aichele, *et al.* 1990), que é simultaneamente um epítopo CTL e um epítopo T auxiliador. A sequência de aminoácidos deste epítopo é: RPQASGVYMGNLTAQ. Podem inserir-se epítopos de outros agentes patogénicos e nomeadamente de VIH (epítopos CTL das proteínas env, gag, nef, etc.). Descrevem-se exemplos de epítopos adequados em Nixon *et al.*, 1992, que é aqui expressamente incorporado por referência. Podem introduzir-se na mesma molécula de toxina vários epítopos que representam as sequências de diferentes isolados do vírus VIH. De igual modo, é possível utilizar uma mistura de moléculas de toxina recombinante apresentando cada uma um epítopo CTL correspondente a um determinado isolado do vírus VIH.

1.6 Detecção de respostas T citotóxicas:

Estimulam-se linfócitos obtidos de animais imunizados com a toxina recombinante durante 5 dias, com células singénicas revestidas com o péptido correspondente ao epítopo inserido ou na presença de uma toxina recombinante. A detecção de efectores T citotóxicos é efectuada tal como previamente descrito (Fayolle *et al.*, 1991). As células alvo, marcadas com crómio 51 ([⁵¹Cr]) e apresentando as moléculas de classe I compatíveis com as células efectoras, são primeiramente incubadas com o péptido correspondente ao epítopo CTL inserido na toxina recombinante. A resposta T citotóxica é estimada por libertação de [⁵¹Cr] pelas células alvo lisadas.

B/ ADENILATO-CICLASES RECOMBINANTES QUE EXPRESSAM EPÍTOPOS HETERÓLOGOS OU UM LIGANDO PARA UM DETERMINADO RECEPTOR: APLICAÇÕES EM IMUNOTOXINA

A toxina AC recombinante pode ser utilizada para ter como alvo antigénios e receptores celulares. Seguidamente apresentam-se exemplos de várias construções que podem ser concretizadas:

1) construção de proteínas de fusão contendo os primeiros 1490 aminoácidos da AC (esta forma truncada da toxina é incapaz de ligação às células alvo e não é portanto tóxica), fundidos com um factor de crescimento tal como TGF- α (no qual o alvo é o receptor EGF), com IL-2, IL-4 ou IL-6 ou qualquer outra linfoquina, com regiões variáveis de anticorpos

apresentando uma forte afinidade para receptores ou antigénios a serem tomados como alvo, por exemplo, antigénios tumorais;

2) inserção de epítomos B na AC para tomar como alvo células B específicas ou inserção de qualquer outro ligando peptídico que reconhece receptores específicos;

3) construção de uma AC apresentando uma cisteína adicional na extremidade C-terminal da proteína, que permitirá que um polipéptido específico se funda com a AC por acoplamento químico. Deve recordar-se que a AC é uma proteína que não contém cisteína.

A importância potencial da toxina AC de *B. pertussis* comparativamente com outras imunotoxinas reside no facto de que o envenenamento das células alvo pela AC é independente de um processo de endocitose mediado por receptores. Assim, qualquer marcador de superfície específico para uma determinada célula poderia servir como um receptor para ter como alvo a toxina AC recombinante incluindo a toxina AC truncada fundida com um ligando específico.

REFERÊNCIAS

Aichele, P., H. Hengartner, R.M. Zinkernagel e M. Schultz (1990), *J. Exp. Med.*, 171, 1815-1820.

Barany, F. (1985a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4202-4206.

Barany, F. (1985b) *Gene (Amst.)* 37, 111-123.

Charbit, A., Ronco, J. Michel, V., Werts, C. e Hofnung, M. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 262-275.

Fayolle, C., Deriaud, E., Leclerc, C. (1991) *J. Immunol.* 147, 4069-4073.

Freimuth, P.I. e Ginsberg, H.S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 7816-7820.

Freimuth, P.I., Taylor, J.W., e Kaiser E.T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 896-901.

Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A., e Danchin, A. (1988) *Microbiol.* 2, 19-30.

Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A., e Danchin, A. (1989) EMBO J. 8, 967-972.

Glaser, P., Munier, H., Gilles, A.M., Krin, E., Porumb, T., Barzu, O., Sarfati, R., Pellecuer, C., e Danchin, A. (1991) EMBO J 10, 1683-1688.

Hewlett, E.L., Gordon, V.M., McCaffery, J.D., Sutherland, W.M., e Gray, M.C. (1989) J. Biol. Chem. 264, 19379-19384.

Kumar, G.B., e Black, P.N. (1991) J. Biol. Chem. 266, 1348-1353.

Ladant, D., Glaser, P., Ullmann, A. (1992) J. Biol. Chem. 267, 2244-2250.

Leclerc, C., Charbit, A., Martineau, P., Deriaud, E., Hofnung, M. (1991) J. Immunol. 147, 3545-3552.

Meckman, N., Nicaud, J.H., Gray, L. e Holland, I.B. (1985) Mol. Gen. Genet. 201, 282-288.

Nixon, D.F., Broliden, V., Ogg, G. e Biolider, P.A. (1992), Immunology, 76:515-534.

Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H., e Ullmann, A. (1991) Gene (Amst.) 104, 19-24.

Starzyk, R.M., Burbaum, J.J., e Schimmel, P. (1989) Biochemistry 28, 8479-8484.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:

- (A) NOME: INSTITUT PASTEUR
- (B) RUA: 25-28 rue du Dr. Roux
- (C) CIDADE: PARIS CEDEX 15
- (E) PAÍS: FRANÇA
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 75724

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: MUTANTES RECOMBINANTES PARA INDUÇÃO DE RESPOSTAS IMUNITÁRIAS ESPECÍFICAS

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 6

- (iv) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
 - (A) TIPO DE MEIO: Disquete
 - (B) COMPUTADOR: compatível com PC IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)
 - (v) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
 - NÚMERO DE PEDIDO: PCT/EP93/00977
- (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 50 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: dupla
 - (D) TOPOLOGIA: linear

- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOME/CHAVE: misc_feature
 - (B) LOCALIZAÇÃO: 1..6
 - (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /label= PstI

- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOME/CHAVE: misc_feature
 - (B) LOCALIZAÇÃO: 7..12
 - (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /label= Sali

- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOME/CHAVE: misc_feature
 - (B) LOCALIZAÇÃO: 13..18
 - (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /label= XbaI

- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOME/CHAVE: misc_feature
 - (B) LOCALIZAÇÃO: 19..24
 - (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /label= BamHI

- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOME/CHAVE: misc_feature
 - (B) LOCALIZAÇÃO: 24..30
 - (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /label= SmaI

- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - (A) NOME/CHAVE: misc_feature
 - (B) LOCALIZAÇÃO: 28..33
 - (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /label= KpnI

- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

CTGCAGGTCG ACTCTAGAGG ATCCCCGGGT ACCTAAGTAA CTAAGAATTC 50

- (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 48 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADEIA: dupla
 - (D) TOPOLOGIA: linear

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para induzir uma resposta imunitária, em que a referida composição inclui uma adenilato-ciclase recombinante obtida por expressão do gene *cyaC* da espécie *Bordetella* ligado operativamente a uma sequência de controlo da expressão e de um gene *cyaA* recombinante da espécie *Bordetella* que codifica uma adenilato-ciclase ligado operativamente a uma sequência de controlo da expressão, em que o referido gene *cyaA* contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo em pelo menos um local permissivo e em que a adenilato-ciclase está desprovida de actividade catalítica; e em que adicionalmente a referida expressão é efectuada numa célula hospedeira seleccionada do grupo de bactérias, células eucarióticas e leveduras.

2. Composição tal como reivindicada na reivindicação 1, em que a referida resposta imunitária é uma resposta imunitária de células T e a referida sequência de ADN heterólogo é um epítipo T heterólogo.

3. Composição tal como reivindicada na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, em que a referida adenilato-ciclase recombinante é parte de uma proteína de fusão incluindo uma linfoquina, nomeadamente uma linfoquina seleccionada do grupo que consiste em IL-2, IL-4 e IL-6.

4. Composição tal como reivindicada nas reivindicações 1 a 3, em que a referida célula hospedeira é *E. coli*.

5. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida resposta imunitária é uma resposta imunitária de células B e a referida sequência de ADN heterólogo é um epítipo B heterólogo.

6. Composição da reivindicação 5, em que a referida composição inclui bactérias vivas que expressam o gene *cyaC* da espécie *Bordetella* e um gene *cyaA* recombinante da espécie *Bordetella* que codifica uma adenilato-ciclase, em que o referido gene *cyaA* contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo em pelo menos um local permissivo.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o gene *cyaA* é o gene *cyaA* de *Bordetella pertussis*.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que o gene *cyaC* é o gene *cyaC* de *Bordetella pertussis*.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que os referidos genes *cyaA* e *cyaC* se encontram no plasmídeo recombinante pCACT3 depositado na CNCM, com o número de acesso I-1201 em 8 de Abril de 1992.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a referida sequência de ADN heterólogo codifica menos de 25 aminoácidos.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o referido local permissivo é seleccionado do grupo que consiste em ADN que codifica os resíduos 137-138 do produto génico do referido gene *cyaA*, ADN que codifica os resíduos 224-225 do produto génico do referido gene *cyaA*, ADN que codifica os resíduos 228-229 do produto génico do referido gene *cyaA*, ADN que codifica os resíduos 235-236 do produto génico do referido gene *cyaA* e ADN que codifica os resíduos 317-318 do produto génico do referido gene *cyaA*.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que o referido local permissivo é ADN que codifica os resíduos 235-236 do produto génico do referido gene *cyaA*.

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a referida sequência de ADN heterólogo codifica o epítipo C3 de poliovírus humano.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a referida sequência de ADN heterólogo codifica um epítipo de VIH.

15. Composição de acordo com a reivindicação 14, em que o referido epítipo é o epítipo V3 do vírus VIH.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a referida sequência de ADN heterólogo são os resíduos 118-132 da nucleoproteína do vírus da coriomeningite linfocítica.

17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o referido gene de adenilato-ciclase contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo nos resíduos de codificação do ADN 235-236 do produto génico do referido gene de adenilato-ciclase e em que a referida sequência de ADN heterólogo codifica o epítopo C3 de poliovírus humano ou um epítopo de vírus VIH.

18. Composição de acordo com a reivindicação 17, em que o referido epítopo é o epítopo V3 de VIH.

19. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o referido gene de adenilato-ciclase contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo num local permissivo localizado numa sequência de ADN que codifica o domínio N-terminal do produto génico do referido gene *cyaA*.

20. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o referido gene de adenilato-ciclase contém pelo menos uma inserção de uma sequência de ADN heterólogo num local permissivo localizado numa sequência de ADN que codifica o domínio C-terminal do produto génico do referido gene *cyaA*.

21. Composição tal como reivindicada na reivindicação 20, em que a referida sequência de ADN heterólogo que codifica um epítopo T de poliovírus ou um epítopo T de vírus VIH, nomeadamente um epítopo T auxiliador tal como um epítopo T V3 de vírus VIH ou ainda um epítopo T de vírus *influenza*.

22. Composição tal como reivindicada na reivindicação 21, em que o referido gene *cyaA* recombinante inclui uma segunda sequência de ADN heterólogo que codifica um epítopo seleccionado do grupo que consiste num epítopo de poliovírus, um epítopo de vírus VIH e um epítopo de vírus *influenza*.

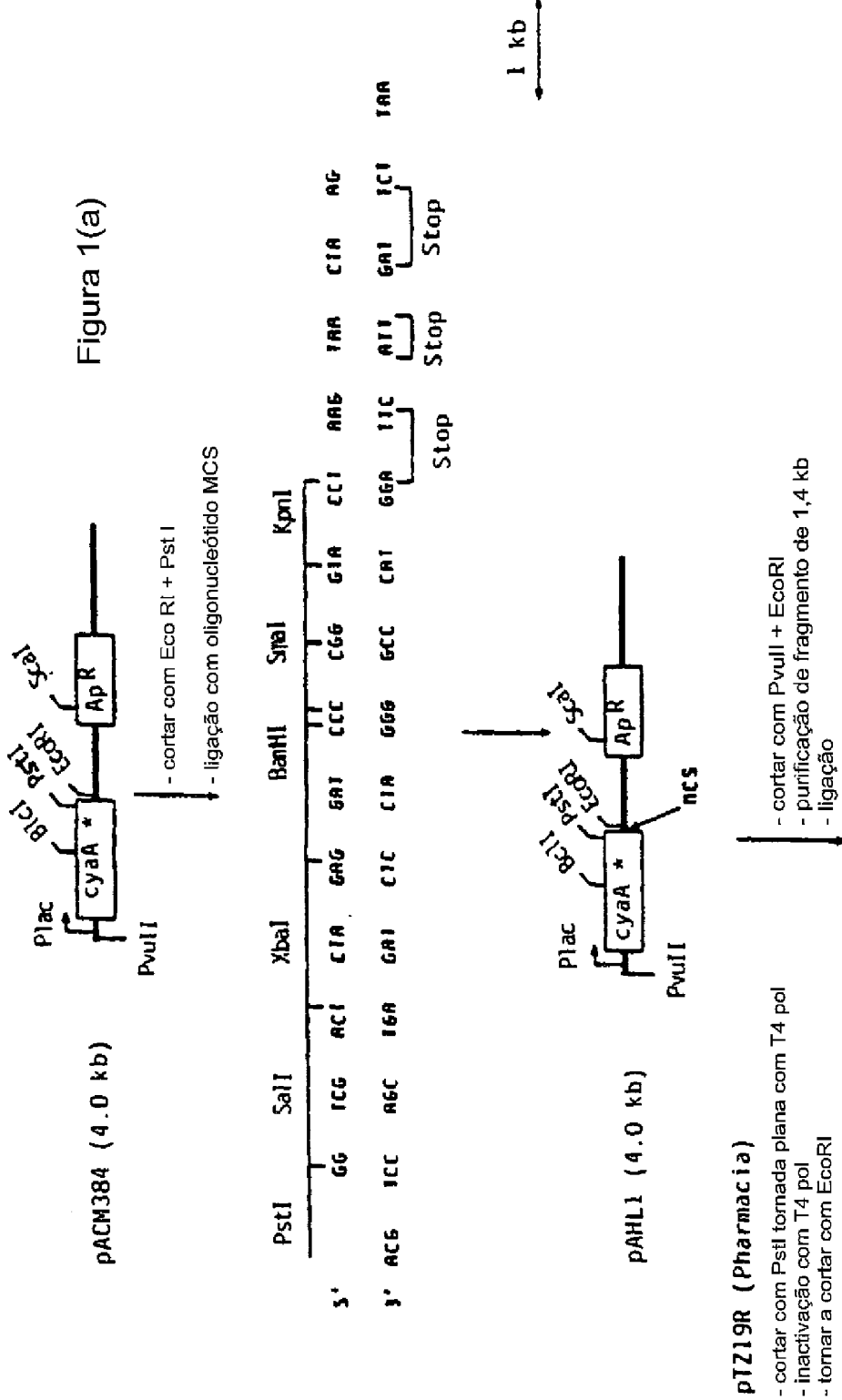
23. Composição tal como reivindicada na reivindicação 20, em que o referido epítopo T é o epítopo T do vírus da coriomeningite linfocítica incluído na região 118-132 da nucleoproteína do referido vírus da coriomeningite.

24. Composição tal como reivindicada na reivindicação 17, em que o referido gene *cyaA* inclui adicionalmente uma mutação que elimina a actividade catalítica do produto génico de *cyaA*.

Lisboa,

Construção de pCACT3

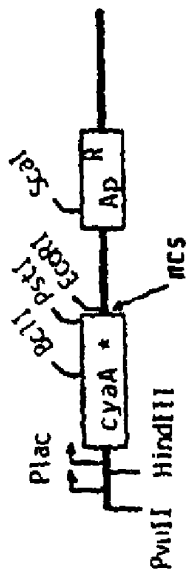
Começando com pACM384 (4.0 kb) [Ladant et al., 1992, J. Biol. Chem. 267, 4-2250]



pTZ19R (Pharmacia)

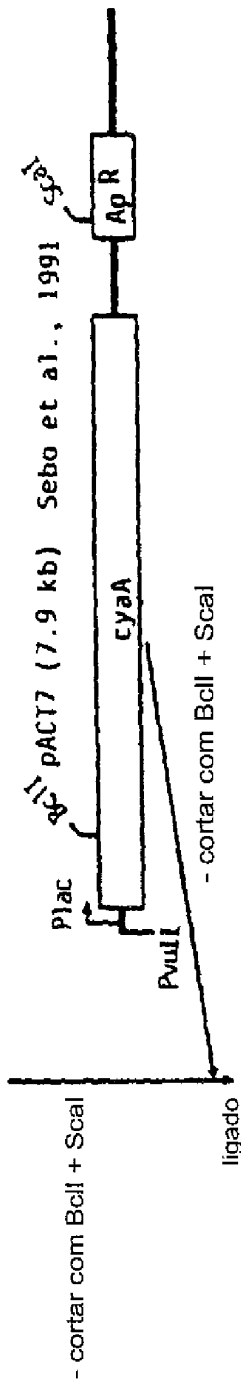
- cortar com PstI tomada plana com T4 pol
- inativação com T4 pol
- tornar a cortar com EcoRI

- cortar com PvuII + EcoRI
- purificação de fragmento de 1,4 kb
- ligação

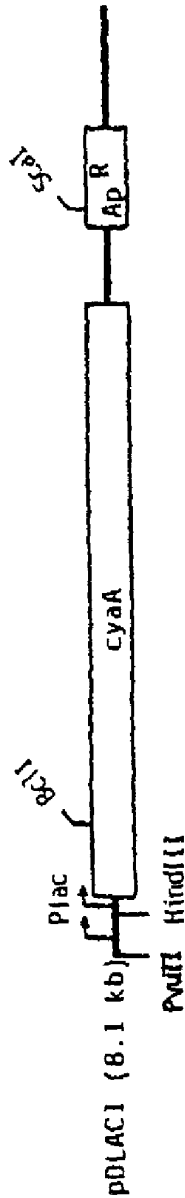


pACDL21 (4.2 kb)

Figura 1(b)



pACT7 (7.9 kb) Sebo et al., 1991



pDLAC1 (8.1 kb)

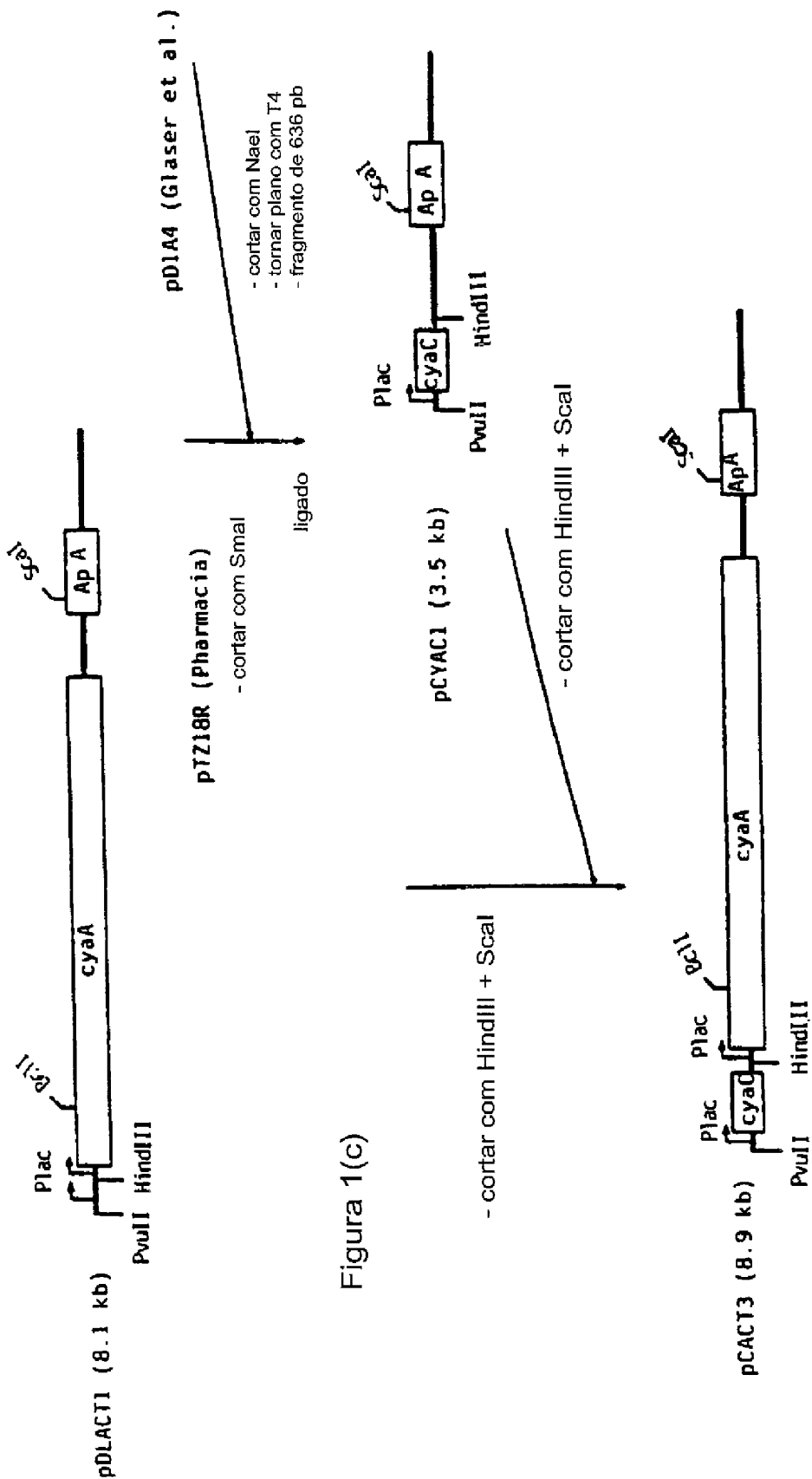


Figura 1(c)