



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0612833-5 A2



(22) Data de Depósito: 20/06/2006
(43) Data da Publicação: 30/11/2010
(RPI 2082)

(51) Int.CI.:
C07K 14/35
A61K 39/04
A61P 31/06

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO E USO DAS TRÊS PRIMEIRAS

(30) Prioridade Unionista: 05/10/2005 DK PA 2005 01393, 23/06/2005 DK PA2005 00924

(73) Titular(es): Statens Serum Institut

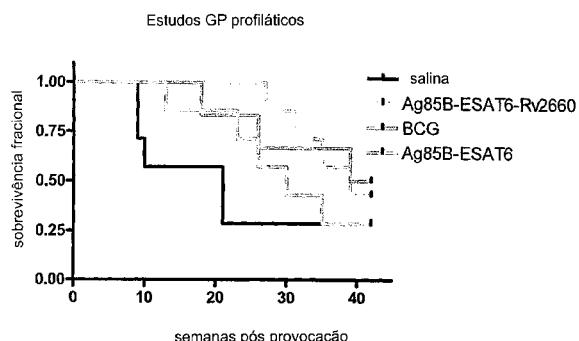
(72) Inventor(es): CARINA VINGSBO-LUNDBERG , CLAUS AAGAARD, PETER ANDERSEN

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000356 de 20/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/136162de 28/12/2006

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO E USO DAS TRÊS PRIMEIRAS. A presente invenção refere-se a uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica para a prevenção, reforço ou tratamento de infecção causada por uma espécie do complexo de tuberculose (M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti). A composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica compreende um polipeptídeo de fusão, que compreende um ou mais抗ígenos de inanição de M. tuberculosis, as unidades do polipeptídeo de fusão sendo抗ígenos de M. tuberculosis. Além disso, a invenção é relacionada ao uso de uma vacina que compreende uma seqüência de polipeptídeo de fusão ou uma seqüência de ácido nucléico da invenção fornecida ao mesmo tempo como BCG, misturada com BCG ou administrada separadamente em sítios ou vias diferentes para a preparação de dita composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica.



~~CÓPIA~~

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO E USO DAS TRÊS PRIMEIRAS".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a antígenos induzidos por inanição ou novos polipeptídeos de fusão de polipeptídeos imunogênicos com base nos polipeptídeos derivados de *Mycobacterium tuberculosis* induzidos durante a inanição, o uso de um ou mais dos polipeptídeos de fusão ou antígenos induzidos por inanição da invenção para a preparação de uma composição imunogênica, vacina ou 10 composição farmacêutica a ser usada para administração a uma pessoa / animal e as composições imunogênicas, vacinas ou composições farmacêuticas como tais.

ANTECEDENTES GERAIS

A tuberculose humana causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) é um problema grave de saúde global, responsável por 15 proximadamente 3 milhões de mortes anuais, de acordo com a WHO. A incidência mundial de novos casos de tuberculose (TB) foi decrescente durante os anos de 60 e 70, mas durante os últimos anos esta tendência tem marcadamente se modificado em parte devido ao advento da AIDS e do surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos de *M. tuberculosis*.

20 A única vacina atualmente disponível para uso clínico é a BCG, uma vacina cuja eficácia permanece uma matéria de controvérsia. A BCG geralmente induz um nível elevado de resistência adquirida em modelos animais de TB, e em seres humanos é protetora contra formas disseminadas de tuberculose tais como meningite e tuberculose miliar. Quando administrada em crianças novas é protetiva contra a tuberculose durante anos, mas depois a eficácia se desvanece. A comparação de vários testes controlados revelou que a eficácia de proteção da BCG em adultos variou dramaticamente com uma faixa de eficácia de ineficaz à 80 % de proteção. Isto torna o desenvolvimento de uma nova e melhorada vacina contra a *M. tuberculosis* 25 um assunto urgente, que foi dada uma prioridade muito elevada pelo WHO.

30 Muitas tentativas de definir as substâncias micobacterianas protetoras têm sido feitas, e diferentes investigadores têm relatado resistência

aumentada após a vacinação experimental. A *M. tuberculosis* possui, assim como secreta, várias proteínas de relevância potencial para a geração de uma nova vacina de *M. tuberculosis*. A pesquisa de moléculas candidatas tem principalmente focalizado sobre as proteínas liberadas de bactérias divisoras. A despeito da caracterização de um grande número de tais proteínas, apenas algumas destas foram demonstradas de induzir uma resposta imune protetiva como vacinas de subunidade em modelos animais, mais notavelmente ESAT-6 e Ag85 (Brandt et al 2000). No entanto, a demonstração de uma resposta imune protetiva a longo prazo específica com a potência de BCG ou a capacidade de reforço em uma pessoa vacinada com BCG ainda não foi alcançada. Na melhor das hipóteses, o reforço de BCG com BCG não possui nenhum efeito [Colditz 1994]. O reforço de BCG tem sido feito com Ag85a (Brooks et al IAI 2001; WO 0204018) em uma cepa de camundongo congênita que leva a alguma proteção, embora comparado com a BCG isoladamente não foi significativamente melhor. Visto que a BCG necessita dividir e secretar proteínas de modo a induzir uma resposta imune protetiva, a falta de efeito reforçador é principalmente devido à sensibilização com as micobactérias ambientais ou uma resposta imune residual da vacinação de BCG primária. Ambos os eventos levam a uma rápida resposta imune contra a BCG e, portanto, inibição rápida do desenvolvimento e eliminação da BCG.

O curso de uma infecção de *M. tuberculosis* segue essencialmente através de 3 fases. Durante a fase aguda, as bactérias proliferam nos órgãos, até que a resposta imune aumenta. Os linfócitos CD4 T especificamente sensibilizados media o controle da infecção, e a molécula mediadora mais importante parece ser o interferon gama (INF-gama). As cargas bacterianas começam a declinar e uma fase latente é estabelecida onde a carga bacteriana é mantida estável em um nível baixo. Nesta fase a *M. tuberculosis* vai da multiplicação ativa à latência, essencialmente se tornando não-replicativa e permanecendo dentro do granuloma. Em alguns casos, a infecção vai até fase de reativação, onde as bactérias latentes começam a se replicar novamente. Foi sugerido que a transição de *M. tuberculosis* da in-

fecção primária até a latência é acompanhada por mudanças na expressão genética (Honer zu Bentrup, 2001). É também provável que as mudanças na especificidade de antígeno da resposta imune ocorram, quando as bactérias modulam a expressão genética durante a sua transição de replicação ativa à latência. A natureza completa de resposta imune que controla a infecção latente e os fatores que levam à reativação são grandemente desconhecidos. No entanto, existe alguma evidência para uma mudança nos tipos celulares dominantes responsáveis. Embora as células CD4 T sejam essenciais e suficientes para o controle da infecção durante a fase aguda, estudos sugerem que as respostas celulares CD8 T são mais importantes na fase latente.

Em 1998 Cole et al publicaram a seqüência do genoma completo de *M. tuberculosis* e prognosticou a presença de aproximadamente 4000 estruturas de leitura abertas (Cole et al 1998) que apresentam seqüências de nucleotídeo e seqüências de proteína putativas. No entanto, de maneira importante, esta informação de seqüência não pode ser usada para predizer se o DNA é traduzido e expresso como proteínas in vivo. É sabido que alguns genes de *M. tuberculosis* são supra-regulados sob condições que imitam a latência. Além do mais, como uma pessoa versada na técnica facilmente observará, a expressão de um gene não é suficiente para produzir um bom candidato a vacina. O único meio de determinar se uma proteína é reconhecida pelo sistema imune durante a infecção latente com *M. tuberculosis* é produzir a proteína dada e testá-la em um ensaio apropriado como aqui descrito. Várias proteínas são de importância particular e possuem potencial para serem antígenos tardios (antígenos reconhecidos durante a infecção latente) visto que eles são principalmente expressos durante um tempo relativamente longo após infecção onde o sistema imune monta a primeira defesa adaptável e o meio ambiente se torna mais hostil para as micobactérias. As condições de cultura hipóxica in vitro, que imitam as condições de tensão de oxigênio baixa, foram anteriormente sugeridas como relevante a este respeito e foram usadas para analisar as mudanças na expressão genética. Vários antígenos foram observados que são induzidos ou marcadamente

supra-regulados sob estas condições, por exemplo, o antígeno α -cristalino 16 kDa (Sherman 2001), Rv2660c e Rv2659c (Betts, 2002). (nossa próprio pedido) Outros estímulos ambientais que podem ser de interesse particular é a inanição designada para considerar que os nutrientes são restritos no granuloma (o local da infecção latente) e que os produtos expressos por genes supra-regulados sob inanição portanto podem ser de interesse particular como alvos antígenos durante o estágio latente de infecção.

Dos mais que 200 centenas de antígenos conhecidos de serem expressos durante a infecção primária, e testados como vacinas, menos do que uma meia dúzia têm demonstrado potencial significativo. Até agora apenas um antígeno foi mostrado de ter qualquer potencial como uma vacina terapêutica (Lowrie, 1999). Entretanto, esta vacina somente opera se administrada como uma vacina de DNA e tem se mostrado controverso, com outros grupos que reivindicam que a vacinação usando este protocolo induz a proteção não específica ou ainda piora a doença (Turner, 2000). Ao contrário, os polipeptídeos de fusão descritos na invenção podem ser incorporados em uma vacina que usa a tecnologia de vacinação bem-reconhecida, como demonstrado nos exemplos fornecidos.

Além disso, visto que as vacinas de TB não resultam na esterilização da imunidade, mas de preferência controlam a infecção em um nível subclínico (desse modo resultando no subsequente estabelecimento de infecção latente), uma vacina de múltiplas fases que combina componentes com atividade profilática e terapêutica é descrita nesta invenção. Após a vacinação profilática convencional, a evasão da resposta imune primária e o subsequente desenvolvimento de doença latente é provavelmente pelo menos em parte devido à mudança no perfil antigênico das bactérias invasoras. Assim, a vacinação com antígenos associada com a TB latente deve impedir ou reduzir o estabelecimento de infecção latente e, portanto, uma vacina que incorpora antígenos expressos pelas bactérias tanto na primeira fase de crescimento logarítmico quanto durante a doença latente deve melhorar a imunidade a longo prazo quando usada como uma vacina profilática. Uma tal vacina de múltiplas fases obviamente também será eficiente como uma va-

cina terapêutica, desse modo tratando o problema de que a maioria da população no terceiro mundo que receberia uma vacina de TB futura já estaria latentemente infectada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 A invenção é relacionada a uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica para a prevenção (incluindo vacinação reforçadora e vacinas de múltiplas fases) e/ou tratamento de infecção causada por uma espécie do complexo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* etc.), a composição imunogênica, a vacina ou a composição 10 farmacêutica compreendendo antígeno induzido por inanição ou um polipeptídeo de fusão que compreende um ou mais antígenos de *M. tuberculosis* induzidos por inanição, as unidades do polipeptídeo de fusão sendo antígenos de *M. tuberculosis*. Da mesma forma, a invenção se refere aos polipeptídeos de fusão como tais e a uma seqüência de ácido nucléico que codifica 15 um tal polipeptídeo de fusão. Além disso, a invenção se refere ao uso de peptídeo(s) de superposição ou não superposição curtos ou longos produzido(s) sinteticamente ou recombinante(s). Além disso, a invenção diz respeito ao uso de antígeno induzido por inanição ou uma seqüência de polipeptídeo de fusão ou seqüência de ácido nucléico da invenção para a preparação de 20 dita composição imunogênica, vacina, ou composição farmacêutica e a vacina ou composição farmacêutica produzida desta maneira. Ademais, a invenção diz respeito ao uso de uma vacina que compreende um antígeno induzido por inanição ou uma seqüência de polipeptídeo de fusão ou seqüência de ácido nucléico da invenção dada ao mesmo tempo como BCG, ou misturada 25 com BCG ou administrada separadamente em diferentes sítios ou vias para a preparação de dita composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica. Ainda a invenção se refere ao uso de uma vacina compreendendo um antígeno induzido por inanição ou uma seqüência de polipeptídeo de fusão ou seqüência de ácido nucléico fornecida como um reforçador de 30 BCG. Além disso, mediante a inclusão de antígenos que são expressos tanto no início quanto no fim durante uma infecção natural a vacina levará a uma resposta imune de duas etapas possibilitando que o sistema imune

combata o agente patológico com qualquer dos epítopos que sejam os mais eficientes em um certo ponto de tempo inclusive durante a latência.

DESCRICAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve composições imunogênicas, uma vacina ou uma composição farmacêutica que compreende um antígeno induzido por inanição ou um polipeptídeo de fusão compreendendo um ou mais antígenos induzidos por inanição.

As seqüências de aminoácido e ácido nucléico destes antígenos induzidos por inanição (mais do que 6,5 vezes supra-reguladas durante a inanição ou geneticamente ligadas à um gene induzido por inanição) aparecem da listagem de seqüência como se segue:

Antígeno induzido por inanição	DNA SEQ ID NO	aa SEQ ID NO
Rv2655	1	2
Rv2656	3	4
Rv2657	5	6
Rv2658	7	8
Rv2659c	9	10
Rv2660c	11	12
Rv2661	13	14
Rv2662	15	16
Rv2663	17	18
Rv0188	19	20
Rv3290c	21	22
Rv3289c	23	24
Rv2034	25	26
Rv2169c	27	28
Rv0116c	29	30
Rv2558	31	32
Rv1152	33	34
Rv3291c	35	36
Rv1284	37	38
Rv1954c	39	40
Rv3810	41	42
Rv2517c	43	44

Antígeno induzido por inanição	DNA SEQ ID NO	aa SEQ ID NO
Rv3288c	45	46
Rv0789c	47	48
Rv1955	49	50
Rv3735	51	52
Rv3675	53	54
Rv2270	55	56
Rv2050	57	58
Rv3287c	59	60
Rv2557	61	62
Rv0122	63	64
Rv2497c	65	66
Rv1250	67	68
Rv1552	69	70
Rv2526	71	72
Rv1809	73	74
Rv0918	75	76
Rv0516c	77	78
Rv2745c	79	80
Rv1472	81	82
Rv1660	83	84
Rv2302	85	86

No presente contexto o polipeptídeo imunogênico individual com base em polipeptídeos derivados de *M. tuberculosis* é denominado uma "unidade" do polipeptídeo de fusão. A fusão pode compreender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mesmo 10 unidades diferentes.

5 A ordem das unidades do polipeptídeo de fusão pode ser qualquer combinação. Em termos de ordem, os polipeptídeos de fusão de todos os抗ígenos acima em qualquer combinação estão dentro do escopo da presente invenção. Os polipeptídeos de fusão da invenção são úteis para a preparação de uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica, em particular uma vacina de reforço de BCG, como será descrito com detalhe no que segue.

10

As unidades de preparação dos polipeptídeos preferidos dos

polipeptídeos de fusão juntamente com os polipeptídeos de inanição possuem o seguinte número de identidade Sanger e seqüências de aminoácido:

Nome comum	ID Sanger
ESAT6	Rv3875
TB10.4	Rv0288
Ag85A	Rv3804c
Ag85B	Rv1886c
ORF2c	Rv3871 (c-terminal)
TB13.0	Rv1036
TB9.56	Rv0285
TB9.8	Rv0287

Polipeptídeo	Seqüência de aminoácido
ESAT6	MTEQQWNFAG IEAAASAIQG NVTSIHSLLD EGKQSLT-KLA AAWGGSGSEA YQGVQQKWDA TATELNNALQ N-LARTISEAG QAMASTEGNV TGMFA
Ag85A	SRGPLP VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLT-SELPG WLQANRHVKP TGSAVVGLSM AASSALTIAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPHQ AMGPTLIGLA MG-DAGGYKAS DMWGPKEQPA WQRNDPLLNV GKLIANN-TRV WVYCGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQ-DAYNAG GGHNGVFDFP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA
Ag85B	SRPGLPVEY LQVPSPSMGR DIKVQFQSGG NNSPAVYLLD GLRAQDDYNG WDINTPAFEW YYQSGLSIVM PVGGQSSFYD DWYSPACGKA GCQTYKWETF LT-SELPQWLS ANRAVKPTGS AAIGLSMAGS SAMILAAYHP QQFIYAGSLS ALLDPSQGMG PSLIGLAMGD AGGYKA-ADMW GPSSDPAWER NDPTQQIPKL VANNTRLWVY CGNGTPNELG GANIPAEFLE NFVRSSNLKF QDAYNA-AGGH NAVFNFPNG THSWEYWGAQ LNAMKGDLQS SLGAG
TB10.4	MSQIMYNYPA MLGHAGDMAG YAGTLQLSLGA EIAVEQA-ALQ SAWQGDTGIT YQAWQAQWNQ AMEDLVRAYH AMSSTHEANT MAMMARDTAE AAKWGG

Polipeptídeo	Seqüência de aminoácido
ORF2c	MIVGAAGGMP PMAPLAPLLP AAADIGLHII VTCQMS-QAYK ATMDKFGVGA FGSGAPTMFL SGEKQEFPSS EFKVKRRPPG QAFLVSPDGK VIQAPYIEPP EEVFAAPP-SA G
Rv1036	LIPGRMVNLW EDGLNALVAE GIEAIVFRTL GDQCWL-WESL LPDEVRRLP E LARVDALLD DPAFFAPFVP FFD-PRRGRPS TPMEVYLQLM FVKFRYRLGY ESLCREVADS IT
Rv0285	MTLRVVPEGL AAASAAVEAL TARLAAAHAS AAPVITAVVP PAADPVSLQT AAGFSAQGVE HAVVTAEGVE ELGRAGVGVG ESGASYLAGD AAAAATYGVV GG
Rv0287	MSLLDAHIPQ LVASQSAFAA KAGLMRHTIG QAEQAAM-SAQ AFHQGESSAA FQAAHARFVA AAAKVNTLLD VA-QANLGEAA GTYVAADAAA ASTYTGF

As combinações preferidas de polipeptídeos de fusão compreendem os seguintes polipeptídeos em várias combinações em ordem de unidades com um ou mais antígenos induzidos por inanição (X): ESAT6-Ag85A-X, ESAT6-Ag85B-X, Ag8A-X, Ag85B-X, TB10-Ag85A-X, TB10-5 Ag85B-X onde X é qualquer um dos antígenos induzidos por inanição e onde a ordem das unidades de antígenos pode ser de qualquer combinação, por exemplo, onde a ordem for invertida ou X é posicionado no centro etc.

10 Mas o polipeptídeo de fusão pode ser construído de qualquer outra combinação de um ou mais antígeno induzido por inanição com um ou mais antígeno de *M. tuberculosis*.

Dentro do escopo da presente invenção está um análogo de um polipeptídeo de fusão que possui uma seqüência de aminoácido com uma identidade de seqüência de pelo menos 80 % de qualquer parte de qualquer um dos polipeptídeos de fusão da invenção e que é imunigênico, e uma seqüência de ácido nucléico que codifica tal polipeptídeos. Tais análogos estão compreendidos dentro do termo "polipeptídeo da invenção" ou "polipeptídeo de fusão da invenção" cujos termos são usados de modo trocável em todo o relatório descritivo e reivindicações. Pelo termo "seqüência de ácido nucléico da invenção" significa uma seqüência de ácido nucléico que codifica um tal polipeptídeo. Ainda dentro do escopo da presente invenção estão os peptí-20

deos curtos ou longos de superposição ou não superposição que possui uma seqüência de aminoácido com uma identidade de seqüência de pelo menos 80 % a qualquer um dos polipeptídeos de fusão da invenção e que é imunogênico.

5 Uma modalidade atualmente preferida da invenção é uma vacina para reforçar a imunidade da vacinação de BCG anterior, isto é, vacina é administrada aos indivíduos anteriormente vacinados com BCG.

Este primeiro aspecto da invenção compreende uma variante do antígeno induzido por inanição ou polipeptídeo de fusão mencionado acima
10 que é submetido a lipídeo de modo a deixar um efeito auto-ajudante do polipeptídeo.

15 A composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica da invenção pode ser administrada pela liberação mucosal, por exemplo, oral, nasal, bucal, ou tradicionalmente intramuscular, intradérmica, por injeção subcutânea ou transdermicamente ou qualquer outra via adequada, por exemplo, retalmente.

20 Em uma outra modalidade, a invenção descreve o uso de um antígeno induzido por inanição ou um polipeptídeo de fusão como definido acima para a preparação de uma composição imunogênica, vacina o composição farmacêutica que pode ser usada para uma vacinação profilática juntamente com BCG, uma vacina reforçadora ou vacinação terapêutica contra uma infecção causada por uma micobactéria virulenta, por exemplo, por *Micobacterium tuberculosis*, *Micobacterium africanum*, *Micobacterium bovis*, *Micobacterium lepra* ou *Micobacterium ulcerans*.

25 Em um segundo aspecto, a invenção descreve uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica que compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica um antígeno induzido por inanição ou um polipeptídeo de fusão como definido acima, ou compreende uma seqüência de ácido nucléico complementar a esta que é capaz de hibridizar
30 com a seqüência de ácido nucléico da invenção sob condições severas.

 O fragmento de ácido nucléico é preferivelmente um fragmento de DNA. O fragmento pode ser usado como um produto farmacêutico como

debatido no que se segue.

Em uma modalidade, a invenção descreve uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica que compreende um fragmento de ácido nucléico de acordo com a invenção, opcionalmente inserido em um vetor. A expressão *in vivo* resultante da vacina de antígeno por um animal, incluindo um ser humano, a quem a vacina foi administrada, a quantidade de antígeno expresso sendo eficaz para conferir resistência substancialmente aumentada à tuberculose causada por micobactérias virulentas, por exemplo, *Micobacterium tuberculosis*, *Micobacterium africanum*, *Micobacterium bovis*, *Micobacterium lepra* ou *Micobacterium ulcerans*, em um animal, incluindo um ser humano.

Em uma outra modalidade, a invenção apresenta o uso de uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica que compreende um fragmento de ácido nucléico de acordo com a invenção para a vacinação terapêutica contra a tuberculose causada por uma micobactéria virulenta.

Em mais uma outra modalidade, a invenção descreve uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica que pode ser usada para a vacinação profilática juntamente com BCG ou como uma vacina reforçadora à uma pessoa anteriormente vacinada com BCG para imunização de um animal, incluindo um ser humano, contra a tuberculose causada por uma micobactéria virulenta, por exemplo, *Micobacterium tuberculosis*, *Micobacterium africanum*, *Micobacterium bovis*, *Micobacterium lepra* ou *Micobacterium ulcerans*, compreendendo como o componente eficaz um microorganismo não-patogênico, tal como vacínia, adenovírus ou *Micobacterium bovis* BCG, em que pelo menos uma cópia de um fragmento de DNA compreendendo uma seqüência de DNA que codifica um polipeptídeo de fusão como definido acima foi incorporado no microorganismo (por exemplo, colocado em um plasmídeo ou no genoma) em uma maneira que permite o microorganismo se expressar e opcionalmente secretar o polipeptídeo de fusão.

Em uma outra modalidade, a invenção descreve um vetor de

expressão infeccioso, tal como vacínia, adenovírus ou *Micobacterium bovis* BCG que compreende um fragmento de ácido nucléico de acordo com a invenção, e uma célula transformada que abriga pelo menos um tal vetor.

Em um terceiro aspecto, a invenção apresenta um método para 5 a imunização e reforço da imunidade de um animal, incluindo um ser humano, contra a tuberculose causada por micobactérias virulentas, por exemplo, *Micobacterium tuberculosis*, *Micobacterium africanum*, *Micobacterium bovis*, *Micobacterium lepra* ou *Micobacterium ulcerans*, o método compreendendo a administração ao animal do polipeptídeo de fusão como definido acima, a 10 composição imunogênica de acordo com a invenção, ou a vacina de acordo com a invenção.

Em um quarto aspecto, a invenção descreve um método para o tratamento de um animal, incluindo um ser humano, tendo tuberculose, ativa ou latente, causada por micobactérias virulentas, por exemplo, por *Micobacterium tuberculosis*, *Micobacterium africanum*, *Micobacterium bovis*, *Micobacterium lepra* ou *Micobacterium ulcerans*, o método compreendendo a administração ao animal da composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica como definido acima.

Em um quinto aspecto, a invenção apresenta o uso de um antígeno induzido por inanição ou um polipeptídeo de fusão ou um fragmento de ácido nucléico como definido acima para a preparação de uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica em combinação com *M. bovis* BCG, por exemplo, para uma vacinação profilática (incluindo reforço) ou terapêutica contra uma infecção causada por uma micobactéria virulenta, 25 por exemplo, por *Micobacterium tuberculosis*, *Micobacterium africanum*, *Micobacterium bovis*, *Micobacterium lepra* ou *Micobacterium ulcerans*.

A vacina, composição imunogênica, vacina e composição farmacêutica de acordo com a invenção podem ser usadas profilaticamente em um indivíduo não-infectado com uma micobactéria virulenta ou em um indivíduo anteriormente vacinado com *M. tuberculosis* BCG ou terapeuticamente 30 em um indivíduo infectado com uma micobactéria virulenta.

Deve ficar entendido que as modalidades do primeiro aspecto da

invenção, tais como os polipeptídeos imunogênicos descritos, também se aplicam a todos os outros aspectos da invenção; e vice versa.

Em todo este relatório descritivo, a não ser que o contexto requeira de outra maneira, a palavra "compreendem" ou suas variações tais 5 como "compreende" ou "compreendendo", será compreendido por implicar a inclusão de um elemento determinado ou a inteireza ou grupo de elementos ou todos.

DEFINIÇÕES

Inanição

10 Pelo termo "inanição" é compreendido privar um organismo de sua fonte de carbono, nitrogênio ou energia, qualquer combinação do acima ou mesmo todos eles.

Proteínas induzidas por inanição

15 Pelo termo "proteínas induzidas por inanição" é compreendido qualquer proteína que no nível transcricional ou de proteína é induzida (aumentada) pelo menos 6,5 vezes após estressar as micobactérias por inanição.

Combinação com M. bovis BCG

20 Pelo termo "combinação com M. bovis BCG" é compreendido a co-administração com qualquer cepa de M. bovis BCG incluindo, Pasteur, Phipps, Frappier, Connaught, Tice, Denmark, Glaxo, Prague, Birkhaug, Sweden, Japan, Moreau e Rússia em quantidades que leva a uma resposta imune específica aumentada significativa ou a uma proteção significativa em um modelo animal ou um ser humano juntamente com um ou mais dos polipeptídeos de fusão definidos acima ou com um ou mais dos fragmentos de ácido nucléico que os codificam, ou administrados ao mesmo tempo, mas em sítios ou vias separadas.

Reforço de M. bovis BCG

30 Pelo termo "reforço de M. bovis BCG" é compreendido a administração de um ou mais polipeptídeos de fusão como definido acima ou um ou mais fragmentos de ácido nucléico que os codificam em qualquer período após a vacinação com qualquer cepa de M. bovis BCG incluindo, Pasteur,

Phipps, Frappier, Connaught, Tice, Denmark, Glaxo, Prague, Birkhaug, Sweden, Japan, Moreau e Rússia em quantidades que levam a uma resposta imune específica significativamente aumentada ou uma proteção significativamente aumentada em um modelo animal ou um ser humano.

5 **Polipeptídeo**

Um polipeptídeo preferido a ser usado como uma unidade dos polipeptídeos de fusão da presente invenção é um polipeptídeo imunogênico de *M. tuberculosis*. Tal polipeptídeo pode, por exemplo, ser basado em um polipeptídeo derivado da célula de *M. tuberculosis* e/ou filtrado da cultura de *M. tuberculosis*. O polipeptídeo normalmente será um polipeptídeo recombinante ou sintético e pode consistir do polipeptídeo imunogênico, uma parte imunogênica deste ou pode conter seqüências adicionais. As seqüências adicionais podem ser derivadas do antígeno de *M. tuberculosis* nativo ou ser heterólogas e tais seqüências podem, mas não necessitam, ser imunogênicas.

Pelo termo "polipeptídeo de fusão" é entendido uma ordem aleatória de dois ou mais polipeptídeos imunogênicos de *M. tuberculosis* ou seus análogos fundidos juntamente com ou sem um espaçador de aminoácido de comprimento e seqüência abritárias.

20 A palavra "polipeptídeo" na presente invenção deve ter seu significado costumeiro. Isto é, uma cadeia de aminoácido de qualquer comprimento, incluindo uma proteína de comprimento total, oligopeptídeo, peptídeo curto e fragmento destes e polipeptídeo de fusão, em que os resíduos de aminoácido são ligados pelas ligações de peptídeo covalentes.

25 O polipeptídeo pode ser quimicamente modificado por ser glicosilado, por ser submetido a lipídeo (por exemplo, lipidação química com succinimida de palmitoilóxi como descrito por Mowat et al. 1991 ou com cloreto de dodecanoíla como descrito por Lustig et al. 1976), por compreender grupos protéticos, ou por conter aminoácidos adicionais tais como, por exemplo, um his-tag ou um peptídeo de sinal.

Cada polipeptídeo imunogênico será caracterizado por aminoácidos específicos e será codificado por seqüências de ácido nucléico especí-

ficas. Dentro do escopo da presente invenção são tais seqüências e análogos e variantes produzidas por métodos recombinantes ou sintéticos em que tais seqüências de polipeptídeo foram modificadas pela substituição, inserção, adição ou anulação de um ou mais resíduos de aminoácido no polipeptídeo recombinante enquanto ainda são imunogênicas em qualquer um dos ensaios biológicos aqui descritos.

As substituições são preferivelmente "conservativas". Estas são definidas de acordo com a seguinte tabela. Os aminoácidos no mesmo bloco na segunda coluna e preferivelmente na mesma linha na terceira coluna podem ser substituídos um com o outro. Os aminoácidos na terceira coluna são indicados em código de uma letra.

ALIFÁTICO	Não polar	GAP
		ILV
		CSTM
	Polar-não carregado	NQ
		DE
	Polar-carregado	KR
AROMÁTICO		HFWY

Cada polipeptídeo é codificado por uma seqüência de ácido nucléico específica. Dentro do escopo da presente invenção estão os análogos e tais seqüências de ácido nucléico que foram modificadas por substituição, inserção, adição ou anulação de um ou mais ácidos nucléicos. As substituições são preferivelmente substituições silenciosas no uso de códon que não levarão a qualquer mudança na seqüência de aminoácido, mas podem ser introduzidas para intensificar a expressão da proteína.

Fragmento de ácido nucléico

Pelos termos "fragmento de ácido nucléico" e "seqüência de ácido nucléico" são entendidos qualquer molécula de ácido nucléico incluindo DNA, RNA, LNA (ácidos nucléicos bloqueados), PNA, RNA, dsRNA e RNA-DNA-híbridos. Também incluídos estão as moléculas de ácido nucléico compreendendo nucleosídeos de ocorrência não-natural. O termo inclui moléculas de ácido nucléico de qualquer comprimento, por exemplo, de 10 a 10000 nucleotídeos, dependendo do uso. Quando a molécula de ácido nu-

- cléico for para uso como um produto farmacêutico, por exemplo, na terapia de DNA, ou para uso em um método para a produção de um polipeptídeo de acordo com a invenção, uma molécula que codifica pelo menos um epítopo é preferivelmente usado, tendo um comprimento de cerca de 18 a cerca de 5 1000 nucleotídeos, a molécula sendo opcionalmente inserida dentro de um vetor. Quando a molécula de ácido nucléico for usada como uma sonda, como um iniciador ou na terpaia anti-sentido, uma molécula tendo um comprimento de 10 a 100 é preferivelmente usada. De acordo com a invenção, outros comprimentos de molécula podem ser usados, por exemplo, uma molécula tendo pelo menos 12, 15, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 50, 60, 70, 80, 10 90, 100, 200, 300, 400, 500 ou 1000 nucleotídeos (ou derivados de nucleotídeo), ou uma molécula tendo no máximo 10000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30 ou 20 nucleotídeos (ou derivados de nucleotídeo).
- 15 O termo "severo" quando usado em conjunto com as condições de hibridização é como definido na técnica, isto é, a hibridização é executada em uma temperatura de não mais do que 15-20 °C sob o ponto de fusão Tm, cf. Sambrook et al, 1989, pages 11.45-11.49. Preferivelmente, as condições são "altamente severas", isto é, 5-10 °C sob o ponto de fusão Tm.
- 20 Identidade de seqüência
- O termo "identidade de seqüência" indica a medida quantitativa do grau de homologia entre duas seqüências de aminoácido de comprimento substancialmente igual ou entre duas seqüências de ácido nucléico de comprimento substancialmente igual. As duas seqüências a serem comparadas devem estar alinhadas no melhor ajuste possível com a inserção de aberturas ou alternativamente, mutilação nas extremidades das seqüências de proteína. A identidade de seqüência pode se calculada como $\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$, em que 25 N_{dif} é o número total de resíduos não idênticos nas duas seqüências quando alinhadas e em que N_{ref} é o número de resíduos em uma das seqüências.
- 30 Em consequência, a seqüência de DNA AGTCAGTC terá uma identidade de seqüência de 75 % com a seqüência AATCAATC ($N_{dif} = 2$ and $N_{ref} = 8$). Uma abertura é contada como sem identidade do(s) resíduo(s) específico(s), isto

é, a seqüência de DNA AGTGTC terá uma identidade de seqüência de 75 % com a seqüência de DNA AGTCAGTC ($N_{dif} = 2$ e $N_{ref} = 8$). A identidade de seqüência pode ser alternativamente calculada pelo programa BLAST, por exemplo, o programa BLASTP (Pearson W.R and D.J. Lipman 5 (1988))(www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). Em uma modalidade da invenção, o alinhamento é executado com o método de alinhamento de seqüência ClustalW com parâmetros de ausência como descrito por Thompson J., et al 1994, disponível na <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>.

Uma porcentagem mínima preferida de identidade de seqüência 10 é de pelo menos 80 %, tal como pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, pelo menos 99 % e pelo menos 99,5 %. Preferivelmente, os números de substituições, inserções, adições ou anulações de um ou mais resíduos de aminoácido 15 no polipeptídeo de fusão são limitados, isto é, não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 substituições, não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 inserções, não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 adições, e não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 anulações comparadas com as unidades de polipeptídeo imunogênico com base nos polipeptídeos derivados de *M. tuberculosis*. 20

Parte imunogênica

O polipeptídeo da invenção compreende uma parte imunogênica, tal como um epítopo para uma célula B ou célula T.

A parte imunogênica de um polipeptídeo imunogênico é a parte do 25 polipeptídeo, que extrai uma resposta imune em um animal ou um ser humano, e/ou em uma amostra biológica determinada por qualquer um dos ensaios biológicos aqui descrito. A parte imunogênica de um polipeptídeo pode ser um epítopo de célula T ou um epítopo de célula B. As partes imunogênicas podem ser relacionadas com uma ou algumas partes relativamente 30 pequenas do polipeptídeo, elas podem ser dispersas através da seqüência de polipeptídeo ou estar situadas em partes específicas do polipeptídeo. Para alguns polipeptídeos, os epítopos foram ainda demonstrados serem

dispersos através do polipeptídeo que cobre a seqüência total (Ravn et al 1999).

De modo a identificar os epítópos de célula T relevantes que são reconhecidos durante uma resposta imune, é possível utilizar um método de "força bruta": Visto que os epítópos de célula T são lineares, os mutantes de anulação do polipeptídeo, se construídos sistematicamente, revelarão que as regiões do polipeptídeo são essenciais no reconhecimento imune, por exemplo, mediante a sujeição destes mutantes de anulação, por exemplo, ao ensaio INF-(aqui descrito. Um outro método utiliza a superposição de oligopeptídeos para a detecção de epítópos MHC classe II, preferivelmente sintéticos, tendo um comprimento de, por exemplo, 20 resíduos de aminoácido derivados do polipeptídeo. Estes peptídeos podem ser testados nos ensaios biológicos (por exemplo, o ensaio IFN-(como aqui descrito) e alguns destes fornecerão uma resposta positiva (e desse modo ser imunogênico) como evidência da presença de um epítópo de célula T no peptídeo. Para a detecção de epítópos MHC classe I é possível prognosticar peptídeos que se ligarão (Stryhn et al. 1996) e mais adiante produzir estes peptídeos sinteticamente e testá-los em ensaios biológicos relevantes, por exemplo, o ensaio IFN-(como aqui descrito. Os peptídeos preferivelmente tendo um comprimento de, por exemplo, 8 a 11 resíduos de aminoácido derivados do polipeptídeo. Os epítópos de célula B podem ser determinados mediante a análise do reconhecimento da célula B dos peptídeos de superposição que cobrem o polipeptídeo de interesse como, por exemplo, descrito em Harboe et al 1998.

As partes imunogênicas de polipeptídeos podem ser reconhecidas por uma parte ampla (alta freqüência) ou por uma parte menor (freqüência baixa) da população humana geneticamente heterogênica. Além disso, as partes imunogênicas induzem as respostas imunológicas elevadas (dominante), enquanto outras induzem respostas mais baixas, mas ainda significativas (subdominante). A freqüência elevada><freqüência baixa podem ser relacionadas na parte imunogênica que se liga às moléculas MHC amplamente distribuídas (tipo HLA) ou ainda por múltiplas moléculas MHC (Kil-

gus et al. 1991, Sinigaglia et al 1998).

Análogos

Um aspecto comum dos polipeptídeos de fusão da invenção é sua capacidade de induzir uma resposta imunológica como ilustrado nos 5 exemplos. Fica entendido que dentro do escopo da presente invenção estão os análogos de um polipeptídeo de fusão da invenção produzido por substituição, inserção, adição ou anulação que é também imunogênico determinado por qualquer um dos ensaios aqui descritos.

Substancialmente puro

10 No presente contexto o termo "polipeptídeo substancialmente puro" significa uma preparação de polipeptídeo que contém no máximo 5 % e peso do outro material de polipeptídeo com o qual é associado naturalmente ou durante a produção recombinante ou sintética (porcentagens inferiores de outro material de polipeptídeo são preferidas, por exemplo, no máximo 4 %, no máximo 3 %, no máximo 2 %, no máximo 1 %, e no máximo ½ %). É preferível que o polipeptídeo substancialmente puro é pelo menos 96 % puro, isto é, que o polipeptídeo constitui pelo menos 96 % em peso de material de polipeptídeo total presente na preparação, e as porcentagens mais elevadas são preferidas, tais como pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, pelo menos 99 %, pelo menos 99,25 %, pelo menos 99,5 %, e pelo menos 99,75 %. É especialmente preferível que o polipeptídeo esteja na "forma essencialmente pura", isto é, que o polipeptídeo seja essencialmente livre de qualquer outro antígeno com o qual é naturalmente associado, isto é, livre de qualquer outro antígeno de bactérias que pertencem ao complexo de tuberculose ou uma micobactéria virulenta. Isto pode ser efetuado mediante a preparação do polipeptídeo por meio de métodos recombinantes em uma célula hospedeira não micobacteriana como será descrito com detalhes abaixo, ou mediante a sintetização do polipeptídeo pelos métodos bem-conhecidos de síntese de peptídeo de fase sólida ou líquida, por exemplo, 20 pelo método descrito por Merrifield ou suas variações, e mediante o uso de procedimentos de purificação apropriados bem-conhecidos do versado na técnica.

25

30

Micobactéria virulenta, indivíduo correntemente infectado e indivíduo imune

Pelo termo "micobactéria virulenta" é compreendido uma bactéria capaz de causar a doença de tuberculose em um animal ou em um ser humano. Exemplos de micobactérias virulentas são *Micobacterium tuberculosis*, *Micobacterium africanum*, *Micobacterium bovis*, *Micobacterium leprae* ou *Micobacterium ulcerans*. Exemplos de animais relevantes são gado, gambás, texugos, búfalos, leões, *kurus* e cangurus.

Por "um animal ou ser humano correntemente infectado com uma micobactéria virulenta" é entendido um indivíduo com cultura ou infecção microscopicamente provada com micobactérias virulentas, e/ou um indivíduo clinicamente diagnosticado com TB e que é responsivo à quimioterapia anti-TB. Cultura, microscopia e diagnóstico clínico de TB são bem-conhecidos por qualquer pessoa versada na técnica.

Um indivíduo imune é definido como uma pessoa ou um animal, que tem purificado ou controlado uma infecção com uma micobactéria virulenta ou tem recebido uma vacinação com *M. bovis* BCG.

Imunogênico

Um polipeptídeo imunogênico é definido como um polipeptídeo que induz uma resposta imune. A resposta imune pode ser monitorada por 20 um dos seguintes métodos:

Uma resposta celular in vitro é determinada pela liberação de uma citocina relevante tal como IFN- γ , de linfócitos retirados de um animal ou ser humano corrente ou anteriormente infectado com micobactérias virulentas, ou pela detecção da proliferação destas células T. A indução é executada pela adição do polipeptídeo ou a parte imunogênica em uma suspensão compreendendo de 1 x 10⁵ células a 3 x 10⁵ células per cavidade. As células são isoladas do sangue, do baço, do fígado ou do pulmão e a adição do polipeptídeo ou da parte imunogênica do polipeptídeo resulta em uma concentração de não mais do que 20 μ g per ml de suspensão) e o estímulo é efetuado a partir de dois a cinco dias. Para o monitoramento da proliferação celular as células são pulsadas com Thymidine rotulado radioativo e após 16 a 22 horas de incubação a proliferação é detectada pela contagem de cinti-

lação líquida. Uma resposta positiva é uma resposta mais do que fundamental acrescida de dois desvios padrão. A liberação de IFN-(pode ser determinada pelo método ELISA, que é bem-conhecido a uma pessoa versada na técnica. Uma resposta positiva é uma resposta mais do que fundamental 5 acrescida de dois desvios padrão. Outras citocinas que não IFN-(podem ser relevantes quando se monitora uma resposta imunológica para o polipeptídeo, tal como IL-12, TNF-(, IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF-(. Um outro e mais sensível método para determinar a presença de uma citocina (por exemplo, INF-() é o método ELISPOT onde as células isoladas do sangue, do fígado 10 ou do pulmão são diluídas para uma concentração preferível de 1 a 4 x 10⁶ células /ml e incubadas durante 18 a 22 h na presença do polipeptídeo ou da parte imunogênica do polipeptídeos resultando em uma concentração de não mais do que 20 g per ml. As suspensões celulares são mais adiante diluídas em 1 a 2 x 10⁶/ ml e transferidas para placas Maxisorp revestidas 15 com anti-IFN-(e incubadas durante preferivelmente de 4 a 16 horas. As células produtoras de IFN-(são determinadas pelo uso de anticorpo anti-IFN secundário rotulado e um substrato relevante dando origem aos pontos, que podem ser enumerados usando um microscópio de dissecação. É também uma possibilidade determinar a presença de mRNA que codifica a citocina 20 relevante mediante o uso da técnica de PCR. Geralmente, uma ou mais citocinas serão medidas utilizando, por exemplo, a PCR, ELISPOT ou ELISA. Será observado por uma pessoa versada na técnica que um aumento ou diminuição significativa na quantidade de qualquer uma destas citocinas induzidas por um polipeptídeo específico pode ser usada na avaliação da atividade imunológica do polipeptídeo.

Uma resposta celular in vitro pode também ser determinada pelo uso de linhagens celulares T derivadas de um indivíduo imune ou uma pessoa infectada por *M. tuberculosis* onde as linhagens celulares T foram conduzidas com micobactérias vivas, extratos da célula bacteriana ou filtrado de 30 cultura durante 10 a 20 dias com a adição de IL-2. A indução é executada pela adição de não mais do que 20 g de polipeptídeo per ml de suspensão nas linhagens celulares T contendo de 1 x 10⁵ células a 3 x 10⁵ células per

cavidade e a incubação é executada de dois a seis dias. A indução de IFN-(ou liberação de uma outra citocina relevante é detectada por ELISA. O estímulo das células T podem também ser monitoradas pela detecção da proliferação celular usando Thymidine radioativamente rotulado como descrito acima. Para ambos os ensaios uma resposta positiva é uma resposta mais do que fundamental acrescida de dois desvios padrão.

Uma resposta celular in vivo pode ser determinada como uma resposta DTH positiva após a injeção intradérmica ou emplastro de aplicação local de no máximo 100 g do polipeptídeo ou da parte imunogênica a um indivíduo que é clínica ou subclinicamente infectado com uma Micobactéria virulenta, uma resposta positiva tendo um diâmetro de pelo menos 5 mm 72 a 96 horas após a injeção ou aplicação.

Uma resposta humoral é determinada por uma resposta de anticorpo específica em um indivíduo imune ou infectado. A presença de anticorpos pode ser determinada por uma técnica de ELISA ou um Western blot onde o polipeptídeo ou a parte imunogênica é absorvida em uma membrana de microcelulose ou uma superfície de poliestireno. O soro é preferivelmente diluído em PBS de 1:10 a 1:100 e adicionado ao polipeptídeo absorvido e a incubação sendo executada de 1 a 12 horas. Mediante o uso de anticorpos secundários rotulados a presença de anticorpos específicos pode ser determinada pela medição da presença ou ausência de um rótulo específico, por exemplo, por ELISA onde uma resposta positiva é uma resposta de mais do que fundamental acrescido de dois desvios padrão ou alternativamente uma resposta visual em um Western blot.

Um outro parâmetro relevante é a medição da proteção em modelos animais induzidos após a vacina com o polipeptídeo em um adjuvante ou após a vacinação de DNA. Os modelos animais adequados incluem primatas, proquinhos-da-índia ou camundongos, que são provocados com uma infecção de uma Micobactéria virulenta. A leitura da proteção induzida pode ser a diminuição da carga bacteriana nos órgãos alvos comparada com animais não-vacinados, tempos de sobrevivência prolongados comparados com os animais não-vacinados e perda de peso reduzida ou patologia comparada

com animais não-vacinados.

Métodos de preparação

Em geral os polipeptídeos de fusão da invenção, e as seqüências de DNA que codificam tais polipeptídeos de fusão, podem ser preparados mediante o uso de qualquer um de uma variedade de procedimentos.

O polipeptídeo de fusão pode ser produzido recombinantemente usando uma seqüência de DNA que codifica o polipeptídeo, que foi inserido em um vetor de expressão e expresso em um hospedeiro apropriado. Exemplos de células hospedeiras são *E. coli*. Os polipeptídeos de fusão podem também ser produzidos sinteticamente tendo menos do que cerca de 100 aminoácidos, e geralmente menos do que 50 aminoácidos e podem ser gerados usando técnicas bem-conhecidas por aqueles versados na técnica, tais como as técnicas de fase sólida comercialmente disponíveis onde os aminoácidos são seqüencialmente adicionados a uma cadeia de aminoácido em desenvolvimento.

Os polipeptídeos de fusão podem também ser produzidos com um par de fusão adicional, em cujos métodos as características superiores do polipeptídeo da invenção podem ser alcançadas. Por exemplo, os pares de fusão que facilitam a exportação do polipeptídeo quando produzido recombinantemente, os pares de fusão que facilitam a purificação do polipeptídeo, e os pares de fusão que intensificam a imunogenicidade do polipeptídeo da invenção são todos de interesse. A invenção em particular pertence a um polipeptídeo de fusão que compreende as fusões de dois ou mais polipeptídeos imunogênicos com base nos polipeptídeos derivados de *M. tuberculosis*.

Outros pares de fusão, que podem intensificar a imunogenicidade do produto, são linfocinas tais como IFN- γ , IL-2 e IL-12. De modo a facilitar a expressão e/ou a purificação, o par de fusão pode, por exemplo, ser uma proteína fimbrial bacteriana, por exemplo, os componentes pilosos pilina e papA; proteína A; o peptídeo ZZ (as fusões ZZ são vendidas por Pharmacia in Sweden). A proteína de ligação de maltose; glutationa S-transferase; (-galactosidase; ou polihistidina. As proteínas de fusão podem

ser produzidas recombinantemente em uma célula hospedeira, que pode ser *E. coli*, e é uma possibilidade induzir uma região articuladora entre os pares de fusão diferentes. A região articuladora entre, por exemplo, as unidades de polipeptídeo imunogênicas individuais, pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 5 8, 9 ou 10 aminoácidos.

Os polipeptídeos de fusão de interesse são polipeptídeos da invenção, que são submetidos a lipídeo de modo que o polipeptídeo imunogênico é apresentado em uma maneira adequada ao sistema imune. Este efeito é, por exemplo, conhecido das vacinas com base no polipeptídeo *Borrelia burgdorferi* OspA como descrito em, por exemplo, WO 96/40718 A ou vacinas com base na lipoproteína *Pseudomonas aeruginosa* Oprl (Cote-Sierra J 1998). Uma outra possibilidade é a fusão N-terminal de uma seqüência de sinal conhecida e uma cisteína N-terminal ao polipeptídeo imunogênico. Uma tal fusão resulta na lipidação do polipeptídeo de fusão imunogênico na cisteína N-terminal, quando produzido em um hospedeiro de produção adequado. 10 15

Vacina

Um aspecto importante da invenção pertence a uma composição de vacina que compreende um polipeptídeo de fusão de acordo com a invenção. De modo a garantir o desempenho ideal de uma tal composição de 20 vacina é preferível que ela compreende um veículo ou adjuvante imunológica e farmaceuticamente aceitável.

Uma vacina eficaz, em que um polipeptídeo de fusão da invenção é reconhecido pelo animal, em um modelo animal será capaz de diminuir a carga bacteriana no órgãos-alvo, prolongará os tempos de sobrevivência 25 e/ou diminuirá a perda de peso ou patologia após provação com uma *Micobactéria* virulenta, comparado com os animais não-vacinados.

Os veículos adequados são selecionados do grupo consistindo em um polímero em que o(s) polipeptídeo(s) é/são ligado(s) por interação não covalente hidrofóbica, tal como um plástico, por exemplo, poliestireno, 30 ou um polímero em que o(s) polipeptídeo(s) é/são covalentemente ligado(s), tais como um polissacarídeo, ou um polipeptídeo, por exemplo, albumina de soro bovino, ovalbumina ou hemocianina de lapa. Os veículos adequados

são selecionados do grupo consistindo em um diluente e um agente de suspensão. O adjuvante é preferivelmente selecionado do grupo consistindo em brometo de dimetiloctadecilamônio (DDA), brometo de dimetiloctadecenila-mônio (DODAC), Quil A, poli I:C, hidróxido de alumínio, adjuvante incompleto de Freund, IFN-(, IL-2, IL-12, monofosforil lipídeo A (MPL), Dimicolato de Trealose (TDM), Dibeenato de Trealose e dipeptídeo de muramila (MDP) ou extrato de lipídeo micobacteriano, em particular extratos de lipídeo apolares como descrito na PCT/DK2004/000488.

A preparação de vacinas que contêm polipeptídeos como ingredientes ativos é geralmente bem-entendida na técnica, como exemplificado nas Patentes U.S. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231 e 4.599.230, todas aqui incorporadas por referência.

Outros métodos de obter efeito adjuvante para a vacina incluem o uso de agentes tais como hidróxido de alumínio ou fosfato (alum), polímeros sintéticos de açúcares (Carbopol), agregação da proteína na vacina mediante tratamento térmico, agregação mediante a reativação com anticorpos tratados com pepsina (Fab) à albumina, mistura com células bacterianas tais como *C. parvum* ou endotoxinas ou componentes de lipopolicárgido de bactérias gram-negativas, emulsão em veículos de óleo fisiologicamente aceitáveis tais como monooleato mannide (Aracel A) ou emulsão com solução a 20 por cento de um perfluorocarbono (Fluosol-DA) usado como um substituto de bloco pode também ser empregada. Outras possibilidades envolvem o uso de substâncias moduladoras imunes tais como citocinas ou indutores de IFN-gama sintéticos tais como poli I:C em combinação com os adjuvantes acima mencionados.

Uma outra possibilidade interessante para obter efeito adjuvante é empregar a técnica descrita em Gosselin et al., 1992 (que é por meio desta aqui incorporada por referência). Em resumo, um antígeno relevante tal como um antígeno da presente invenção pode ser conjugado a um anticorpo (ou fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno) contra os receptores de Fc nos monócitos/macrófagos.

Para melhorar a vacina BCG, um ou mais antígeno(s) relevan-

te(s) tais como um ou mais polipeptídeos de fusão da presente invenção podem ser misturados com uma vacina BCG antes da administração e injetados com a vacina BCG desse modo obtendo um efeito sinergístico que leva a uma melhor proteção. Outra possibilidade de interesse para obter um efeito sinergístico é manter a vacina BCG e o(s) polipeptídeo(s) de fusão da presente invenção separadas, mas usá-las ao mesmo tempo e administrá-las em diferentes sítios ou através de diferentes vias.

Para reforçar as vacinas BCG correntemente usadas um antígeno relevante tal como um ou mais dos polipeptídeos de fusão da presente invenção pode ser administrado no momento onde as vacinas BCG tipicamente começam a decair ou mesmo antes, tal como 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65 ou 70 anos após a vacinação de BCG. Pode portanto ser dado em intervalos regulares, tais como 1, 2, 3, 4, 5 ou 10 anos, por até 5 vezes.

As vacinas são administradas em uma maneira compatível com a formulação de dosagem, e em tal quantidade como será profilático ou terapeuticamente eficaz e imunogênico. A quantidade a ser administrada depende do indivíduo a ser tratado, incluindo, por exemplo, a capacidade do sistema imune do indivíduo para sobrepor uma resposta imune, e o grau de proteção desejado. As faixas de dosagem adequadas são da ordem de várias centenas de microgramas do polipeptídeo de fusão da invenção per vacinação com uma faixa preferida de cerca de 0,1 µg a 1000 µg, tal como na faixa de cerca de 1 µg a 300 µg, e especialmente na faixa de cerca de 10 µg a 100 µg. Os regimes adequados para a administração inicial e doses de reforço são também variáveis, mas são tipificados por uma administração inicial seguida por inoculações subseqüentes ou outras administrações.

A maneira de aplicação pode ser variada amplamente. Qualquer um dos métodos convencionais para administração de uma vacina é aplicável. Estes incluem aplicação oral, nasal ou mucosal em uma forma sólida contendo os ingredientes ativos (tal como uma pílula, supositório ou cápsula) ou em uma dispersão fisiologicamente aceitável, tal como uma pulverização, pó ou líquido, ou parenteralmente, por injeção, por exemplo, subcutânea,

intradérmica ou intramuscular ou transdermicamente aplicado. A dosagem da vacina dependerá da via de administração e variará de acordo com a idade da pessoa a ser vacinada e, em um grau menor, o tamanho da pessoa a ser vacinada. Correntemente, a maioria das vacinas é administrada intramuscularmente por injeção de agulha e isto é provável de continuar como a via padrão. No entanto, as formulações de vacina que induzem a imunidade mucosal foram desenvolvidas, tipicamente por liberação oral ou nasal. Um dos sistemas de liberação mais amplamente estudados para indução de imunidade mucosal contém toxina de cólera (CT) ou sua subunidade B. Esta proteína intensifica as respostas imunes mucosais e induz a produção de IgA quando administrada em formulações de vacina. Uma vantagem é a facilidade de liberação das vacinas orais ou nasais. As toxinas modificadas de outras espécies microbianas, que possuem toxicidade reduzida, mas capacidade imunoestimuladora retida, tal como toxina instável ao calor modificada de bactérias Gram-negativas ou enterotoxinas estafilocócicas, podem também ser usadas para gerar um efeito similar. Estas moléculas são particularmente adequadas para a administração mucosal.

As vacinas são convencionalmente administradas parenteralmente, por injeção, por exemplo, subcutânea ou intramuscularmente. As formulações adicionais que são adequadas para outros modos de administração incluem supositórios e, em alguns casos, formulações orais. Para os supositórios, aglutinantes e veículos tradicionais podem incluir, por exemplo, polialcaleno glicóis ou triglicerídeos; tais supositórios podem ser formados de misturas contendo o ingrediente ativo na faixa de 0,5 % a 10 %, preferivelmente de 1 a 2 %. As formulações orais incluem tais excipientes normalmente empregados como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio, e outros mais. Estas composições tomam a forma de soluções, suspensões, tabletes, pílulas, cápsulas, formulações de liberação controlada ou pós e vantajosamente contêm de 10 a 95 % de ingrediente ativo, preferivelmente de 25 a 70 %.

Em muitos exemplos, será necessário ter múltiplas administra-

ções da vacina. Especialmente, as vacinas podem ser administradas para prevenir uma infecção com micobactérias virulentas e/ou para tratar infecção micobacteriana estabelecida ou para reforçar uma pessoa vacinada com BCG anteriormente. Quando administrada para impedir uma infecção, a vacina é dada profilaticamente, antes que os sinais ou sintomas clínicos definitivos de uma infecção estejam presentes.

Devido à variação genética, diferentes indivíduos podem reagir com as respostas imunes de intensidade variável ao mesmo polipeptídeo. Portanto, a vacina de acordo com a invenção pode compreendervários polipeptídeos de fusão diferentes e/ou polipeptídeos de modo a aumentar a resposta imune. A vacina pode compreender dois ou mais polipeptídeos de fusão ou polipeptídeos induzidos por inanição ou partes imunogênicas destes, onde todos os antígenos induzidos por inanição ou polipeptídeos de fusão são como definidos acima, ou alguns, mas nem todos, dos polipeptídeos podem ser derivados de micobactérias virulentas. No último exemplo, os polipeptídeos não necessariamente satisfazem os critérios apresentados acima com relação aos polipeptídeos de fusão que podem atuar devido à sua própria imunogeneicidade ou simplesmente atuar como adjuvantes.

A vacina pode compreender de 1 a 20, tal como de 2 a 20, ou mesmo de 3 a 20 polipeptídeos diferentes ou polipeptídeos de fusão, tais como de 3 a 10 polipeptídeos diferentes ou polipeptídeos de fusão.

A invenção também pertence a um método para a imunização de um animal, incluindo um ser humano, contra a TB causada por micobactérias virulentas, compreendendo a administração ao animal do polipeptídeo de fusão da invenção, ou uma composição de vacina da invenção como descrito acima, ou uma vacina viva descrita acima. Em uma modalidade atualmente preferida, o animal ou ser humano é um indivíduo imune como definido acima.

A invenção também pertence a um método para a produção de uma composição imunogênica de acordo com a invenção, o método compreendendo a preparação, sintetização ou isolamento de um polipeptídeo de fusão de acordo com a invenção, e solubilização ou dispersão do polipeptí-

deo de fusão em um meio para uma vacina, e opcionalmente adição de outros抗ígenos de *M. tuberculosis* e/ou um veículo, e/ou substância adjuvante.

Os fragmentos de ácido nucléico da invenção podem ser usados 5 para efetuar a expressão in vivo de polipeptídeos imunogênicos, isto é, os fragmentos de ácido nucléico podem ser usados nas assim chamadas vacinas de DNA como revisto em Ulmer et al 1993, que é incluído por referência.

Na construção e preparação do DNA plasmídeo que codifica um polipeptídeo de fusão a ser usado definido para vacinação de DNA, uma cepa hospedeira tal como *E. coli* pode ser usada. O DNA plasmídeo pode depois ser preparado durante a noite de culturas da cepa hospedeira que carrega o plasmídeo de interesse, e purificado usando, por exemplo, o kit de coluna Qiagen Giga-Plasmid (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) incluindo uma etapa de remoção da endotoxina. É essencial que o DNA plasmídeo usado 15 para a vacinação de DNA seja livre de endotoxina.

Portanto, a invenção também se refere a uma vacina que compreende um fragmento de ácido nucléico de acordo com a invenção, a vacina efetuando a expressão in vivo do polipeptídeo imunogênico em um animal, incluindo um ser humano, à quem a vacina foi administrada, a quantidade de polipeptídeo expreso sendo eficaz para conferir resistência substancialmente aumentada às infecções causadas por micobactérias virulentas em um animal, incluindo um ser humano.

A eficácia de uma tal vacina de DNA pode possivelmente ser intensificada mediante a administração do gene que codifica o produto de expressão juntamente com um fragmento de DNA que codifica um polipeptídeo que possui a capacidade de modular uma resposta imune.

Uma possibilidade para eficazmente ativar uma resposta imune celular pode ser obtida pela expressão do polipeptídeo imunogênico relevante em um microorganismo não patogênico ou vírus. Exemplos bem-30 conhecidos de tais microorganismos são *Mycobacterium bovis BCG*, *Salmonela* e *Pseudomonas* e exemplos de vírus são Vírus Vacínia e Adenovírus.

Portanto, um outro aspecto importante da presente invenção é

uma melhora da vacina BCG viva atualmente disponível, em que uma ou mais cópias de uma seqüência de DNA que codifica um ou mais polipeptídeos de fusão como definido acima foi incorporada no genoma do microorganismo em uma maneira que permite o microorganismo expressar e secretar o polipeptídeo de fusão. A incorporação de mais do que uma cópia de uma seqüência de ácido nucléico da invenção é contemplada para intensificar a resposta imune.

Outra possibilidade é integrar o DNA que codifica o polipeptídeo de fusão de acordo com a invenção em um vírus enfraquecido tal como o vírus de vacínia ou Adenovírus (Rolph et al 1997). O vírus de vacínia recombinante é capaz de entrar dentro do citoplasma ou núcleo da célula hospedeira infectada e o polipeptídeo de fusão de interesse pode portanto induzir uma resposta imune, que é visionada de induzir proteção contra a TB.

A invenção também se refere ao uso de um polipeptídeo de fusão ou ácido nucléico da invenção para uso como vacinas terapêuticas como foram descritas na literatura exemplificada por D. Lowry (Lowry et al 1999). Os antígenos com propriedades terapêuticas podem ser identificados com base em sua capacidade em diminuir a gravidade da infecção de *M. tuberculosis* em animais experimentais ou prevenir a reativação da infecção anterior, quando administrados como uma vacina. A composição usada para vacinas terapêuticas pode ser preparada como descrito acima para vacinas.

LEGENDAS DA FIGURA

Figura 1: Respostas de anticorpo à Rv2660c para pacientes de TB negativos a HIV (TB+/HIV-) e positivos a HIV (TB+/HIV+) da Uganda e controles de sadios da Denmark (Controles). O corte foi baseado na análise da curva ROC com um nível de especificidade de 97 %. A sensibilidade observada é mostrada acima da apresentação gráfica dos dados.

Figura 2. : Imunogeneicidade of Rv2659c

Os grupos de camundongos F1(Balb/cxC57BL/6) foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Rv2659c em DDA/MPL. Uma semana após a vacinação final, PBMCs foram analisados por ELISA com relação secreção de ING-gama seguinte a esti-

mulação com 5 microgramas/ml Rv2659c

Figura 3. : Rv2659c induz a proteção contra infecção com *M. tuberculosis*

Os grupos de camundongos Balb/c-C57BL/6 foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Rv2659c e a eficácia protetiva foi avaliada pela redução nas contagens de CFU nos pulmões e comparada aos camundongos não-imunizados e imunizados com BCG 12 semanas após a vacinação. Os resultados são expressos como unidades de formação de colônia \log_{10} (CFU) no pulmão e são os resultados médios de 6 camundongos per grupo experimental.

Figura 4: Immunogeneicidade de Rv2660c

Camundongos F1(Balb/cxC57BL/6) foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com proteína Rv2660c recombinante em DDA/MPL. (A) Uma semana após a vacinação final, 15 PBMCs foram analizados por ELISA com relação liberação de IFN-gama seguinte a estimulação com 0,2, 1 ou 5 microgramas/ml de Rv2660c. Três semanas após a vacinação final, células do baço (B) foram analisados por ELISA com relação a secreção de ING-gama seguinte a estimulação com 0,2, 1, ou 5 microgramas/ml de Rv2660c recombinante e PBMCs (C) foram 20 analisados com relação as respostas proliferativas após a estimulação com 0,2, 1 ou 5 microgramas/ml de Rv2660c recombinante.

Figura 5: Proteção contra infecção com *Mycobacterium tuberculosis* induzida por Rv2660c

Os grupos de camundongos Balb/c-C57BL/6 foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Rv2660c, e a eficácia protetiva foi avaliada por contagens de CFU nos pulmões e comparada com camundongos não-imunizados e BCG imunizados 6 semanas após a infecção de aerossol. Os resultados são expressos como unidades de formação de colônia \log_{10} (CFU) no pulmão e são os resultados médios de 6 camundongos per grupo experimental. Como um controle positivo, uma dose única de BCG Danish 1331 (5×10^4 bacilos/camundongo) foi injetado s.c. na base da cauda ao mesmo tempo como a primeira vacinação de

subunidade; nenhuma injeção reforçadora foi administrada.

Figura 6: Imunogeneicidade de Hybrid56, HyVac21 e HyVac28.

Os grupos de camundongos F1(Balb/cxC57BL/6) foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com 5 microgramas de Ag85b-ESAT6-Rv2660c (H56), Ag85a-TB10.4-Rv2660c (H21) ou Ag85b-TB10.4-Rv2660c (H28) em DDA/TDB (LipoVac). Uma semana após a vacinação final, PBMCs foram analisados por ELISA com relação a liberação de IFN-gama seguinte a estimulação com 1 micrograma/ml da proteína de fusão usada com relação a imunização, Ag85b, TB10.4 ou Rv2660c (figura 6A-C).

Três semanas após a vacinação final com Ag85b-ESAT6-Rv2660c, células do baço (D) foram analisadas por ELISA com relação a secreção de IFN-gama seguinte a estimulação com 0,2, 1 ou 5 microgramas/ml de Ag85B recombinante, ESAT6 ou Rv2660c e PBMCs (E) foram analisados com relação às respostas proliferativas contra os mesmos抗ígenos em 1 micrograma/ml.

Figura 7.: Proteção forte contra a infecção de *M. tuberculosis* após imunização com Hibrid56.

(A) Os grupos de camundongos Balb/c-C57BL/6 foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Ag85B-ESAT6-Rv2660c (Hybrid56), e a eficácia protetiva foi avaliada por contagens de CFU nos pulmões e comparada com os camundongos não-imunizados e imunizados com BCG 2, 6, 12 e 24 semanas após a infecção por aerossol.

(B) Os grupos de camundongos B6 foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Ag85b-ESAT6 (Hybrid1) ou Ag85b-ESAT6-Rv2031c (Hybrid32) e a eficácia protetiva foi avaliada por contagens de CFU nos pulmões e comparada com os camundongos não-imunizados e imunizados com BCG 7, 13, 24, 35 e 44 semanas após a infecção por aerossol. Os resultados são expressos como unidades de formação da colônia \log_{10} (CFU) no pulmão e são os resultados médios de 6 camundongos per grupo experimental. Como um controle positivo, uma dose única de BCG Danish 1331 (5×10^4 bacilos/camundongo) foi injetada s.c. na

base da cauda ao mesmo tempo como a primeira vacinação de subunidade; nenhuma injeção reforçadora foi administrada.

Figura 8.: Curvas de sobrevida Kaplan-Meier ($n = 7$). Imunização de proquininhos-da-índia com a proteína de fusão Ag85b-ESAT6-Rv2660c prolonga o tempo de sobrevida até o nível de animais imunizados com BCG após a provocação com de *M. tuberculosis* com aerossol em dose baixa.

Figura 9.: Imunogenicidade e proteção induzidas por Hybrid56 (Ag85b-ESAT6-Rv2660c).

Camundongos F1(Balb/cxC57BL/6) foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Ag85b-ESAT6-Rv2660c (Hybrid56) em DDA/MPL. Dez semanas após a vacinação final, as células do baço foram analisadas por ELISA com relação a secreção de ING-gama seguinte a estimulação com 0,2, 1, ou 5 ug/ml de Ag85B, ESAT6, ou Rv2660c (como observado na figura 9A). A eficácia protetiva foi avaliada pela redução nas contagens de CFU nos pulmões comparada como os camundongos imunizados com controle de adjuvante dez semanas após a vacinação. Os resultados são expressos como unidades de formação de colônia \log_{10} (CFU) no pulmão de 12 camundongos per grupo experimental (figura 9B).

EXEMPLOS

Materiais e métodos

Animais

Camundongos C57BL/6xBalb/C F1 or C57BL/6 livres de patógeno específico fêmeas, 8 a 16 semanas de idade, obtidos da Bomholtegaard, Denmark foram usados para análise de respostas imunes e estudos de proteção como avaliado pela análise CFU. Os estudos de infecção foram executados nas instalações BSL3 no Statens Serum Institute. Os animais foram alojados em gaiolas isolantes e alimentados com água e alimento estéril *ad libitum*. Todos os animais foram deixados um período de repouso de 1 semana antes do início das experiências.

Preparações de Antígeno Recombinante

Ag85B-ESAT6 recombinante (Hybrid1) foi produzido como anteriormente descrito (Olsen, van Pinxteren et al. 2001). Resumidamente, a proteína rotulada His foi expressa em *Escherichia coli* XL-1 Blue e purificada em 5 uma coluna Talon seguido pela cromatografia de troca de ânion de proteína usando uma coluna HiTrap Q (Pharmacia, Uppsala, Sweden). A amostra foi submetida a diálise contra 25 mM HEPES tamponante (pH 8,0)–0,15 M NaCl–10 % glicerol–0,01 % Tween 20 antes da diluição e armazenagem.

Rv2660c recombinante foi produzido pelo menos procedimento 10 anteriormente descrito para outra proteína micobacteriana pequena (Skjot, Oettinger et al. 2000). Resumidamente, o gene Rv2660c de comprimento total foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* e subclonado no plasmídeo de expressão pDest17. A proteína recombinante foi produzida em *Escherichia coli* BL21 azul e purificada pela cromatografia 15 de íon de metal em uma coluna de Ni⁺ essencialmente como descrito anteriormente (Theisen, Vuust et al. 1995) mas com tamponantes de fosfato contendo 8 M uréia, que foi removida após a purificação.

As proteínas de fusão Hybrid56 (Ag85B-ESAT6-Rv2660c), Hybrid32 (Ag85b-ESAT6-Rv2031c), HyVac21 (Ag85a-TB10.4-Rv2660c) e Hy- 20 Vac28 (Ag85b-TB10.4-Rv2660c) foram clonadas no vetor de expressão pDest17 (Invitrogen) pela recombinação específica do sítio de acordo com o fabricante.

As proteínas de fusão foram expressas na cepa de *E.coli* BL21 25 após indução por IPTG. Todas as quatro proteínas de fusão recombinantes foram coletadas como corpos de inclusão após o rompimento das células por detergente suave (B-PER, Sigma) e sonicação. Os corpos de inclusão lavados foram dissolvidos em 20mM NaOAc + 8 M uréia em pH 4,9 e passados sobre uma coluna de separarose Q para capturar a endotoxina. O fluxo atravessante coletado foi diluído em tampão Bis-tris + 8 M uréia pH 6,5 e o 30 pH foi ajustado para pH 6,5. A proteína foi depois passada por uma CM sefareose para capturar as impurezas e depois capturada em uma coluna de Q sefareose. A coluna foi lavada com tampão bis-tris pH 6,5 + 3 M uréia. As pro-

teínas ligadas foram eluídas com NaCl. A proteína foi depois trocada por tampão em uma coluna Sephadex em 25 mM tris-HCl pH 8 e 10 % glicerol.

Reconhecimento humano – sorologia

Todos os soros foram exauridos dos anticorpos reativos cruzados antes de usar em ELISA mediante a adição de 20 µl de extrato de *E. coli* (S3761, Promega, Madison, WI) para 200 µl de amostra de soro seguido por incubação durante 4 horas em temperatura ambiente enquanto se mistura. Após a centrifugação (10.000 x g, 10 min), 0,05 % azido de sódio foi adicionado ao sobrenadante. O ELISA foi executado como se segue, as placas de 10 micrótípulo Maxisorp de 96 cavidades (Nunc, Roskilde, Denmark) foram revestidas durante a noite em 4 °C com antígeno a 1,0 µg/ml (100 µl per cavidade) em tampão de carbonato-bicarbonato (pH 9,6). As placas foram depois lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05 % Tween 20 (PBS-T). As amostras de soro foram diluídas 1:100 em PBS contendo 0,2 % Tween 20 e 15 1,0 % (p/vol) albumina de soro bovino (tamponante de diluição), e 0,1 ml de soro diluído foi adicionado aos cavidades em duplicata, e incubado durante uma hora em temperatura ambiente. Após lavagens 3x com PBS-T, as placas foram incubadas durante uma hora com 100 ul de Ig anti-humano de coelho conjugado com Peroxidase (P212, DAKO, Glostrup, Denmark) diluído 20 1:8000 em tamponante de diluição. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas com substrato de Tetrametilbenzidina (TMB plus, Kem-En-Tec, ***, Denmark) durante 30 minutos, e o desenvolvimento foi interrompido mediante a adição de 1 M H₂SO₄. A densidade ótica em 405 nm (OD₄₀₅) foi depois medida.

25 Preparação de vacina e procedimento de imunização

Os camundongos foram imunizados com 5 micro g de vacina recombinante (Rv2659c, Rv2660c, Hybrid56, HyVac21, HyVac28 ou Hybrid32) liberados em 25 µg de lipídeo monofosforila A (MPL, Corixa, WA, USA) emulsificados em brometo de dioctadecilamônio (DDA, 250 µg/dose, 30 Eastman Kodak, Inc., Rochester, N.Y.) em um volume total de 200 µl, como recentemente descrito (Olsen, van Pinxteren et al. 2001). As vacinas (0,2 ml/camundongo) foram injetadas três vezes subcutaneamente (s.c.) no dor-

so com intervalos de 2 semanas. Uma dose única de BCG Danish 1331 (5×10^4 bacilos/camundongo) foi injetada s.c. na base da cauda ao mesmo tempo como a primeira vacinação de subunidade; nenhuma injeção reforçadora foi administrada. A imunidade de pré-provocação foi tipicamente avaliada 5 com linfócitos sanguíneos 5 e 7 semanas após a primeira vacinação e esplenócitos 7 semanas após a primeira vacinação.

Infecções experimentais e enumeração bacteriana nos órgãos.

Para avaliar o nível de proteção, os camundongos foram provocados 10 semanas após a primeira imunização pela via de aerossol em um sistema de exposição de inalação Glas-Col, calibrado para liberar aproximadamente 100 CFU de *M. tuberculosis* Erdman per pulmão. Os camundongos foram sacrificados 2, 6, 12 ou 24 semanas mais tarde (Hybrid56), ou 7, 13, 24, 35 ou 44 semanas mais tarde (Hybrid32), e os pulmões e os baços foram removidos para a enumeração bacteriana. Os órgãos foram homogeneizados 15 separadamente em salina estéril, e diluições seriais foram plaqueadas em ágar Middlebrook 7H11 suplementado com 2 mg de hidrazida de ácido 2-tiofeno-carboxílico per ml para seletivamente inibir o desenvolvimento de BCG residual nos órgãos de teste. As colônias foram contadas após 2 a 3 semanas de incubação a 37 °C.

20 Culturas de Linfócito

Os órgãos foram homogeneizados por maceração através de uma peneira de aço inoxidável de malha fina em RPMI completo (GIBCO, Grand Island, NY, incluindo 2 mM glutamina, 100 U/ml cada de penicilina 6-potássio e sulfato de estreptomicina, 10 % FCS e 50 mM 2-ME). Os linfócitos sanguíneos foram purificados em um linfócito com gradiente de densidade 25 (Cedrlane, Hornby, Ontario, Canada). As células foram reunidas de cinco camundongos em cada grupo e cultivadas em triplicata em cavidades de microtípulo de fundo redondo (96 cavidades; Nunc, Roskilde, Denmark) contendo 2×10^5 células em um volume de 200 microl de metio RPMI 1640 suplementado com 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol, 1 mM glutamina, penicilina-estreptomicina 5 % (vol/vol) soro de bezerro fetal. Os抗ígenos micobacterianos foram usados em concentrações variando de 5 a 0,2 mg/ml. As cultu-

ras foram incubadas a 37 °C em 10 % CO₂ durante 3 dias, antes da remoção de 100 µl de sobrenadante para interferon gama (determinação de IFN-gama por ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) como descrito abaixo.

5 Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA) para IFN-gama

Um método ELISA sanduíche duplo foi usado para quantificar os níveis de IFN-gama em titulações duplicatas de sobrenadantes de cultura, usando um kit comercial para ensaio de IFN-gama, de acordo com as instruções do fabricante (Mabtech, AB. Sweden). As concentrações de IFN-gama 10 nas amostras foram calculadas usando a curva padrão gerada de IFN-gama recombinante (Life Technologies) e os resultados são expressos em pg/ml. A diferença entre os círculos em duplicita foi consistentemente menor do que 10 % da média.

15 Infecção experimental e avaliação da eficácia de vacina no modelo de proquinho-da-índia

Proquinhos-da-índia Hartley fêmeas de criação adquiridos de Charles River Laboratories (North Wilmington, Mass.) foram administrados BCG intradermicamente em uma dose de 10³ CFU uma vez ou 20 µg of Ag85b-ESAT6 ou Ag85b-ESAT6-Rv2660c emulsificados em DDA/MPL três 20 vezes com um período de repouso de 3 semanas entre as imunizações. Seis semanas após a terceira imunização uma provocação de aerossol MTB foi fornecida usando um dispositivo (Glas-Col, Terre Haute, Ind.) calibrado para liberar aproximadamente 20 bacilos em cada pulmão de proquinho-da-índia. Os tempos de sobrevivência para os proquinhos-da-índia infectados foram 25 determinados pela observação dos animais em uma base diária para mudanças no consumo de alimentação, evidência de respiração sofrida, e mudanças de comportamento. Além disso, os animais foram pesados em uma base semanal até que uma queda sustentada em peso foi observada durante vários dias, indicando doença.

30 Exemplo 1

Reconhecimento humano de um antígeno induzido por inanição

Rv2660c foi avaliado com relação ao reconhecimento humano

em um painel de paciente de TB pulmonar de Uganda fornecido pelo WHO Tuberculosis Specimen Bank. Pacientes com estados de infecção por HIV tanto negativo quanto positivo foram incluídos (N = 94 e N = 73, respectivamente). O grupo de controle consistia de uma centena de doadores residentes Danish saudáveis com uma cobertura de BCG estimada de > 90 %.

As placas de microtípulo foram revestidas com 1,0 µg/ml (100 µl per cavidade) de proteína Rv2660c incubadas com 100 x amostras de soro diluídas e desenvolvidas usando Ig anti-humano de coelho conjugado com peroxidase e tetrametilbenzidina como substrato (resultados na Figura 1).

10 Conclusão

Neste estudo, o reconhecimento de uma proteína induzida por inanição foi testado. Baseado em um corte determinado do grupo de controle usando uma sensibilidade de 97 % se foi possível confirmar a infecção de TB em 45 % do HIV – casos e 61 % do HIV + casos. Claramente indicando que a proteína RV2660c é expressa e reconhecida pelo sistema imune durante uma infecção de MTB.

Exemplo 2

Imunogenicidade e prevenção da reativação mediante a administração pós-exposição de um antígeno induzido por inanição (Rv2659c)

20 Os camundongos foram infectados com *M. tuberculosis* e tratados com antibióticos para reduzir a carga bacteriana e entrar um estágio de infecção latente com uma carga bacteriana próxima ao nível de detecção. Durante o estágio latente de infecção os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Rv2659c em adjuvante (por exemplo, DDA/MPL). Uma semana após a vacinação final, as células sanguíneas são analisadas por ELISA com relação a secreção de INF-gama seguinte ao estímulo com Rv2659c (figura 2).

A capacidade da proteína induzida por inanição Rv2659c de induzir a proteção contra a reativação de *M. tuberculosis*

30 Grupos de camundongos com *M. tuberculosis* latente foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Rv2659c formulado em adjuvante (por exemplo, DDA/MPL) e a eficácia pro-

tetiva foi avaliada pela redução nas unidades de formação de colônia (CFU) dos pulmões e baços quando comparada com camundongos não-vacinados (latentemente infectados). A proteção contra a reativação foi avaliada três meses após a vacinação. Rv2659c induziu uma redução de 3 a 90 vezes

5 nos níveis de bactérias pulmonar comparado com os camundongos reativa-
dos não-imunizados latentemente infectados (figura 3). Para avaliar a influ-
ênci a vacinação de Rv2659c sobre o possível desenvolvimento de pato-
logia nos camundongos latentemente infectados, o tecido pulmonar foi tirado
dos camundongos vacinados latentemente infectados para exame histopato-
10 lógico. Nenhum caso significativo de necrose, fibrose ou mineralização foi
detectado nas lesões e nenhuma infiltração intensificada de células inflama-
tórias foi vista.

Conclusão

Neste estudo, o potencial de uma proteína induzida por inanição,

15 Rv2659c como uma vacina terapêutica foi testada. Quando a proteína Rv2659c foi administrada aos camundongos na combinação adjuvante lipí-
deo de dimetildioctadecilamônio brometo-monofosforila A, uma resposta i-
mune forte foi induzida / reforçada. A imunização resultou em redução de
0,5-1,0 log na carga bacteriana no pulmão. Assim nossos estudos sugerem
20 que a vacinação pós-exposição reduz ou retarda a reativação de *M. Tuber-
culosis* sem o disparo da imunopatologia pulmonar.

Exemplo 3

Imunogenicidade e proteção contra a infecção por *M. tuberculosis* de aerosol pelo antígeno induzido por inanição Rv2660c

25 Os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Rv2660c em adjuvante (por exemplo, DDA/MPL). Uma semana após a vacinação final, as células sanguíneas são analisadas por ELISA com relação a secreção de INF-gama seguinte ao estímulo com Rv2660c (figura 4A). Três semanas após a vacinação final as células de ba-
30 ção são analisadas com relação a secreção de IFN gama seguinte ao estímu-
lo com Rv2660c (figura 4B) e as células sanguíneas são analisadas com relação às respostas proliferativas específicas do antígeno (figura 4C).

Grupos de camundongos subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com Rv2660c formulado em adjuvante (por exemplo, DDA/MPL) foram provocados por infecção de aerossol com *M. tuberculosis* e a eficácia protetiva foi avaliada pela redução nas unidades de formação de colônia (CFU) isoladas dos pulmões quando comparada com camundongos não-vacinados. A proteção foi avaliada 12 semanas após a vacinação. Rv2660c induziu a redução de $\frac{1}{2} \log(10)$ nos níveis de bactérias pulmonar comparado com os camundongos não-imunizados infectados (figura 5).

10 Conclusão

Neste estudo, o potencial de uma proteína induzida por inanição, Rv2660c como um antígeno de vacina foi testado. Quando a proteína Rv2660c foi administrada aos camundongos na combinação adjuvante lipídeo de dimetildioctadecilamônio brometo-monofosforila A, uma resposta imune forte foi induzida. A imunização resultou em redução de aproximadamente 0,5 log na carga bacteriana no pulmão.

Exemplo 4

Fusão de antígenos induzidos por inanição às vacinas preventivas (Vacina de múltiplas fases)

20 Respostas imunológicas após a imunização com proteínas de fusão tripla

Grupos de camundongos são subcutaneamente vacinados duas vezes em intervalos de duas semanas com os polipeptídeos de fusão Hybrid56, HyVac21 ou HyVac28 em adjuvante (por exemplo, DDA/MPL). Uma semana após a vacinação final, as células sanguíneas são analisadas com relação a secreção de INF-gama seguinte ao estímulo com 1 micrograma/ml de proteína de fusão de imunização ou aos componentes únicos nas proteínas de fusão (figure 6A-C). Três semanas após a vacinação final com Hybrid56, as células de baço são analisadas por ELISA com relação a secreção de INF-gama seguinte ao estímulo com 0,2, 1, ou 5 microgramas/ml dos componentes únicos na proteína de fusão (figura 6D). As células sanguíneas são analisadas com relação as respostas proliferativas específicas do antígeno três semanas após a vacinação final (Figura 6E).

A capacidade de três polipeptídeos de fusão de induzir proteção contra a infecção com *M. tuberculosis* em camundongos

Grupos de camundongos são subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com os polipeptídeos de fusão Hybrid1, Hybrid56 e Hybrid32 em adjuvante (DDA/MPL) e a eficácia protetiva é avaliada mediante a redução nas unidades de formação de colônia (CFU) dos pulmões e baços quando comparado com camundongos cãndidos (não-vacinados) após a infecção de aerossol. Como um controle positivo para a proteção, uma dose única de BCG Danish 1331 (5 x 104 bacilos/camundongo) é injetada s.c. na base da cauda ao mesmo tempo como a primeira vacinação de subunidade (Figura 7A e B).

Capacidade protetiva do polipeptídeo Hybrid56 (Ag85b-ESAT6-Rv2660c) contra uma infecção de *M. tuberculosis* com aerossol em proquinhos-da-índia

Grupos de proquinhos-da-índia são subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de três semanas com os polipeptídeos de fusão em adjuvante (DDA/MPL) e a eficácia protetiva é principalmente avaliada mediante a medição de cada peso de animal em uma base semanal. Como um controle positivo para a proteção, uma dose única de BCG Danish 1331 (5 x 104 bacilos/camundongo) é injetada i.d. ao mesmo tempo como a primeira vacinação de subunidade. Os resultados são apresentados como curvas de sobrevivência na figura 8.

Conclusão

Neste estudo o potencial imunológico de três proteínas de fusão (Hybrid56, HyVac21 e HyVac28) foi investigado. Quando as proteínas de fusão forem administrados aos camundongos na combinação adjuvante lipídeo de dimetil dioctadecilamônio brometo-monofosforila A, uma resposta imune dependente da dose forte foi induzida a todos os três componentes de proteína única indicando seu potencial como uma vacina de múltiplas fases.

Selecionar Hybrid56 como um exemplo das respostas imunes induzidas foi acompanhado por níveis elevados de imunidade protetiva que aumentam com o tempo, alcançando um nível que estava claramente acima do nível de

proteção alcançado com *Mycobacterium bovis* BCG, a vacina MTB clássica. Além disso, uma proteína de fusão tripla similar contendo o antígeno de latência de MTB clássico Rv2031c (Ag85b-ESAT6-Rv2031c) substituindo Rv2660c, não mostrou proteção melhorada durante um tempo. Finalmente, o 5 nível elevado de proteção para Hybrid56 foi confirmado no modelo de proquinho-da-índia muito mais suscetível.

Exemplo 5

10 Atividade de uma fusão de um antígeno induzido por inanição e uma vacina preventiva (vacina de múltiplas fases) administrado pós-exposição (terapeuticamente)

Os camundongos foram infectados com *M. tuberculosis* e tratados com antibióticos para reduzir a carga bacteriana e entrar um estágio de infecção latente com uma carga bacteriana baixa. Durante o estágio latente de infecção os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de 15 duas semanas com o polipeptídeo de fusão em adjuvante (por exemplo, DDA/MPL). Quinze semanas após a vacinação final, as células sanguíneas são analisadas por ELISA com relação a secreção de INF-gama seguinte ao estímulo com 0,2, 1 ou 5 µg de componentes únicos da proteína de fusão (figura 9A).

20 A capacidade do polipeptídeo de fusão de induzir a proteção contra a reativação de *M. tuberculosis*

Grupos de camundongos com *M. tuberculosis* latente foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com o polipeptídeo de fusão formulado em adjuvante (por exemplo, DDA/MPL) e a 25 eficácia protetiva foi avaliada pela redução nas unidades de formação de colónia (CFU) dos pulmões quando comparada com camundongos não-vacinados (latentemente infectados). A proteção contra a reativação foi avaliada três meses após a vacinação. O polipeptídeo de fusão induziu uma redução significativa de reativação resultando em níveis de bactérias pulmonar 30 comparado com os camundongos reativados não-imunizados latentemente infectados (figura 9B).

Conclusão

Neste estudo, o potencial de uma vacina de subunidade de tuberculose com base em uma proteína de fusão dos antígenos Rv2660c, ESAT6 (Rv3875) e antígeno 85B (Rv1886c) como uma vacina terapêutica foi investigado. Quando a proteína de fusão foi administrada aos camundongos na combinação adjuvante lipídeo de dimetildioctadecilamônio brometomonofosforila A, uma resposta imune forte foi induzida / reforçada. A imunização resultou em redução na carga bacteriana no pulmão durante a reativação da infecção latente. Assim nossos estudos sugerem que a vacinação pós-exposição com fusão de um antígeno induzido por inanição e uma vacina preventiva (vacina de múltiplas fases) reduz ou retarda a reativação de *M. Tuberculosis*.

REFERÊNCIAS

- Andersen, P., and Heron, I. 1993 J. Immunol. Methods 161 29-39
- Andersen, P. et al 1991. Infect. Immun. 59:1905-1910
- Betts J. C. et al 2002. Mol Microbiol. 43:717-731
- Brandt, L., et al. 2000 Infect. Immun. 68:2; 791-795.
- Brooks, J.V., Frank, A.A., Keen, M.A., Bellisle, J.T. & Orme, I.M. 2001 Infect Immun 2001, 69(4), 2714-2717.
- Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S. et al. JAMA 1994, 271, 698-702
- Cole, S.T et al 1998 Nature 393: 537-544
- Cote-Sierra J, et al 1998, Gene Oct 9;221(1):25-34
- Gosselin et al., (1992) J. Immunol. 149: 3477-3481
- Harboe, M., et al 1998 Infect. Immun. 66:2; 717-723
- Lowry, D.B. et al 1999, Nature 400: 269-71
- Lyashchenko, K.P., et al 2000. J Immunological Methods 242: 91-100
- Nagai et al 1991, Infect. Immun 59:1; 372-382
- Danish Patent application PA 2000 00666 " Nucleic acid fragments and polypeptide fragments derived from *M. tuberculosis*"

- Danish Patent application PA 1999 01020 (WO 01/23388) "Tuberculosis vaccine and diagnostic based on the *Mycobacterium tuberculosis* esat-6 gene family".
- Patent application US 09/0505,739 "Nucleic acid fragments and 5 polypeptide fragments derived from *M. tuberculosis*"
- Pollock. J., et al, 2000. The Veterinary record, 146:659-665
- Rolph, M.S, and I. A. Ramshaw. 1997. *Curr.Opin.Immunol.* 9:517-
24
- Rosenkrands, I., et al 1998, *Infect. Immun* 66:6; 2728-2735
- 10 Sambrook et al *Molecular Cloning; A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1989
- Sherman, D. R. et al. 2001 *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7534-
7539
- Skjøt, R.L.V., et al 2000, *Infect. Immun* 68:1; 214-220
- 15 Stryhn, A., et al 1996 *Eur. J. Immunol.* 26:1911-1918
- Thompson J., et al *Nucleic Acids Res* 1994 22:4673-4680
- Ulmer J.B et al 1993, *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2(9): 983-989
- Olsen A.W et al, *Eur J Immunol.* 2000 Jun; 30(6):1724-32
- Olsen, A. W., L. A. van Pinxteren, et al. (2001) *Infect Immun*
20 69(5): 2773-8.
- Theisen, M., J. Vuust, et al. (1995) *Clin Diagn Lab Immunol* 2(1):
30-4.
- Ravn, P. et al 1999. *J.Infect.Dis.* 179:637-645
- Kilgus J et al, *J Immunol.* 1991 Jan 1;146(1):307-15
- 25 Sinigaglia F et al. *Nature* 1988 Dec 22-29;336(6201):778-80
- Pearson W.R and D.J. Lipman (1988) *PNAS USA* 85:2444-2448
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)
- McCafferty et al, *Nature*, 348:552-554 (1990)
- Merrifield, R. B. *Fed. Proc. Am. Soc. Ex. Biol.* 21: 412, 1962 and
30 *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149, 1963
- Mowat et al 1991, *Immunology* 72(3):317-22
- Lustig et al 1976, *Cell Immunol* 24(1):164-72

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> Statens Serum Institut
 <120> VACINAS PARA TUBERCULOSE (TB) COM PROTEÍNAS DE FUSÃO
 <130> 15018dk1
5 <160> 18
 <170> PatentIn versão 3.1
 <210> 1
 <211> 960
 <212> DNA
10 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 1
 atggctgaca tcccctacgg ccgtgactat cccgaccgga tctgggtgtga cgaggacggc 60
 cagccgatgc cgccgggtcgg cgccgaattg ctcgacgaca ttagggcatt cttgcggcgg 120
 ttcgttagtct atccaaggcga ccatgaactg atcgcgacaca ccctctggat tgcgcatattgc 180
15 tggtttatgg aggcgtggga ctcaacgcccc cgaatcgctt ttttgcacc ggaacccggc 240
 tctggcaaga gccgcgcact cgaagtcacg gaaccgctag tgccccggcc ggtgcattgcc 300
 atcaactgca caccggccata cctgttccgt cgggtggccg atccggtcgg gccggccgacc 360
 gtcctgtacg acgagtgta caccctgttt ggccccaaag ctaaaagaaca cgaggaaatt 420
 cgccggcgtga tcaacgcccc ccaccgcaag ggagccgtcg cgggcccgtcg cgtcatccgc 480
20 ggcaagatcg ttgagaccga ggaactgcca gcgtactgtg cggtcgcctt ggccggcctc 540
 gacgacactgc ccgacaccat catgtctcgg tcgatcgtgg tgaggatgcg caggaggca 600
 ccaaccgaac ccgtggagcc gtggcgcccc cgcgtcaacg gccccgaggc cgagaagctg 660
 cacgaccggcgtt tggcgaactg ggcggccgccc attaaccgc tggaaagcgg ttggccggcg 720
 atgcccggacg gggtgaccga ccggcgcgccc gacgtctggg agtccctggg tgccggttgct 780
25 gacaccggcgg gcgggcactg gccccaaacc gcccgtgcaa cgcgcgaaac ggatgcaacc 840
 gcaaaatcgag gagccaagcc cagcataggc gtgctgctgc tgccggatat ccgtcgagtc 900
 ttcagcgacc gggaccggat ggcgcaccaggc gacatcctga ccggactgaa ccggatggag 960
 <210> 2
 <211> 475
30 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 2

Met Ala Asp Ile Pro Tyr Gly Arg Asp Tyr Pro Asp Pro Ile Trp Cys
 1 5 10 15

Asp Glu Asp Gly Gln Pro Met Pro Pro Val Gly Ala Glu Leu Leu Asp
 20 25 30

5 Asp Ile Arg Ala Phe Leu Arg Arg Phe Val Val Tyr Pro Ser Asp His
 35 40 45

Glu Leu Ile Ala His Thr Leu Trp Ile Ala His Cys Trp Phe Met Glu
 50 55 60

Ala Trp Asp Ser Thr Pro Arg Ile Ala Phe Leu Ser Pro Glu Pro Gly
10 65 70 75 80

Ser Gly Lys Ser Arg Ala Leu Glu Val Thr Glu Pro Leu Val Pro Arg
 85 90 95

Pro Val His Ala Ile Asn Cys Thr Pro Ala Tyr Leu Phe Arg Arg Val
 100 105 110

15 Ala Asp Pro Val Gly Arg Pro Thr Val Leu Tyr Asp Glu Cys Asp Thr
 115 120 125

Leu Phe Gly Pro Lys Ala Lys Glu His Glu Glu Ile Arg Gly Val Ile
 130 135 140

Asn Ala Gly His Arg Lys Gly Ala Val Ala Gly Arg Cys Val Ile Arg
20 145 150 155 160

Gly Lys Ile Val Glu Thr Glu Glu Leu Pro Ala Tyr Cys Ala Val Ala
 165 170 175

Leu Ala Gly Leu Asp Asp Leu Pro Asp Thr Ile Met Ser Arg Ser Ile
 180 185 190

25 Val Val Arg Met Arg Arg Ala Pro Thr Glu Pro Val Glu Pro Trp
 195 200 205

Arg Pro Arg Val Asn Gly Pro Glu Ala Glu Lys Leu His Asp Arg Leu
 210 215 220

Ala Asn Trp Ala Ala Ala Ile Asn Pro Leu Glu Ser Gly Trp Pro Ala
30 225 230 235 240

Met Pro Asp Gly Val Thr Asp Arg Arg Ala Asp Val Trp Glu Ser Leu
 245 250 255

Val Ala Val Ala Asp Thr Ala Gly Gly His Trp Pro Lys Thr Ala Arg
 260 265 270
 Ala Thr Ala Glu Thr Asp Ala Thr Ala Asn Arg Gly Ala Lys Pro Ser
 275 280 285
5 Ile Gly Val Leu Leu Leu Arg Asp Ile Arg Arg Val Phe Ser Asp Arg
 290 295 300
 Asp Arg Met Arg Thr Ser Asp Ile Leu Thr Gly Leu Asn Arg Met Glu
 305 310 315 320
 Glu Gly Pro Trp Gly Ser Ile Arg Arg Gly Asp Pro Leu Asp Ala Arg
10 325 330 335
 Gly Leu Ala Thr Arg Leu Gly Arg Tyr Gly Ile Gly Pro Lys Phe Gln
 340 345 350
 His Ser Gly Gly Glu Pro Pro Tyr Lys Gly Tyr Ser Arg Thr Gln Phe
 355 360 365
15 Glu Asp Ala Trp Ser Arg Tyr Leu Ser Ala Asp Asp Glu Thr Pro Glu
 370 375 380
 Glu Arg Asp Leu Ser Val Ser Ala Val Ser Ala Val Ser Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Gly Asp Pro Gly Asp Ala Thr Gly Ala Thr Asp Ala Thr Asp Leu Pro
20 405 410 415
 Glu Ala Gly Asp Leu Pro Tyr Glu Pro Pro Ala Pro Asn Gly His Pro
 420 425 430
 Asn Gly Asp Ala Pro Leu Cys Ser Gly Pro Gly Cys Pro Asn Lys Leu
 435 440 445
25 Leu Ser Thr Glu Ala Lys Ala Ala Gly Lys Cys Arg Pro Cys Arg Gly
 450 455 460
 Arg Ala Ala Ala Ser Ala Arg Asp Gly Ala Arg
 465 470 475
 <210> 3
30 <211> 393
 <212> DNA
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400>	3			
		atgaccgccc tcggcgggtc gcccggacg cgacgatgcc cggccacaga ggaccgggca	60	
		cccgcgacag tcgcccacacc gtctagcacc gatcctaccc cgtcccgccg cgtgtcggtgg	120	
		tggtcgggtgc acgagttatgt cgacccgacc ctggccgccc ccgtggaatg gccgatggcc	180	
5		ggcacccccc cgtgggtgcga cctcgacgac accgaccccg tcaaattgggc cgcgatctgc	240	
		gacgctgctc ggcattgggc actccgggtg gagacgtgcc aggccgcgtc ggccgaggca	300	
		tcacgtgacg tatccgcccgc cgccgactgg ccggcgggtct ctcggagat ccagcgtcgg	360	
		cgtgacgcct acattcggcgc ggtgggtggtc tga	393	
<210>	4			
10	<211>	130		
	<212>	PRT		
	<213>	Mycobacterium tuberculosis		
	<400>	4		
		Met Thr Ala Val Gly Gly Ser Pro Pro Thr Arg Arg Cys Pro Ala Thr		
15	1	5	10	15
		Glu Asp Arg Ala Pro Ala Thr Val Ala Thr Pro Ser Ser Thr Asp Pro		
		20	25	30
		Thr Ala Ser Arg Ala Val Ser Trp Trp Ser Val His Glu Tyr Val Ala		
		35	40	45
20	Pro Thr Leu Ala Ala Val Glu Trp Pro Met Ala Gly Thr Pro Ala			
	50	55	60	
		Trp Cys Asp Leu Asp Asp Thr Asp Pro Val Lys Trp Ala Ala Ile Cys		
	65	70	75	80
		Asp Ala Ala Arg His Trp Ala Leu Arg Val Glu Thr Cys Gln Ala Ala		
25		85	90	95
		Ser Ala Glu Ala Ser Arg Asp Val Ser Ala Ala Asp Trp Pro Ala		
		100	105	110
		Val Ser Arg Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ala Tyr Ile Arg Arg Val		
		115	120	125
30	Val Val			
		130		
	<210>	5		

<211> 261
 <212> DNA
 <213> **Mycobacterium tuberculosis**
 <400> 5

5 atgtgcgcgt tccccgtcgcc gagtctcggttggacgggtct ctcacgagac cgaaaggccc 60
 ggcatggcag acgctcccccc gttgtcacgg cggtacatca cgatcagtga ggccgcccga 120
 tatcttagcggttcaccgacccg cacgggtccgc cagatgatcg ccgacggccg cctacgcgg 180
 taccgctccg gcacccgcct cgtccgtctg cgccgcgatg aggtcgacgg cgccatgcac 240
 ccgttcggtg gtggccgcatg a 261

10 <210> 6
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> **Mycobacterium tuberculosis**
 <400> 6

15 Met Cys Ala Phe Pro Ser Pro Ser Leu Gly Trp Thr Val Ser His Glu
 1 5 10 15
 Thr Glu Arg Pro Gly Met Ala Asp Ala Pro Pro Leu Ser Arg Arg Tyr
 20 25 30

Ile Thr Ile Ser Glu Ala Ala Glu Tyr Leu Ala Val Thr Asp Arg Thr
20 35 40 45
 Val Arg Gln Met Ile Ala Asp Gly Arg Leu Arg Gly Tyr Arg Ser Gly
 50 55 60

Thr Arg Leu Val Arg Leu Arg Arg Asp Glu Val Asp Gly Ala Met His
 65 70 75 80

25 Pro Phe Gly Gly Ala Ala
 85

<210> 7
 <211> 363
 <212> DNA

30 <213> **Mycobacterium tuberculosis**
 <400> 7

atggccgatgcggtaagta cgttagttatgtgcaactgcg acgacgaacc gggagcgctc 60

	atcatcgccct ggatcgacga cgaacgaccc gccggcgggc acatacagat gcggtcgaac	120
	acccgcttca ccgaaacaca gtggggccgc catatcgagt gaaaactcga atgccggca	180
	tgccgaaagt atgcgccat atccgagatg accgcccgg cgatcctcga cggttcggg	240
	gcgaagcttc acgagctgag aacgtcgacc atccccgacg ctgacgatcc atcaatagca	300
5	gaggcgcgac acgtaattcc gttcagcgca ttatgcttgc gcttgagcca gctaggcggg	360
	taa	363
	<210> 8	
	<211> 120	
	<212> PRT	
10	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	<400> 8	
	Met Ala Asp Ala Val Lys Tyr Val Val Met Cys Asn Cys Asp Asp Glu	
	1 5 10 15	
	Pro Gly Ala Leu Ile Ile Ala Trp Ile Asp Asp Glu Arg Pro Ala Gly	
15	20 25 30	
	Gly His Ile Gln Met Arg Ser Asn Thr Arg Phe Thr Glu Thr Gln Trp	
	35 40 45	
	Gly Arg His Ile Glu Trp Lys Leu Glu Cys Arg Ala Cys Arg Lys Tyr	
	50 55 60	
20	Ala Pro Ile Ser Glu Met Thr Ala Ala Ala Ile Leu Asp Gly Phe Gly	
	65 70 75 80	
	Ala Lys Leu His Glu Leu Arg Thr Ser Thr Ile Pro Asp Ala Asp Asp	
	85 90 95	
	Pro Ser Ile Ala Glu Ala Arg His Val Ile Pro Phe Ser Ala Leu Cys	
25	100 105 110	
	Leu Arg Leu Ser Gln Leu Gly Gly	
	115 120	
	<210> 9	
	<211> 1128	
30	<212> DNA	
	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	<400> 9	

5	gtgacgcaaa ccggcaagcg tcagagacgc aaattcggtc gcatccgaca gttcaactcc ggccgctggc aagccagcta caccggcccc gacggccgcg tgtacatcgcc ccccaaaacc ttcaacgcca agatcgacgc cgaagcatgg ctcaccgacc gccgcccgcga aatcgaccga caactatggt ccccgccatc gggtcaggaa gaccgccccg gagccccatt cggtgagtag	60 120 180 240
10	gccgaaggat ggctgaagca gcgttggaaatc aaggaccgca cccgcgcccc ctatcgcaaa ctgctggaca accacatcct ggccaccttc gctgacacccg acctacgcga catcaccgg gccgcccgtgc gccgctggta cgccaccacc gccgtggca caccgaccat gcgggcacac tcctacagct tgctgcgcgc aatcatgcag accgccttgg ccgacgaccc gatcgactcc aaccctgtcc gcatctcagg cgcttccacc gcccgcgcg tccacaagat caggcccccc accctcgacg agctggaaac catcaccaaa gccatgcgg acccctacca ggcttcgtg ctgatggccgg catggctggc catgcgtac ggctgagctga ccgaattacg ccgcaaagac atcgacctgc acggcgaggt tgctgcgggtg cggcgggctg tcgttgggt gggcgaaggc ttcaagggtga cgacaccgaa aagcgatgcg ggagtgcgcg acataagtat cccgccacat ctgatacccg ccatcgaaga ccaccttcac aaacacgtca accccggccg ggagtccctg 15	300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1128
20	<210> 10 <211> 375 <212> PRT <213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <400> 10	
25	val Thr Gln Thr Gly Lys Arg Gln Arg Arg Lys Phe Gly Arg Ile Arg 1 5 10 15 Gln Phe Asn Ser Gly Arg Trp Gln Ala Ser Tyr Thr Gly Pro Asp Gly 20 25 30 Arg Val Tyr Ile Ala Pro Lys Thr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Ala Glu 30 35 40 45 Ala Trp Leu Thr Asp Arg Arg Glu Ile Asp Arg Gln Leu Trp Ser 50 55 60	

Pro Ala Ser Gly Gln Glu Asp Arg Pro Gly Ala Pro Phe Gly Glu Tyr
 65 70 75 80
 Ala Glu Gly Trp Leu Lys Gln Arg Gly Ile Lys Asp Arg Thr Arg Ala
 85 90 95
5 His Tyr Arg Lys Leu Leu Asp Asn His Ile Leu Ala Thr Phe Ala Asp
 100 105 110
 Thr Asp Leu Arg Asp Ile Thr Pro Ala Ala Val Arg Arg Trp Tyr Ala
 115 120 125
 Thr Thr Ala Val Gly Thr Pro Thr Met Arg Ala His Ser Tyr Ser Leu
10 130 135 140
 Leu Arg Ala Ile Met Gln Thr Ala Leu Ala Asp Asp Leu Ile Asp Ser
 145 150 155 160
 Asn Pro Cys Arg Ile Ser Gly Ala Ser Thr Ala Arg Arg Val His Lys
 165 170 175
15 Ile Arg Pro Ala Thr Leu Asp Glu Leu Glu Thr Ile Thr Lys Ala Met
 180 185 190
 Pro Asp Pro Tyr Gln Ala Phe Val Leu Met Ala Ala Trp Leu Ala Met
 195 200 205
 Arg Tyr Gly Glu Leu Thr Glu Leu Arg Arg Lys Asp Ile Asp Leu His
20 210 215 220
 Gly Glu Val Ala Arg Val Arg Arg Ala Val Val Arg Val Gly Glu Gly
 225 230 235 240
 Phe Lys Val Thr Thr Pro Lys Ser Asp Ala Gly Val Arg Asp Ile Ser
 245 250 255
25 Ile Pro Pro His Leu Ile Pro Ala Ile Glu Asp His Leu His Lys His
 260 265 270
 Val Asn Pro Gly Arg Glu Ser Leu Leu Phe Pro Ser Val Asn Asp Pro
 275 280 285
 Asn Arg His Leu Ala Pro Ser Ala Leu Tyr Arg Met Phe Tyr Lys Ala
30 290 295 300
 Arg Lys Ala Ala Gly Arg Pro Asp Leu Arg Val His Asp Leu Arg His
 305 310 315 320

Ser Gly Ala Val Leu Ala Ala Ser Thr Gly Ala Thr Leu Ala Glu Leu
 325 330 335
 Met Gln Arg Leu Gly His Ser Thr Ala Gly Ala Ala Leu Arg Tyr Gln
 340 345 350
5 His Ala Ala Lys Gly Arg Asp Arg Glu Ile Ala Ala Leu Leu Ser Lys
 355 360 365
 Leu Ala Glu Asn Gln Glu Met
 370 375
 <210> 11
10 <211> 228
 <212> DNA
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 11
 gtgatagcg ggctcgacca ggcgttgca gcaacaggcc aggctagcca gcggcggca 60
15 ggccatctg gtgggtcac cgtcggtgtc ggcgtggca cggAACAGAG gAACCTTCG 120
 gtggttgcac cgagtcagtt cacatttagt tcacgcagcc cagatttgc gatgaaacc 180
 gcaggtcaat cgtggtgcgc gatactggta ttgaaccagg ttcactag 228
 <210> 12
 <211> 75
20 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 12
 Val Ile Ala Gly Val Asp Gln Ala Leu Ala Ala Thr Gly Gln Ala Ser
 1 5 10 15
25 Gln Arg Ala Ala Gly Ala Ser Gly Gly Val Thr Val Gly Val Gly Val
 20 25 30
 Gly Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ser Val Val Ala Pro Ser Gln Phe Thr
 35 40 45
 Phe Ser Ser Arg Ser Pro Asp Phe Val Asp Glu Thr Ala Gly Gln Ser
30 50 55 60
 Trp Cys Ala Ile Leu Gly Leu Asn Gln Phe His
 65 70 75

<210>	13			
<211>	390			
<212>	DNA			
<213>	Mycobacterium tuberculosis			
5	<400>	13		
	atgagggctc gcagcgatgc tggaggccag tctgtgaagt cccgcacgac gaatcggtcc	60		
	agaagctcgc gccggagccg cgtcaggtca tccatcagtg ccctcggtga taatccgcag	120		
	gctcgccgc gcgagctccc tgttctgtgc gggtgtggcccg tagtgcgcgt cgagccggc	180		
	tgcgagttcg tgccggagcc ggttgtgga caggccgagg tgctcggcga gccagccgccc	240		
10	gctcatcgaa tcacctcagc ccgcgggtca ccctcaacga ccgtttgcag ccgttcgcag	300		
	aaggcgagcg cggtgtgtat cagctccgtc agctcggttg cgcggtgcg gcgtgcctcg	360		
	gtgagttcgg tggacgcgac aacagcgtga	390		
	<210>	14		
	<211>	129		
15	<212>	PRT		
	<213>	Mycobacterium tuberculosis		
	<400>	14		
	Met Arg Ala Arg Ser Asp Ala Gly Gly Gln Ser Val Lys Ser Arg Thr			
1	1	5	10	15
20	Ser Asn Arg Ser Arg Ser Ser Arg Arg Ser Arg Val Arg Ser Ser Ile			
	20	25	30	
	Ser Ala Leu Val Asp Asn Pro Gln Ala Arg Pro Arg Glu Leu Pro Val			
	35	40	45	
	Leu Cys Gly Trp Pro Val Val Arg Val Glu Pro Val Cys Glu Phe Val			
25	50	55	60	
	Pro Glu Pro Val Cys Gly Gln Ala Glu Val Leu Gly Glu Pro Ala Ala			
	65	70	75	80
	Ala His Arg Val Thr Ser Ala Arg Arg Ser Pro Ser Thr Thr Val Cys			
	85	90	95	
30	Ser Arg Ser Gln Lys Ala Ser Ala Val Val Ile Ser Ser Val Ser Ser			
	100	105	110	
	Val Ala Arg Val Arg Arg Ala Ser Val Ser Ser Val Asp Ala Thr Thr			

	115	120	125	
	Ala			
	<210> 15			
	<211> 273			
5	<212> DNA			
	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>			
	<400> 15			
	atggatgacc tgacgcggct ccggcgcgag cttctggacc gattcgacgt gcgggacttc	60		
	acagactggc ctccagcatc gctgcgagcc ctcatcgcgat cctacgaccc ctggatcgac	120		
10	atgacggcca gcccggcaca gcctgtatcg cccggagggc ctcgactccg actcgtgcga	180		
	ttaaccacca acccatccgc gagagcagcc cctatcgaa acgggtgggaa ctcttctgtt	240		
	tgcgctggtg agaaacagtgc cgccccacccg tag	273		
	<210> 16			
	<211> 90			
15	<212> PRT			
	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>			
	<400> 16			
	Met Asp Asp Leu Thr Arg Leu Arg Arg Glu Leu Leu Asp Arg Phe Asp			
1	1	5	10	15
20	Val Arg Asp Phe Thr Asp Trp Pro Pro Ala Ser Leu Arg Ala Leu Ile			
	20	25	30	
	Ala Thr Tyr Asp Pro Trp Ile Asp Met Thr Ala Ser Pro Pro Gln Pro			
	35	40	45	
	Val Ser Pro Gly Gly Pro Arg Leu Arg Leu Val Arg Leu Thr Thr Asn			
25	50	55	60	
	Pro Ser Ala Arg Ala Ala Pro Ile Gly Asn Gly Gly Asp Ser Ser Val			
	65	70	75	80
	Cys Ala Gly Glu Lys Gln Cys Arg Pro Pro			
	85	90		
30	<210> 17			
	<211> 234			
	<212> DNA			

<213>	Mycobacterium tuberculosis		
<400>	17		
	gtggaggtga gggctagcgc ccgcaagcac ggcataacg acgacgccc gctccacgca	60	
	taccgcaacg cgctgcgcta cgtcgaactg gaataccacg gcgaagttca actgctggtg	120	
5	atcggccccg accaaaccgg ggcgccttta gagctggtca tcccaagcaga cgaaccaccc	180	
	cgaggattatcc acgccaacgt actacgccc aagttctacg actacctgag gtga	234	
	<210> 18		
	<211> 77		
	<212> PRT		
10	<213> Mycobacterium tuberculosis		
	<400> 18		
	Val Glu Val Arg Ala Ser Ala Arg Lys His Gly Ile Asn Asp Asp Ala		
1	5	10	15
	Met Leu His Ala Tyr Arg Asn Ala Leu Arg Tyr Val Glu Leu Glu Tyr		
15	20	25	30
	His Gly Glu Val Gln Leu Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Thr Gly Arg		
	35	40	45
	Leu Leu Glu Leu Val Ile Pro Ala Asp Glu Pro Pro Arg Ile Ile His		
	50	55	60
20	Ala Asn Val Leu Arg Pro Lys Phe Tyr Asp Tyr Leu Arg		
	65	70	75

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:
 - (i) um polipeptídeo de fusão compreendendo um ou mais antígenos 5 induzidos por inanição ou um ou mais fragmentos de polipeptídeos selecionados da SEQ ID NO. 2, 4, ,6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84 e 86; ou
 - (ii) um ou mias fragmentos dos referidos polipeptídeos
- 10 2. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 1, onde os polipeptídeos induzidos por inanição ou fragmentos de polipeptídeos são fundidos em ESAT6, Ag85B, TB10.4 e/ou Ag85A, ou seus análogos, e em qualquer combinação e ordem de posição.
 - 15 3. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, caracterizada pelo fato de que é para uso profilático, uso terapêutico, uma vacina de múltiplas fases, ou para ser usada para reforçar a imunidade da vacinação de 20 BCG anterior.
 4. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que deve ser administrada intradérmica, transdérmica, subcutânea, intramuscular ou mucosamente.
 - 25 5. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende 2 diferentes polipeptídeos imunogênicos ou seus análogos.
 - 30 6. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende 3 diferentes polipeptídeos imunogênicos ou seus análogos.

7. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende 4 diferentes polipeptídeos imunogênicos ou seus análogos.

5 8. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que compreende polipeptídeos de fusão com combinações de ESAT6-Ag85A-X, ESAT6-Ag85B-X, Ag8A-X, Ag85B-X, TB10-Ag85A-X, TB10-
10 Ag85B-X onde X é qualquer um dos抗ígenos induzidos por inanição e onde a ordem das unidades de抗ígeno pode ser de qualquer combinação, por exemplo, onde a ordem é invertida ou X é posicionado no centro.

15 9. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que compreende uma seqüência de aminoácido, selecionada das seqüências de aminoácido que codificam os seguintes polipeptídeos de fusão:

Ag85B-ESAT6-Rv2660c;
Ag85B-ESAT6-Rv2659c;
Ag85B-TB10.4-Rv2660c;
Ag85B-TB10.4-Rv2659c;
20 Ag85B-Rv2660c;
Ag85B-Rv2659c;
Ag85A-Rv2660c;
Ag85A-Rv2659c
Ag85A-ESAT6-Rv2660c;
25 Ag85A-ESAT6-Rv2659c;
Ag85A-TB10.4-Rv2660c;
Ag85A-TB10.4-Rv2659c;
Rv2660c-Rv2659c;
Ag85B-ESAT6-Rv2660c-Rv2659c;

30 em qualquer ordem das unidades de polipeptídeo, ou seus análogos.

10. Polipeptídeo de fusão, caracterizado pelo fato de ser tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

11. Vacina ou composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um fragmento de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

5 12. Vacina ou composição farmacêutica como definida na reivindicação 11, caracterizada pelo fato de ser formulada para uso profilático, uso terapêutico ou ambos, uma vacina de múltiplas fases, ou a ser usada para reforçar a imunidade da vacinação de BCG anterior.

10 13. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) um ou mais抗ígenos induzidos por inanição selecionados do grupo constituído de SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84 e 86; ou

15 (ii) um ou mais fragmentos dos referidos抗ígenos.

14. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de ser formulada para uso profilático, uso terapêutico, uma vacina de múltiplas fases, ou para ser usada para reforçar a imunidade da vacinação de BCG anterior.

20 15. Composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que ser formulada para ser administrada intradérmica, transdérmica, subcutânea, intramuscular ou mucosamente.

25 16. Vacina ou composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um fragmento de ácido nucléico, que compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica um抗ígeno induzido por inanição ou fragmento deste.

30 17. Uso da composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e 11 a 16, caracterizado pelo fato de que é para produção de um medicamento para tratar tuberculose ativa ou latente causada por uma micobactéria virulenta ou para reforçar a imunidade da vacinação de BCG anterior.

18. Uso da composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e 11 a 16, caracterizado pelo fato de que é para produção de um medicamento para profilaxia contra uma infecção por micobactéria virulenta.

5 19. Uso de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que a micobactéria é selecionada de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *Mycobacterium lepra* ou *Mycobacterium ulcerans*.

10 20. Uso da composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e 11 a 16, caracterizado pelo fato de que é para produção de uma composição para administração intradérmica, transdérmica, subcutânea, intramuscular ou mucosamente.

15 21. Uso da composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e 11 a 16, caracterizado pelo fato de que é para produção de uma composição para vacinação profilaxia, vacinação reforçadora, vacinas de múltiplas fases ou vacinação terapêutica contra micobactéria.

20 22. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a micobactéria é selecionada de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium lepra* ou *Mycobacterium virulent*.

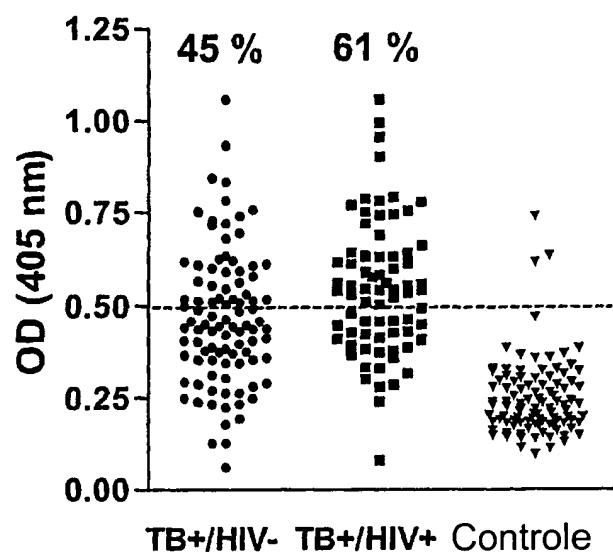


Fig.1

Fig.2

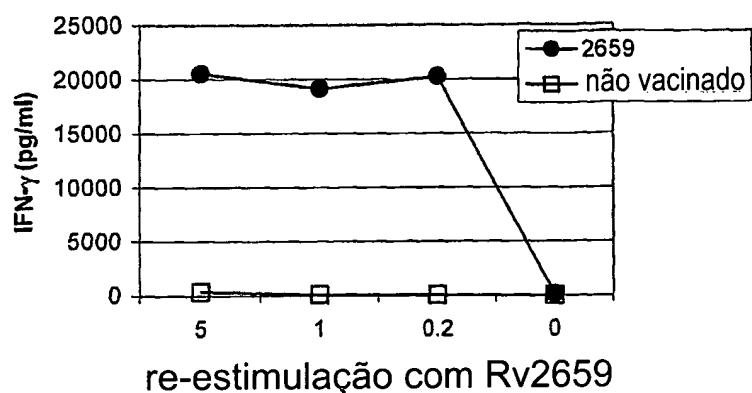
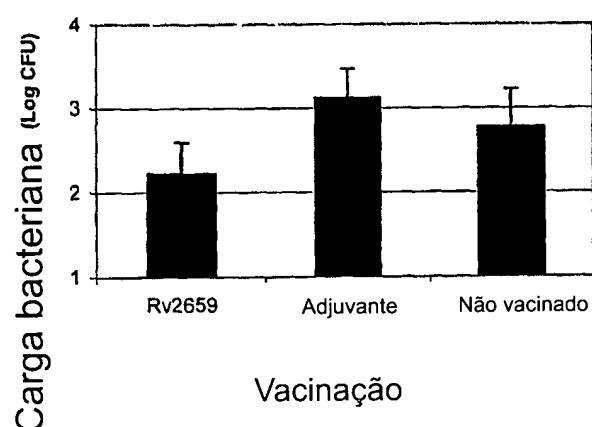


Fig.3



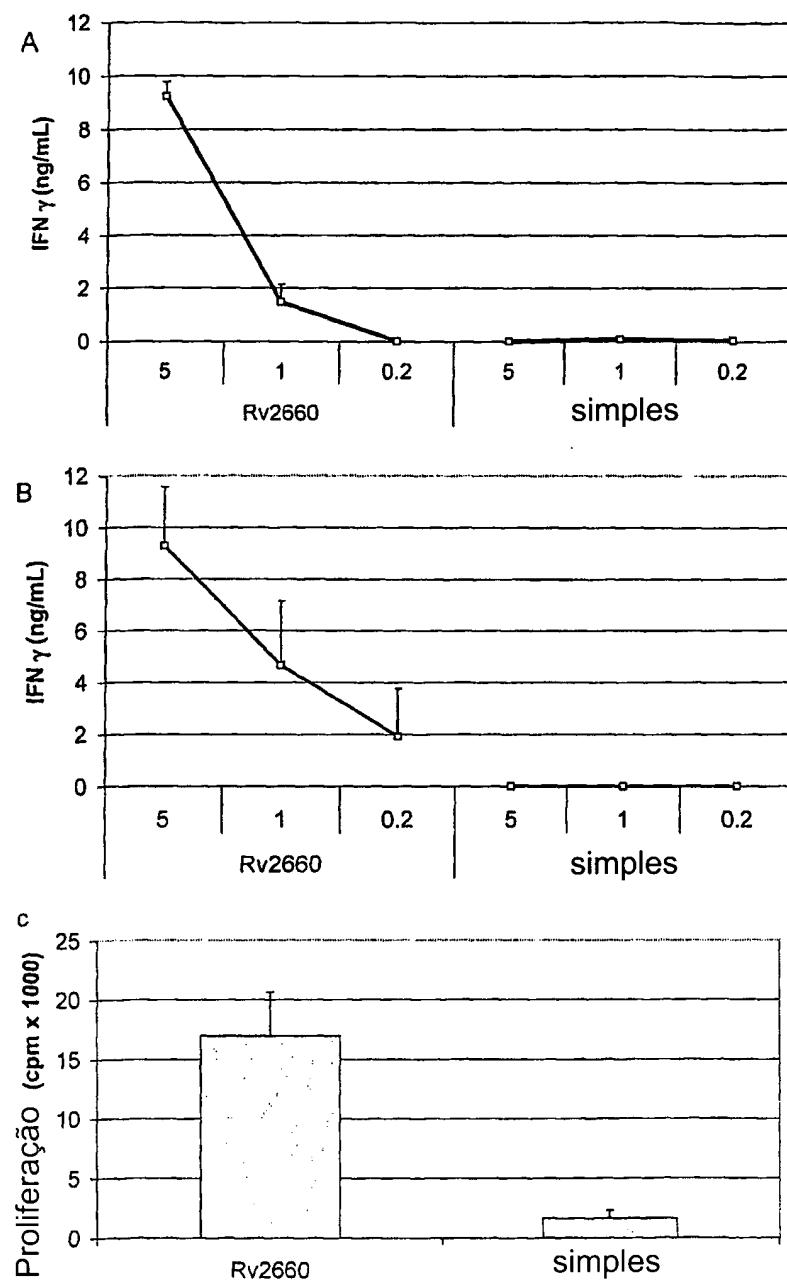


Fig.4

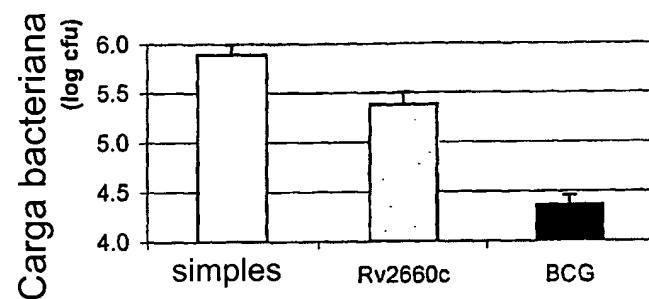


Fig.5

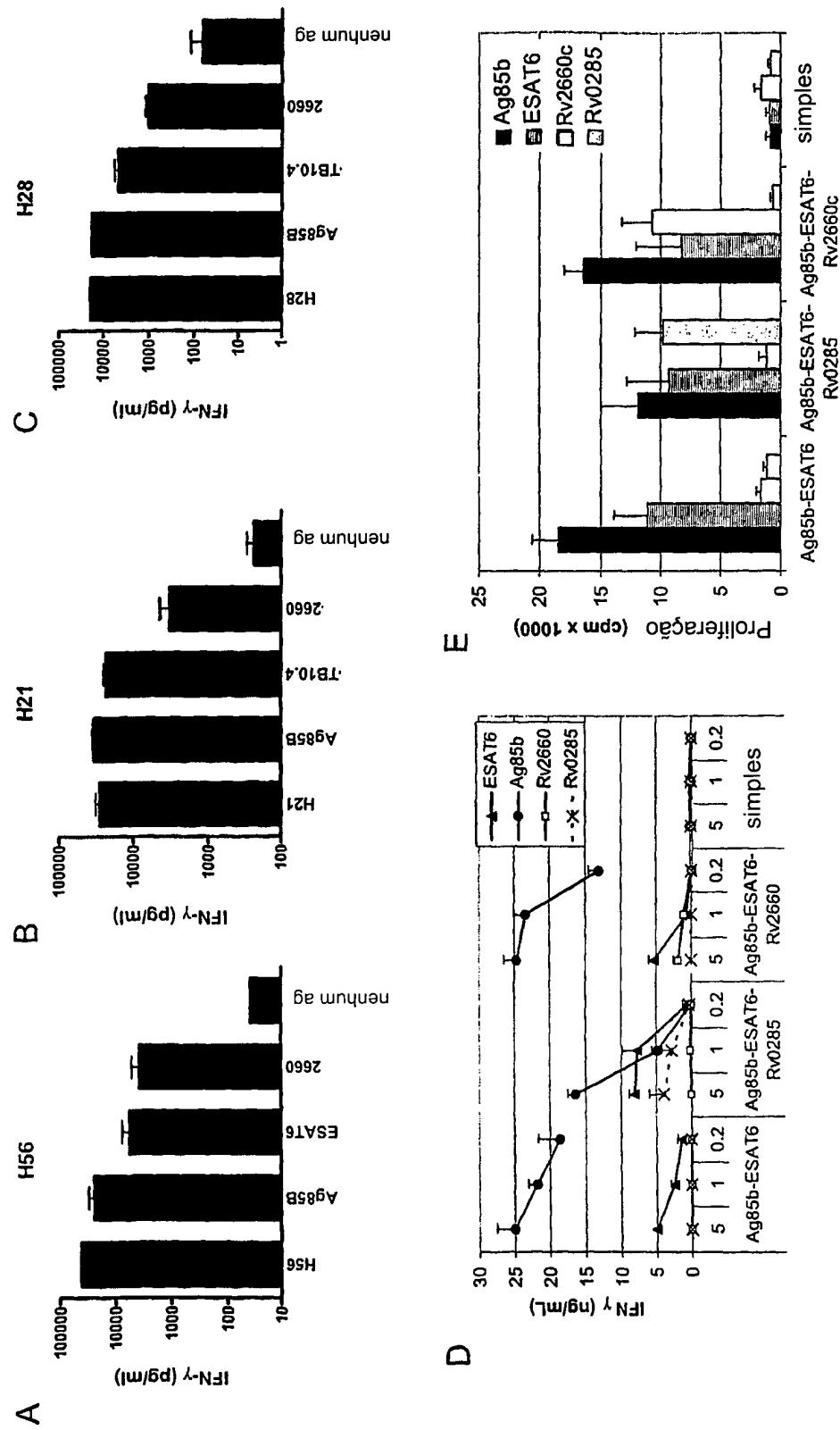


Fig.6

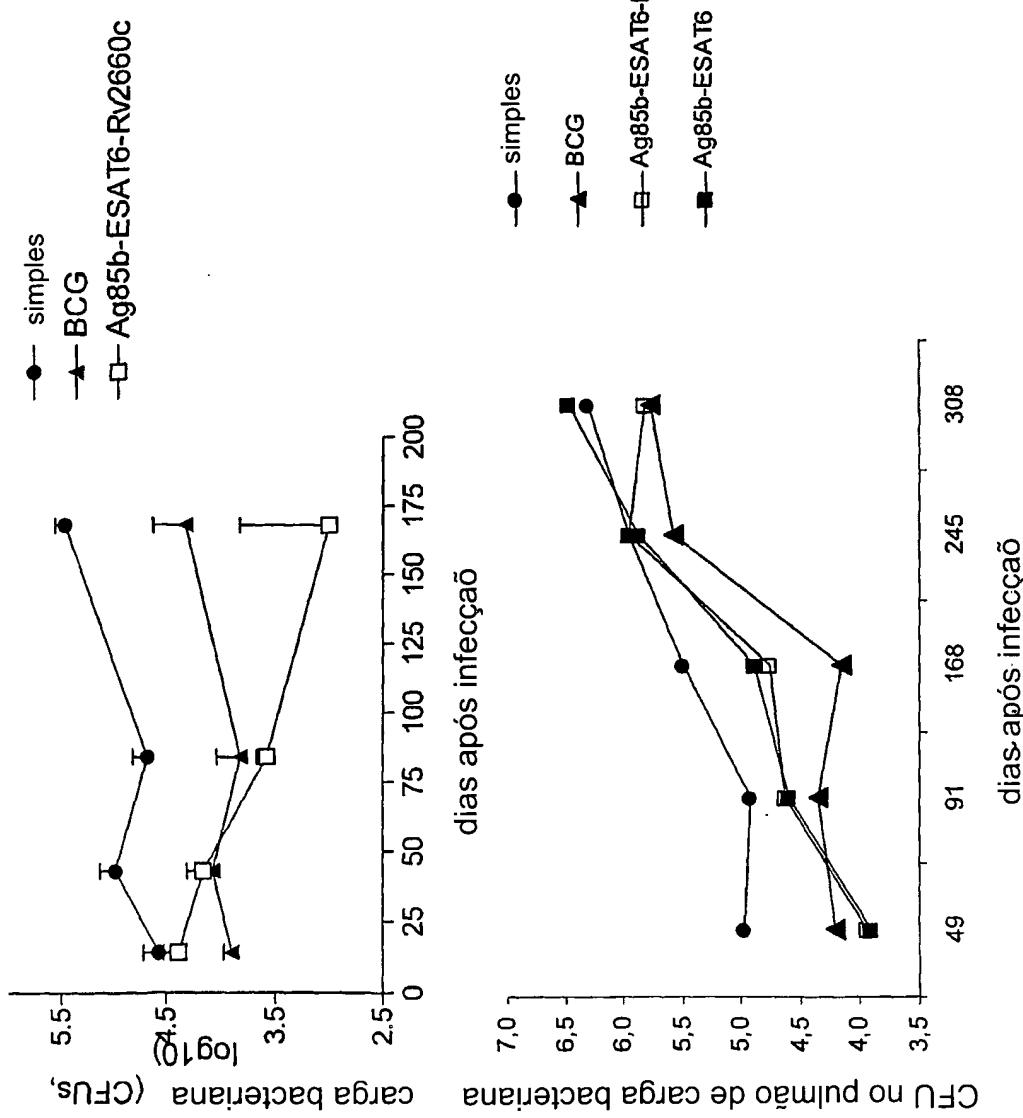
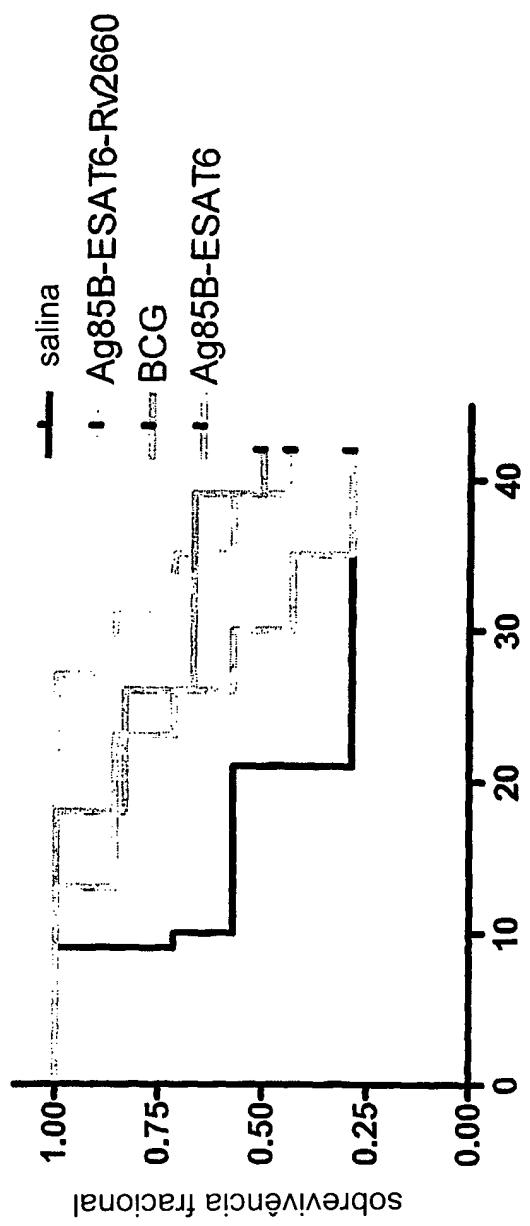


Fig.7

Estudos GP profiláticos



semanas pós provocação

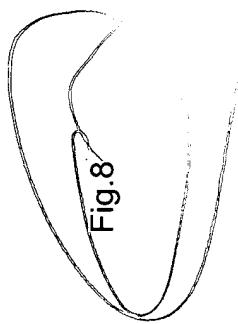


Fig. 8

8/8

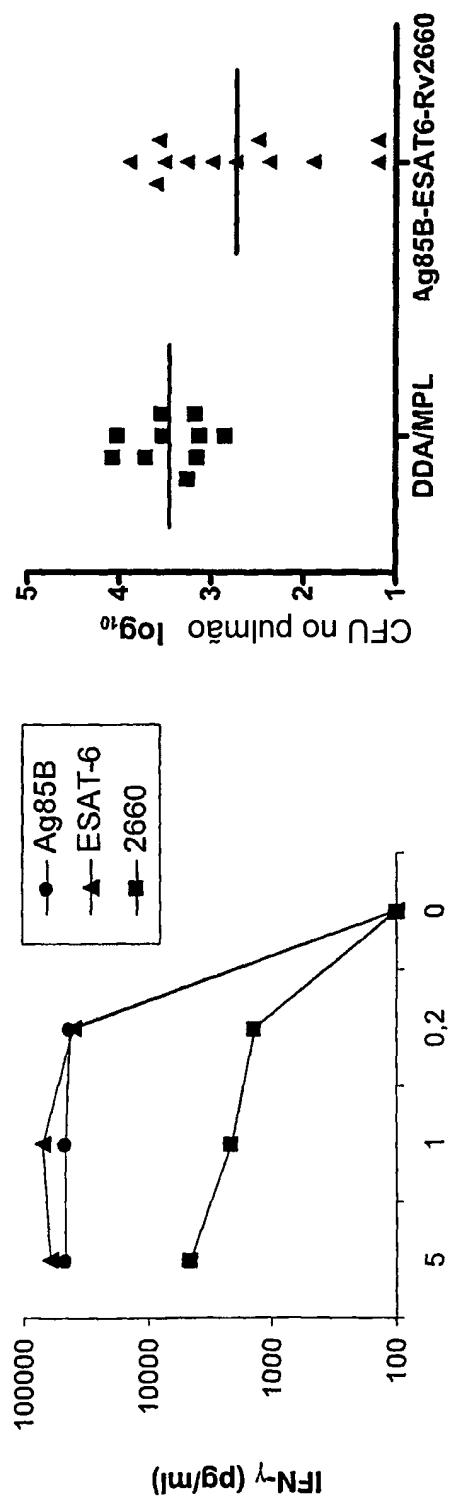


Fig.9

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO E USO DAS TRÊS PRIMEIRAS**".

5 A presente invenção refere-se a uma composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica para a prevenção, reforço ou tratamento de infecção causada por uma espécie do complexo de tuberculose (M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti). A composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica compreende um polipeptídeo de fusão, 10 que compreende um ou mais抗ígenos de inanição de M. tuberculosis, as unidades do polipeptídeo de fusão sendo抗ígenos de M. tuberculosis. Além disso, a invenção é relacionada ao uso de uma vacina que compreende uma 15 seqüência de polipeptídeo de fusão ou uma seqüência de ácido nucléico da invenção fornecida ao mesmo tempo como BCG, misturada com BCG ou administrada separadamente em sítios ou vias diferentes para a preparação de dita composição imunogênica, vacina ou composição farmacêutica.