INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 804581 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N015/30 A C07K014/44 B
A61K039/008 B C07K016/20 B

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

(22) *Data de depósito:* 1995.04.24

(30) *Prioridade:* 1994.04.22 US 232534

(43) *Data de publicação do pedido:*
1997.11.05

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.09.26

(73) *Titular(es):*
CORIXA CORPORATION
SUITE 200, 1124 COLUMBIA STREET SEATTLE, WA 98104 US

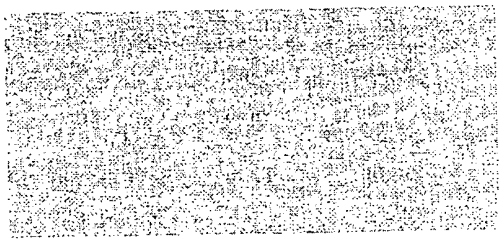
(72) *Inventor(es):*
STEVEN G. REDD US

(74) *Mandatário(s):*
FRANCISCO NOVAIS CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE ATAYDE
AVENIDA DUQUE D'ÁVILA, 32 1° AND. 1000 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* COMPOSTOS E MÉTODOS PARA A ESTIMULAÇÃO E REFORÇO DAS RESPOSTAS IMUNITÁRIAS PROTECTORAS E DA PRODUÇÃO DE IL-12

(57) *Resumo:*

COMPOSTOS E MÉTODOS PARA A ESTIMULAÇÃO E REFORÇO DAS RESPOSTAS IMUNITÁRIAS PROTECTORAS E DA PRODUÇÃO DE IL-12



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 21 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 808 200 689
Fax: 21 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

INPI
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. ☐ MOD. UTI. ☐ MOD. IND. ☐ N.º Objectos ☐ DES. IND. ☐ N.º Desenhos ☐ TOP. SEMIC. ☐

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)

N.º ☐ (11) DATA DO PEDIDO —/—/— (22)

REQUERENTE (71)
(NOME E MORADA)
CORIXA CORPORATION,
1124 Columbia Street, Suite 200,
Seattle, WA 98104
CÓDIGO POSTAL
E.U.A.

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)

Steven G. Reed,
Bellevue, WA 98005,
E.U.A.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO
22.Abril.1994	E.U.A.	232534

FIGURA (para interpretação do resumo)

EPÍGRAFE (54)
"COMPOSTOS E MÉTODOS PARA A ESTIMULAÇÃO E REFORÇO DAS RESPOSTAS IMUNITÁRIAS PROTECTORAS E DA PRODUÇÃO DE IL-12"

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

SOCIEDADE TIPOGRÁFICA, S.A.
Soctip

DESCRIÇÃO

EPÍGRAFE:	**"COMPOSTOS E MÉTODOS PARA A ESTIMULAÇÃO E REFORÇO DAS RESPOSTAS IMUNITÁRIAS PROTECTORAS E DA PRODUÇÃO DE IL-12"**

Campo Técnico

O presente invento relaciona-se de modo geral com compostos e métodos para a estimulação de respostas imunitárias em pacientes, assim como em células isoladas e em culturas celulares, e para a avaliação de pacientes infectados por *Leishmania*. O invento relaciona-se mais particularmente com compostos contendo o todo ou uma parte de um antigénio de *Leishmania braziliensis* (LbelF4A), que é um homólogo do factor eucariótico de iniciação 4A (eIF4A), e com o uso de tais compostos para a estimulação de uma resposta imunitária TH1.

Antecedentes do Invento

Os protozoários *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios dos macrófagos que causam uma larga gama de doenças humanas, incluindo lesões da pele que cicatrizam espontaneamente, manifestações cutâneas e mucosas difusas e doença visceral grave. O número de casos de leishmaníase aumentou marcadamente nos últimos 20 anos, sendo diagnosticados cerca de 2 milhões de novos casos em cada ano. Existem agora milhões de novos casos da doença espalhados por todo o mundo, principalmente no Brasil, China, África Oriental, Índia e em áreas do Médio-Oriente. A doença é igualmente endémica na região do Mediterrâneo, incluindo o sul de França, Itália, Grécia, Espanha, Portugal e Norte de África.

Existem 20 espécies de Leishmania que infectam o homem. Entre estas espécies, *Leishmania braziliensis* é normalmente causadora de leishmaníase

cutânea localizada (CL). Os pacientes com CL manifestam fortes reacções de hipersensibilidade retardada (DTH) e respostas proliferativas *in vitro* a antigénios de *Leishmania,* tanto durante a fase activa como após a cura da doença. A maioria dos pacientes com CL curam-se espontaneamente. No entanto, em alguns indivíduos infectados, desenvolve-se uma leishmaníase cutânea ou mucosa activa (ML), a qual é caracterizada por uma destruição grave e progressiva das membranas mucosas nasais, orais e/ou faríngeas. As últimas indicações sugerem que a IL-12, que tem a capacidade de induzir o desenvolvimento de células efectoras TH1, poderá constituir um auxiliar na cura da infecção por *L. major* (ver Trinchieri, *Immunol. Today 14*:335-337, 1993).

Os promastigócitos parecem ser os mais susceptíveis às respostas imunitárias mediadas por macrófagos, e verificou-se que os promastigócitos não induzem a produção de IL-12 (ver Reiner et al, *J. Exp. Med. 179*:447-456, 1994).

O diagnóstico precoce da leishmaníase poderá ser crítico para um tratamento bem sucedido, mas é difícil de conseguir, uma vez que não existem sinais ou sintomas distintivos da doença. Têm sido usados métodos de detecção dos parasitas, mas esses métodos não são sensíveis nem práticos. Os actuais testes serológicos (usando, por exemplo, técnicas de ELISA ou imunofluorescência) utilizam tipicamente parasitas íntegros ou lisados, e são geralmente insensíveis e susceptíveis de reacções cruzadas com uma variedade de outras doenças. Para além disto, tais métodos são frequentemente incapazes de detectar a doença potencialmente fatal numa fase suficientemente precoce para permitir um tratamento eficaz, já que dependem da detecção de anticorpos que se encontram presentes durante a fase aguda da doença.

No caso da doença activa das mucosas, o teste cutâneo intradérmico e as respostas de proliferação de linfócitos face aos antigénios de *Leishmania* são excepcionalmente fortes. De facto, é possível que a destruição dos tecidos que se encontra associada às lesões das mucosas resulte em parte de uma resposta de hipersensibilidade aos antigénios de *Leishmania.* No entanto, não foram ainda caracterizados os antigénios específicos que estão envolvidos na resposta imunitária a *Leishmania* mediada por células.

Deste modo, existe ainda a necessidade de caracterizar os antigénios de *Leishmania* que se encontram envolvidos nas respostas imunitárias e de determinar o seu papel na manifestação da doença. È igualmente necessária a identificação de métodos melhorados para a avaliação de pacientes em estádios precoces da doença e para o tratamento da leishmaníase. O presente invento responde a estas necessidades e oferece ainda outras vantagens relacionadas.

Resumo do Invento

Numa descrição breve, o presente invento fornece compostos e métodos relacionados com o antigénio de *Leishmania* LbeIF4A, o qual é homólogo da proteína eucariótica ribossomal eIF4A. Num dos aspectos do invento, são fornecidas moléculas de DNA compreendendo sequências de DNA que codificam para o LbeIF4A, ou porções destas, ou outras variantes. Tais sequências de DNA são seleccionadas a partir do grupo que consiste em: (a) nucleótidos 115 a 1323 da SEQ ID NO:1; (b) sequências de DNA que se hibridizam com uma sequência de nucleótidos que é complementar aos nucleótidos 115 a 1323 da SEQ ID NO:1 sob condições rigorosas, sendo que a sequência de DNA codifica para um polipéptido que estimula uma resposta imunitária Th1 em células mononucleares do sangue periférico de um indivíduo infectado por Leishmania; e (c) DNA que codifica para um polipéptido codificado por qualquer uma das sequências de DNA referidas.

Em outros aspectos relacionados, o presente invento proporciona vectores recombinantes de expressão compreendendo moléculas de DNA como as descritas acima, células hospedeiras transformadas ou transfectadas com tais vectores de expressão e um processo de preparação de um polipéptido codificado por uma molécula de DNA acima descrita, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira transformada ou transfectada sob condições que promovam a expressão e a recuperação do polipéptido. São igualmente fornecidos polipéptidos purificados que compreendem uma sequência de aminoácidos codificada por uma molécula de DNA acima descrita, ou os aminoácidos 49-103 da SEQ ID NO:2 (ou uma sua variante que varia apenas em substituições e/ou modificações conservativas).

Adicionalmente, são apresentados anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a tais polipéptidos.

Em outro aspecto do invento, é fornecido um método para a avaliação da capacidade de desenvolvimento de uma resposta imunitária por parte de um paciente, compreendendo a colocação em contacto de uma amostra biológica obtida de um paciente com um polipéptido como os descritos e a medição da resposta das células. A amostra biológica poderá compreender células mononucleares do sangue periférico, monócitos, células B, células dendríticas, macrófagos ou combinações destas. A resposta que é medida poderá ser (1) uma resposta proliferativa; (2) a secreção de uma ou mais citocinas tais como o Interferão-γ, a Interleucina-2, a subunidade p70 da Interleucina-12, a subunidade p40 da Interleucina-12, a Interleucina-1 ou o Factor de Necrose de Tumores-α; ou (3) a expressão de mRNA que codifique para uma ou mais citocinas tais como o Interferão-γ, a Interleucina-2, a subunidade p40 da Interleucina-12, a Interleucina-1 ou o Factor de Necrose de Tumores-α.

Ainda em outro aspecto do invento, são fornecidos métodos para reforçar uma resposta imunitária celular e/ou humoral a um antigénio num paciente, compreendendo a administração de um polipéptido como acima descrito e de um antigénio a um paciente. O polipéptido poderá ser administrado em combinação com uma preparação de antigénio heterólogo ou em combinação com outros antigénios de *Leishmania*. Num aspecto relacionado, o presente invento proporciona métodos para a estimulação, num paciente, da produção de anticorpos que se ligam aos parasitas de *Leishmania*, compreendendo a administração a um paciente de um polipéptido como os aqui descritos.

Em outros aspectos, são fornecidos métodos para a estimulação de uma resposta imunitária Th1, a produção de IL-12 e/ou a regulação negativa da expressão de Interleucina-10 num paciente, compreendendo a administração a um paciente de um polipéptido como os aqui descritos. Num aspecto relacionado, são proporcionados métodos para a estimulação de uma resposta imunitária Th1, a produção de IL-12 e/ou a regulação negativa da expressão de Interleucina-10 numa amostra biológica, compreendendo a colocação em contacto da amostra biológica

com um polipéptido como os aqui descritos. A amostra biológica poderá compreender células mononucleares do sangue periférico, monócitos, células B, células dendríticas, macrófagos ou combinações destes.

Em outro aspecto, este invento fornece métodos para a determinação da adequabilidade de um antigénio para a preparação de uma composição de vacina, o que compreende determinar se o antigénio tem a capacidade de estimular a produção de Interleucina-12 por células tais como as células mononucleares do sangue periférico ou os macrófagos obtidos a partir de um indivíduo não infectado por *Leishmania*.

No âmbito de outros aspectos do invento, são igualmente fornecidas composições farmacêuticas compreendendo um polipéptido tal como os aqui descritos e um veículo fisiologicamente aceitável, e vacinas compreendendo um polipéptido tal como os aqui descritos e um antigénio.

Em ainda outro aspecto do invento, são proporcionados métodos para o tratamento de um paciente afectado por uma doença que responda à estimulação da IL-12, compreendendo a administração a um paciente de um polipéptido como os aqui descritos.

Este e outros aspectos do presente invento tornar-se-ão evidentes por referência à descrição detalhada e aos esquemas em anexo que se seguem.

Breve Descrição dos Esquemas

A Figura 1 apresenta o resultado da análise por Southern Blot do DNA de *Leishmania spp.*, indicando que o homólogo eIF4A de *Leishmania* é conservado e que o DNA genómico de *L. braziliensis* contém pelo menos duas cópias de LbeIF4A.

A Figura 2 mostra os resultados de uma análise por Imunoblot que demonstra que o soro de coelho imunizado com LbeIF4A reage com uma proteína dominante, de uma dimensão de ~45 kDa, em diferentes espécies de *Leishmania*.

A Figura 3 ilustra a capacidade evidenciada pela LbeIF4A recombinante purificada para estimular a proliferação de CMSPs (Células Mononucleares do Sangue Periférico) em indivíduos infectados com *L. braziliensis*.

As Figuras 4A e 4B apresentam os resultados obtidos por análise dos padrões de expressão de mRNA de citocinas pelas CMSPs de pacientes com casos confirmados de infecção por *L. braziliensis*.

A Figura 5 ilustra as concentrações detectadas no sobrenadante de IFN-γ secretado pelas CMSPs de indivíduos infectados com *L. braziliensis* após estimulação com LbeIF4A ou lisado de parasitas.

A Figura 6 apresenta as concentrações de TNF-α detectadas nos sobrenadantes de CMSPs de indivíduos infectados por *L. braziliensis* após estimulação com LbeIF4A ou lisado de parasitas.

As Figuras 7A-7D mostram que a LbeIF4A estimula igualmente as CMSPs dos pacientes a secretar IL-12 para o sobrenadante da cultura numa quantidade consideravelmente superior relativamente à secreção de IL-12 estimulada por lisado de parasitas, e que a IL-10 inibe esta produção de Il-12.

As Figuras 8A e 8B demonstram que a produção de IFN-γ dependia da IL-12 e era inibida pela IL-10 em todas as CMSPs de pacientes testadas.

As Figuras 9A e 9B mostram que a LbeIF4A estimula a produção de IL-12 em culturas de macrófagos humanos e em CMSPs aderentes.

A Figura 10 indica que a LbeIF4A estimula a produção de IL-12 na linha celular THP-1 de leucemia mielóide humana e actua sinergicamente com o IFN-γ na estimulação das células THP-1 para a secreção de IL-12.

A Figura 11 apresenta resultados que indicam que as células dos nódulos linfáticos de ratinhos activados com LbeIF4A proliferam e secretam um perfil de citocinas quase exclusivamente Th1, enquanto que as células dos nódulos linfáticos de ratinhos activados com outro antigénio recombinante de *L. braziliensis* (8E) produziram um perfil de citocinas de tipo Th0 ou Th1/Th2, dependendo do adjuvante usado, enquanto que os ratinhos activados com lisado de parasitas produziram um perfil de citocinas misto.

A Figura 12 demonstra que a LbeIF4A proporciona uma protecção significativa contra a infecção por *L. major* num modelo animal reconhecido como relevante para a doença humana.

Descrição Detalhada do Invento

Tal como acima referido, o presente invento é dirigido a compostos e métodos úteis para a avaliação de pacientes e para a estimulação e reforço de respostas imunitárias em pacientes, assim como em células isoladas e culturas celulares. Os compostos deste invento compreendem geralmente um polipéptido que estimula uma resposta imunitária Th1 nas células mononucleares do sangue periférico (CMSPs), ou uma sequência de DNA que codifica para um tal polipéptido. Em particular, são apresentados polipéptidos compreendendo toda a molécula ou uma porção estimuladora de um homólogo de *Leishmania braziliensis* da proteína eucariótica ribossomal eIF4A (aqui referenciado como LbeIF4A). Tal como aqui é usado, o termo "CMSPs" refere-se a preparações de células nucleadas que se encontram presentes no sangue periférico. O termo "polipéptido", no contexto deste invento, abrange cadeias de aminoácidos de qualquer extensão, incluindo tanto proteínas na sua extensão total como porções destas, sendo que os resíduos de aminoácidos se encontram ligados entre si através de ligações peptídicas covalentes. Assim, um "polipéptido LbeIF4A" compreende a LbeIF4A, ou uma porção ou outra variante desta que retém a actividade estimuladora. De preferência, os polipéptidos encontram-se substancialmente isentos de materiais contaminantes endógenos. É igualmente exposto o uso de tais polipéptidos para a avaliação de respostas imunitárias de pacientes e para a estimulação ou reforço de uma variedade de respostas imunitárias.

Os polipéptidos do presente invento incluem variantes da LbeIF4A que retêm a capacidade de estimular uma resposta imunitária Th1 por parte das CMSPs. Tais variantes incluem várias formas estruturais da proteína primária. Devido à presença de grupos amino e carboxilo ionizáveis, por exemplo, um polipéptido LbeIF4A poderá encontrar-se sob a forma de sal acídico ou básico, ou poderá estar na forma neutra. Os resíduos individuais de aminoácidos poderão ser igualmente modificados por oxidação ou redução.

As variantes no âmbito deste invento incluem igualmente polipéptidos nos quais a estrutura primária de aminoácidos da LbeIF4A, ou de um seu fragmento, sofreu uma modificação através da formação de conjugados covalentes ou

agregativos com outros polipéptidos ou grupos químicos tais como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo e semelhantes. Poderão preparar-se derivados covalentes, por exemplo, ligando grupos funcionais particulares a cadeias laterais de aminoácidos ou às extremidades N- ou C-. Alternativamente, nos derivados em que um polipéptido se encontra ligado a um polipéptido LbeIF4A, poderá ser preparada uma proteína de fusão usando DNA recombinante, tal como abaixo se descreve. Numa tal forma de realização, o polipéptido LbeIF4A poderá ser conjugado com uma sequência polipeptídica de sinal (ou leader) a nível da região N-terminal da proteína, que, durante a tradução ou após esta, dirige a transferência da proteína do seu local de síntese para o seu local funcional, no interior ou no exterior da membrana celular ou da parede celular (p.ex., o leader do factor α das leveduras).

As proteínas de fusão abrangidas pelo presente invento poderão igualmente conter péptidos adicionados para facilitar a purificação ou a identificação de polipéptidos LbeIF4A (p.ex., poli-His). Por exemplo, o péptido descrito por Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204 (1988) é um péptido altamente antigénico que poderá ser usado para facilitar a identificação. Um tal péptido fornece um epitopo a que se liga reversivelmente um anticorpo monoclonal específico, permitindo um ensaio analítico rápido e uma fácil purificação da proteína recombinante expressa. A sequência de Hopp et al. é também cortada especificamente pela enteroquinase de mucosa bovina, o que permite a remoção do péptido, destacando-o da proteína purificada. As proteínas de fusão protegidas com tais péptidos poderão igualmente mostrar-se resistentes à degradação intracelular em *E. coli*.

As proteínas de fusão abrangidas pelo presente invento incluem ainda, por exemplo, polipéptidos LbeIF4A ligados a uma região Fc de imunoglobulina. Se as proteínas de fusão LbeIF4A forem preparadas usando tanto as cadeias pesadas como as leves de um anticorpo, será possível formar um oligómero de proteína contendo até quatro regiões de proteína LbeIF4A. Encontram-se igualmente no âmbito do presente invento polipéptidos LbeIF4A ligados a um domínio de fecho ("zipper") de leucina. Os domínios de fecho de leucina encontram-se descritos, por exemplo, no pedido de patente publicado PCT WO 94/10308. Os polipéptidos LbeIF4A contendo fechos de leucina poderão, por exemplo, ser oligoméricos,

diméricos ou triméricos. Todas as proteínas de fusão acima referidas poderão ser preparadas por ligação química ou sob a forma de proteínas de fusão, como abaixo descrito.

O presente invento inclui igualmente polipéptidos LbeIF4A com ou sem glicosilação de padrão nativo associada. Os polipéptidos expressos em sistemas de expressão de levedura ou mamífero poderão ser semelhantes ou ligeiramente diferentes em termos de peso molecular e de padrão de glicosilação relativamente às moléculas nativas, dependendo do sistema de expressão. Por exemplo, a expressão de DNA codificando para os polipéptidos LbeIF4A em bactérias como a *E. coli* fornece moléculas não glicosiladas. Os locais de N-glicosilação das proteínas eucarióticas são caracterizados pelo tripleto de aminoácidos Asn-A_1-Z, em que A_1 representa qualquer aminoácido com excepção de Pro, e Z é Ser ou Thr. No âmbito deste invento poderão ainda produzir-se variantes de polipéptidos LbeIF4A com locais de N-glicosilação inactivados, recorrendo-se a métodos conhecidos dos técnicos neste campo, tais como a síntese e ligação de oligonucleótidos ou as técnicas de mutagénese específica de local. Alternativamente, poderão adicionar-se locais de N-glicosilação a um polipéptido LbeIF4A.

Os polipéptidos deste invento incluem igualmente variantes de polipéptidos LbeIF4A que possuem uma sequência de aminoácidos diferente da encontrada na proteína LbeIF4A nativa por terem ocorrido uma ou mais delecções, inserções, substituições ou outras modificações. Tais variantes deverão ser substancialmente homólogas à LbeIF4A nativa e deverão reter a capacidade de estimular uma resposta imunitária Th1 a nível das CMSPs. O termo "homologia substancial", tal como aqui é usado, refere-se a sequências de aminoácidos que poderão ser codificadas por sequências de DNA capazes de se hibridizar, sob condições moderadamente rigorosas, com uma sequência de DNA de ocorrência natural que codifique para a LbeIF4A. As condições moderadamente rigorosas adequadas incluem a pré-lavagem numa solução de 5 X SCC, SDS a 5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridização a 50°C-65°C, 5 X SCC, durante 12 h; seguindo-se duas lavagens a 65°C durante 20 minutos, cada lavagem com 2X, 0,5X e 0,2X SSC contendo SDS a 0,1%. Estas sequências hibridizantes de DNA encontram-se igualmente no âmbito

deste invento, tal como as sequências nucleotídicas que, devido a degeneração do código, codificam para um polipéptido estimulatório que é codificado por uma sequência hibridizante de DNA. O efeito de tais modificações sobre a actividade de um polipéptido LbeIF4A poderá ser facilmente determinado através da análise da capacidade, evidenciada pelo péptido LbeIF4A mutante, para induzir uma resposta Th1 usando, por exemplo, qualquer dos métodos aqui descritos.

De modo geral, as substituições de aminoácidos devem ser feitas de modo conservativo; i.e., um aminoácido substituto deve substituir um aminoácido que possua propriedades semelhantes, de tal modo que induza um perito no campo da química de péptidos a esperar que a estrutura secundária e a natureza hidropática do polipéptido se mantenham substancialmente inalterados. Em geral, os seguintes grupos de aminoácidos representam modificações conservativas: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; e (5) phe, tyr, trp, his. As variantes contidas no âmbito deste invento poderão também, ou alternativamente, conter outras modificações, incluindo a delecção ou adição de aminoácidos, que exerçam uma influência mínima sobre as propriedades estimulatórias, a estrutura secundária e a natureza hidropática do polipéptido. Em geral, os fragmentos de LbeIF4A poderão ser construídos através da delecção de resíduos ou sequências terminais ou internos. Poderão obter-se orientações adicionais relativamente a modificações adequadas por comparação da sequência de LbeIF4A com as sequências e estruturas de outros membros da família eIF4A. Por exemplo, os resíduos ou sequências terminais ou internos da LbeIF4A que não sejam necessários à actividade biológica poderão ser alvo de delecção. Os resíduos de cisteína poderão ser retirados ou substituídos por outros aminoácidos para prevenir a formação de pontes intramoleculares dissulfureto incorrectas durante a renaturação. Outras abordagens à mutagénese envolvem a modificação de resíduos de aminoácidos dibásicos adjacentes para realçar a expressão em sistemas de leveduras nos quais a actividade proteásica KEX2 se encontra presente.

Poderá geralmente obter-se uma proteína LbeIF4A completa usando um clone genómico ou de cDNA codificando para a proteína. É mostrada em SEQ ID

NO:1 uma sequência genómica que codifica para a LbeIF4A de extensão completa, e a sequência de aminoácidos deduzida é apresentada em SEQ ID NO:2. Tais clones poderão ser isolados pesquisando, numa biblioteca de expressão de *Leishmania braziliensis* apropriada, clones que expressem antigénios que reajam com o soro de um paciente afectado por leishmaníase mucosa, e analisando então os antigénios reactivos quanto à capacidade de estimular respostas proliferativas e a produção preferencial de citocinas Th1 em ensaios com células T de pacientes. A preparação da biblioteca e a sua pesquisa poderão de modo geral ser efectuadas utilizando métodos familiares aos técnicos de perícia média, tais como os métodos descritos em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Abreviadamente, uma biblioteca de expressão de bacteriófagos poderá ser plaqueada e transferida para filtros. Os filtros poderão então ser incubados com soro e um agente de detecção. No contexto deste invento, um "agente de detecção" é qualquer composto capaz de se ligar ao complexo de antigénio-anticorpo, o qual pode então ser detectado por qualquer um de uma variedade de meios conhecidos dos técnicos de perícia média. Os reagentes de detecção típicos contêm um "agente ligante", tal como a Proteína A, a Proteína G, uma IgG ou uma lectina, acoplado a um grupo repórter. Os grupos repórter preferidos incluem enzimas, substratos, cofactores, inibidores, corantes, radionuclídeos, grupos luminescentes,ntes, gruporescentes e biotina. Mais preferencialmente, o grupo repórter é a peroxidase de rábano, que pode ser detectada por incubação com um substrato tal como a tetrametilbenzidina ou o ácido 2,2'-azino-di-3-etilbenztiazolinasulfónico. As placas contendo sequências genómicas ou de cDNA que expressem uma proteína que se ligue a um antigénio do soro são isoladas e purificadas por técnicas conhecidas dos técnicos de perícia média. Poderão encontrar-se métodos apropriados em, por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Os ensaios com células T de pacientes podem de modo geral ser efectuados tratando as CMSPs do paciente com os antigénios reactivos e analisando as células para verificar se produzem uma resposta adequada. Por exemplo, o sobrenadante

das CMSPs poderá ser ensaiado quanto à concentração de citocinas secretadas. De preferência, a citocina ensaiada é o Interferão-γ, a Interleucina-2, a Interleucina-12 (tanto a subunidade p40 como a subunidade biologicamente activa p70), a Interleucina-1 ou o Factor de Necrose de Tumores-α. As citocinas poderão ser ensaiadas, por exemplo, usando anticorpos comercialmente disponíveis específicos para a citocina de interesse num formato de ELISA, sendo os resultados positivos determinados de acordo com as instruções do fabricante. Poderão obter-se anticorpos adequados consultando, por exemplo, as empresas Chemicon, Temucula, CA e PharMingen, San Diego, CA. Alternativamente, as CMSPs poderão ser ensaiadas quanto ao mRNA que codifica para uma ou mais das citocinas Interferão-γ, Interleucina-2, subunidade p40 da Interleucina-12, Interleucina-1 ou Factor de Necrose de Tumores-α, ou poderão avaliar-se as CMSPs quanto a uma resposta proliferativa, tal como aqui é descrito.

Poderão identificar-se variantes da LbeIF4A que retêm a capacidade de estimular uma resposta Th1 nas CMSPs através da modificação da sequência em um ou mais dos aspectos acima descritos e da análise do polipéptido resultante quanto à capacidade de estimular uma resposta Th1. Tais ensaios podem geralmente ser realizados tratando as CMSPs do paciente com o polipéptido modificado e ensaiando a resposta, tal como acima descrito.

As modificações de sequência acima descritas poderão ser introduzidas por meio de técnicas recombinantes típicas ou através da síntese automatizada do polipéptido modificado. Por exemplo, poderão ser introduzidas mutações a nível de loci particulares através da síntese de oligonucleótidos que contenham uma sequência mutante, flanqueada por locais de restrição que permitam a ligação a fragmentos da sequência nativa. Após a ligação, a sequência reconstruída resultante codifica para um análogo que possui a inserção, substituição ou delecção de aminoácido desejada.

Alternativamente, poderão ser utilizados procedimentos de mutagénese específica de local dirigida a oligonucleótidos para produzir um gene no qual certos codões particulares foram alterados de acordo com a substituição, delecção ou inserção desejada. São apresentados métodos exemplificativos de como proceder

às alterações acima referidas em Walder et al., *Gene 42*:133, 1986; Bauer et al., *Gene 37*:73, 1985; Craik, *BioTechniques*, Jan 1985, 12-19; Smith et al., *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981; e as patentes dos E.U.A. nos. 4.518.584 e 4.737.462.

As mutações nas sequências nucleotídicas construídas para a expressão de tais polipéptidos LbeIF4A terão, como é evidente, que preservar o molde de leitura das sequências codificantes, e de preferência não criarão regiões complementares que se poderiam hibridizar produzindo estruturas secundárias de mRNA, tais como ansas ou ganchos (hairpin loops), as quais poderiam afectar de modo adverso a tradução do mRNA receptor. Se bem que um local de mutação possa ser pré-determinado, não é necessário que a natureza da mutação *per se* seja pré-determinada. Por exemplo, ao pretender-se seleccionar características óptimas de mutantes em um dado local, poderá efectuar-se uma mutagénese ao acaso a nível do codão-alvo, sendo então avaliados quanto à actividade desejada os mutantes das proteínas LbeIF4A expressos.

Nem todas as mutações numa sequência nucleotídica que codifique para uma proteína LbeIF4A serão expressas no produto final. Por exemplo, poderão realizar-se substituições de nucleótidos para aumentar a expressão, primariamente para evitar ansas na estrutura secundária do mRNA transcrito (ver, p.ex., o Pedido de Patente Europeia 75.444A), ou para proporcionar codões que sejam mais facilmente traduzidos pelo hospedeiro seleccionado, tal como os bem conhecidos codões de preferência de *E. coli* para a expressão em *E. coli*.

Os polipéptidos do presente invento, tanto os de ocorrência natural como os modificados, são de preferência produzidos por métodos de DNA recombinante. Tais métodos incluem a inserção de uma sequência de DNA codificando para um polipéptido LbeIF4A num vector de expressão e a expressão da sequência de DNA num sistema microbiano recombinante de expressão sob condições que promovam a expressão. As sequências de DNA que codificam para os polipéptidos deste invento poderão ser produzidas a partir de fragmentos de cDNA e de linkers oligonucleotídicos curtos, ou a partir de uma série de oligonucleótidos, para se obter

um gene sintético com a capacidade de ser inserido num vector recombinante de expressão e de ser expresso numa unidade recombinante de transcrição.

Os vectores recombinantes de expressão contêm uma sequência de DNA codificando para um polipéptido LbeIF4A operativamente ligado a elementos reguladores da transcrição ou da tradução adequados, derivados de genes de mamíferos, microbianos, virais ou de insectos. Tais elementos reguladores incluem um promotor da transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar a transcrição, uma sequência codificando para locais adequados de ligação do mRNA ao ribossoma, e sequências que controlem a terminação da transcrição e tradução, tal como abaixo se descreve em detalhe. Poderá ainda incorporar-se uma origem de replicação e um marcador seleccionável para facilitar o reconhecimento dos transformantes.

Duas regiões de DNA encontram-se ligadas de forma operativa quando se relacionam funcionalmente entre si. Por exemplo, o DNA de um péptido de sinal (leader de secreção) está ligado de forma operativa ao DNA de um polipéptido se for expresso sob a forma de um precursor que participa na secreção do polipéptido; um promotor está ligado de forma operativa a uma sequência codificante se se verificar que controla a transcrição da sequência; ou um local de ligação ao ribossoma está ligado de forma operativa a uma sequência codificante se estiver posicionado de forma a permitir a tradução. Geralmente, uma ligação operativa significa que os elementos estão contíguos e, no no caso leaders de secreção, que se encontram no molde de leitura. As sequências de DNA que codificam para os polipéptidos LbeIF4A que serão expressos num microorganismo não conterão, de preferência, introns que poderiam terminar prematuramente a transcrição do DNA para mRNA.

Os vectores de expressão para uso em bactérias poderão compreender um marcador seleccionável e uma origem de replicação bacteriana, derivada de plasmídeos, comercialmente disponíveis, que incluem elementos genéticos do bem conhecido vector de clonagem pBR322 (ATCC 37017). Tais vectores comerciais incluem, por exemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) e pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Estas secções de "coluna vertebral" do pBR322 são combinadas com um promotor apropriado e com a sequência

estrutural a ser expressa. A *E. coli* é tipicamente transformada usando derivados do pBR322, um plasmídeo derivado de uma *E. coli* (Bolivar et al., *Gene 2*:95, 1977). O pBR322 contém genes para a resistência à ampicilina e tetraciclina e proporciona, deste modo, meios simples de identificação das células transformadas.

Os promotores vulgarmente usados em vectores recombinantes microbianos de expressão incluem o sistema promotor da β-lactamase (penicilinase) e da lactose (Chang et al., *Nature 275*:615, 1978; e Goeddel et al., *Nature 281*:544, 1979), o sistema promotor do triptofano (trp) (Goeddel et al., *Nucl. Acids Res. 8*:4057, 1980; e Pedido de Patente Europeia 36.776) e o promotor tac (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p.412, 1982). Um sistema bacteriano de expressão particularmente útil utiliza o promotor fágico 1 P_L e o repressor termolábil cI857ts. Os vectores plasmídicos disponíveis a partir da American Type Culture Collection que incorporam derivados do promotor 1 P_L incluem o plasmídeo pHUB2, residente na estirpe JMB9 de *E. coli* (ATCC 37092) e pPLc28, residente na estirpe RR1 de *E. coli* (ATCC 53082).

As sequências promotoras adequadas em vectores de leveduras incluem os promotores para a metalotioneína, 3-fosfogliceratoquinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem. 255*:2073, 1980), ou outros enzimas glicolíticos (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg. 7*:149, 1968; e Holland et al., *Biochem. 17*:4900, 1978), tais como a enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutoquinase, glucose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase, triosefosfato isomerase, fosfoglucose isomerase e glucoquinase. Os vectores e promotores adequados para expressão em leveduras são descritos em mais detalhe em R. Hitzeman et al., Pedido de Patente Europeia 73.657.

Os vectores de leveduras preferidos poderão ser construídos usando sequências de DNA do pBR322 para selecção e replicação em E. coli (gene Amp^r e origem de replicação) e sequências de DNA de levedura incluindo um promotor ADH2 reprimível por glucose e um leader de secreção de α-factor. O promotor ADH2 foi descrito por Russell et al., *J. Biol. Chem. 258*:2674, 1982 e Beier et al., *Nature 300*:724, 1982. O leader de α-factor de levedura, que dirige a secreção de proteínas heterólogas, pode ser inserido entre o promotor e o gene estrutural a ser expresso.

Ver, p.ex., Kurjan et al., *Cell 30*:933, 1982; e Bitter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81*:5330, 1984. A sequência leader pode ser modificada para conter, perto da sua extremidade 3', um ou mais locais de restrição úteis para facilitar a fusão da sequência leader a genes estranhos. As sequências de controlo da transcrição e tradução em vectores de expressão a ser usados na transformação de células de vertebrados podem obter-se a partir de fontes virais. Por exemplo, entre os promotores e enhancers vulgarmente usados encontram-se os derivados de Polioma, Adenovirus 2, Vírus de Símio 40 (SV40) e citomegalovírus humano. As sequências de DNA derivadas do genoma viral do SV40, por exemplo, a origem de replicação do SV40, os promotores precoce e tardio, o enhancer, os locais de splice e os locais de poliadenilação podem ser usados para fornecer os outros elementos genéticos requeridos para a expressão de uma sequência heteróloga de DNA. Os promotores precoce e tardio são particularmente úteis porque ambos são facilmente obtidos a partir do vírus sob a forma de fragmento que contém igualmente a origem de replicação viral do SV40 (Fiers et al., *Nature 273*:113, 1978). Poderão também ser usados fragmentos menores ou maiores do SV40, desde que a sequência de aproximadamente 250 pb que se estende desde o local de restrição de *Hind* III até ao local de restrição de *Bgl* II, localizada na origem de replicação viral, esteja incluída. Para além disto, poderão ser utilizadas sequências genómicas virais de promotor, controlo e/ou sinal, desde que tais sequências de controlo sejam compatíveis com a célula hospedeira escolhida. Vectores exemplificativos podem ser construídos tal como exposto por Okayama e Berg, *Mol. Cell. Biol. 3*:280, 1983.

Poderá construir-se um útil sistema para uma expressão estável e de alto nível de cDNAs receptores de mamífero em células epiteliais mamárias de rato C127, substancialmente como descrito por Cosman et al., *Mol. Immunol. 23*:935, 1986. Um vector eucariótico preferido para a expressão do DNA da proteína LbeIF4A é o pDC406 (McMahan et al., *EMBO J. 10*:2821, 1991), e inclui sequências reguladoras derivadas do SV40, do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus de Epstein-Barr (EBV). Outros vectores preferidos incluem o pDC409 e o pDC410, que derivam do pDC406. O vector pDC410 derivou do pDC406 substituindo-se a origem de replicação do EBV por sequências codificando para o

grande antigénio T do SV40. O vector pDC409 difere do pDC406 devido à delecção de um local de restrição de *Bgl* II situado fora do local múltiplo de clonagem, o que tornou único o local de restrição de *Bgl* II contido no local múltiplo de clonagem.

Uma linha celular útil que permite a replicação episssomal de vectores de expressão, tais como o pDC406 e o pDC409, que contêm a origem de replicação do EBV, é a CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478). A linha celular CV-1/EBNA derivou da transfecção da linha celular CV-1 com um gene codificando para o antigénio nuclear I do vírus de Epstein-Barr (EBNA-1), e expressa constitutivamente o EBNA-1 sob a direcção do enhancer/promotor imediato-precoce do CMV humano.

As células hospedeiras transformadas são células que foram transformadas ou transfectadas com vectores de expressão construídos usando técnicas de DNA recombinante e que contêm sequências codificando para um polipéptido LbeIF4A do presente invento. As células hospedeiras transformadas poderão expressar o polipéptido LbeIF4A desejado, mas não é necessário que as células hospedeiras transformadas para fins de clonagem ou amplificação do DNA de LbeIF4A expressem a proteína LbeIF4A. As proteínas LbeIF4A expressas serão preferencialmente secretadas para o sobrenadante da cultura, dependendo do DNA seleccionado, mas poderão igualmente ser depositadas a nível da membrana celular.

As células hospedeiras adequadas para expressão de proteínas recombinantes incluem células procarióticas, leveduras ou células eucarióticas superiores sob o controlo de promotores apropriados. As células procarióticas incluem organismos gram negativos ou gram positivos, por exemplo *E. coli* ou *bacilli.* As células eucarióticas superiores incluem linhas celulares estabelecidas provenientes de insectos ou mamíferos, tal como abaixo descrito. Poderão também usar-se sistemas de tradução não contidos em células para produzir proteínas LbeIF4A usando RNAs derivados das construções de DNA aqui expostas. São descritos vectores de clonagem e expressão apropriados para uso em células hospedeiras de bactérias, fungos, leveduras e mamíferos em, por exemplo, Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985.

Poderão usar-se vectores procarióticos de expressão para expressar polipéptidos LbeIF4A que não exijam um extenso processamento proteolítico e de ligações dissulfureto. Os vectores procarióticos de expressão compreendem geralmente um ou mais marcadores fenotípicos seleccionáveis, por exemplo um gene codificando para proteínas que conferem resistência a antibióticos ou que satisfazem um requisito autotrófico, e uma origem de replicação reconhecida pelo hospedeiro para assegurar a amplificação no interior do hospedeiro. Os hospedeiros procarióticos adequados para a transformação incluem *E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium*, e várias espécies dentro do género *Pseudomonas, Streptomyces* e *Staphylococcus*, se bem que possam ser utilizados outros hospedeiros.

Os polipéptidos LbeIF4A recombinantes poderão igualmente ser expressos em hospedeiros de leveduras, preferencialmente da espécie *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*. Poderão ainda ser utilizadas leveduras de outros géneros, tais como *Pichia* ou *Kluyveromyces*. Os vectores de leveduras conterão geralmente uma origem de replicação proveniente do plasmídeo 2μ de levedura ou uma sequência de replicação autónoma (AR), um promotor, DNA codificando para o polipéptido LbeIF4A, sequências para poliadenilação e terminação da transcrição e um gene de selecção. De preferência, os vectores de leveduras incluirão uma origem de replicação e um marcador seleccionável que permitam a transformação tanto da levedura como de *E. coli*, p.ex., o gene de resistência à ampicilina de *E. coli* e o gene trp1 de *S. cerevisiae*, que proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura que não tenha a capacidade de crescer em meio com triptofano, e um promotor derivado de um gene de levedura de alto nível de expressão para induzir a transcrição de uma sequência estrutural a jusante. A presença da lesão trp1 no genoma da célula hospedeira de levedura fornece, então, um meio eficaz para a detecção da transformação através do crescimento na ausência de triptofano.

Os protocolos adequados para a transformação de leveduras são conhecidos dos peritos na técnica. Uma técnica descrita por Hind et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978, envolve a selecção de transformantes Trp^+ num meio selectivo

consistindo em 0,67% de base com azoto para leveduras, 0,5% de casaminoácidos, 2% de glucose, 10 mg/ml de adenina e 20 mg/ml de uracilo. As estirpes hospedeiras transformadas por vectores compreendendo o promotor ADH2 podem ser cultivadas para expressão num meio rico consistindo em 1% de extracto de levedura, 2% de peptona e 1% de glucose suplementado com 80 mg/ml de adenina e 80 mg/ml de uracilo. A desrepressão do promotor ADH2 ocorre ao dar-se a exaustão da glucose do meio. Os sobrenadantes em bruto do meio de cultura das leveduras são colhidos por filtração e conservados a 4°C antes de se efectuar uma purificação mais completa.

Poderão igualmente utilizar-se diversos sistemas de cultura de células de mamíferos ou de insectos (p.ex., *Spodoptera* ou *Trichoplusia*) para expressar a proteína recombinante. Os sistemas de baculovírus para produção de proteínas heterólogas em células de insecto são analisados em, por exemplo, Luckow e Summers, *Bio/Technology* 6:47, 1988. Os exemplos adequados de linhas celulares hospedeiras de mamífero incluem as linhas COS-7 de células de rim de macaco, descritas por Gluzman, *Cell* 23:175, 1981, e outras linhas celulares capazes de expressar um vector apropriado, incluindo, por exemplo, as linhas celulares de CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478), células L, C127, 3T3, ovário de Hamster chinês (CHO), COS, NS-1, HeLa e BHK. Os vectores de expressão em mamíferos poderão compreender elementos não transcritos tais como uma origem de replicação, um promotor e enhancer adequado ligado ao gene a ser expresso e outras sequências flanqueadoras 5' ou 3' não transcritas, e sequências 5' ou 3' não traduzidas, tais como locais necessários de ligação ao ribossoma, um local de poliadenilação, locais aceitadores e dadores de splice e sequências de terminação da transcrição.

Os polipéptidos LbeIF4A purificados poderão ser preparados através da cultura de sistemas adequados de vector/hospedeiro para expressar os produtos recombinantes de tradução dos DNAs do presente invento, os quais são então purificados a partir de meios de cultura ou de extractos celulares. Por exemplo, os sobrenadantes de sistemas que segreguem proteínas recombinantes para meios de cultura poderão ser inicialmente concentrados usando um filtro de concentração de proteínas comercialmente disponível, tal como uma unidade de ultrafiltração Amicon

ou Pellicon da Millipore. Após o passo de concentração, o concentrado poderá ser aplicado a uma matriz de purificação apropriada. Por exemplo, uma matriz de afinidade adequada poderá compreender uma proteína de contra-estrutura (i.e., uma proteína à qual a LbeIF4A se ligue numa interacção específica baseada na estrutura) ou lectina ou uma molécula de anticorpo ligada a um suporte sólido. Alternativamente, poderá ser usada uma resina de troca iónica, por exemplo, uma matriz ou substrato possuindo grupos dietilaminoetil (DEAE) pendentes. As matrizes poderão ser de acrilamida, agarose, dextrano, celulose ou de outros tipos vulgarmente usados na purificação de proteínas. Alternativamente, poderá ser utilizado um passo de troca de catiões. Os materiais adequados para troca de catiões incluem várias matrizes insolúveis compreendendo grupos sulfopropilo ou carboximetilo. Os grupos sulfopropilo são preferidos. A cromatografia por filtração em gel proporciona igualmente um meio de purificação da LbeIF4A.

A cromatografia de afinidade constitui um meio particularmente preferido para a purificação de polipéptidos LbeIF4A. Por exemplo, um polipéptido LbeIF4A expresso sob a forma de proteína de fusão compreendendo a região Fc de uma imunoglobulina poderá ser purificado usando a cromatografia de afinidade com Proteína A ou Proteína G. Ainda, uma proteína LbeIF4A compreendendo um domínio de fecho de leucina poderá ser purificada numa resina que compreenda um anticorpo específico para o domínio de fecho de leucina. Poderá igualmente ser útil utilizar anticorpos monoclonais contra a proteína LbeIF4A na purificação por cromatografia de afinidade; utilizando métodos bem conhecidos da técnica.

Finalmente, poderão usar-se um ou mais passos de cromatografia líquida de alto rendimento em fase reversa (RP-HPLC) utilizando meios hidrofóbicos para RP-HPLC (p.ex., sílica gel possuindo grupos metilo ou outros grupos alifáticos pendentes) para purificar de modo mais completo uma composição de proteína LbeIF4A. Poderão utilizar-se alguns ou todos os passos de purificação referidos, em várias combinações, para se obter uma proteína recombinante homogénea.

O polipéptido LbeIF4A recombinante produzido em cultura bacteriana é de preferência isolado por extracção inicial a partir de pellets das células, seguindo-se um ou mais passos de concentração, salting-out, troca iónica em meio aquoso ou

cromatografia de exclusão molecular. Poderá usar-se a cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) para os passos finais de purificação. As células microbianas utilizadas para a expressão da proteína LbeIF4A recombinante poderão ser lisadas por qualquer método conveniente, incluindo ciclos de congelamento-descongelamento, sonicação, lise mecânica ou utilização de agentes lisantes das células.

A fermentação da levedura que expressa o polipéptido LbeIF4A sob a forma de uma proteína secretada simplifica grandemente a purificação. A proteína recombinante secretada resultante de uma fermentação em grande escala poderá ser purificada através de métodos análogos aos descritos por Urdal et al., *J. Chromatog. 296*:171, 1984. Esta referência descreve dois passos sequenciais de HPLC de fase reversa para purificação de GM-CSF humano recombinante numa coluna preparativa de HPLC.

As preparações de polipéptidos LbeIF4A sintetizadas em cultura recombinante poderão conter componentes celulares não-LbeIF4A, incluindo proteínas, em quantidades e de um tipo que dependem dos passos de purificação usados para a recuperação da proteína LbeIF4A a partir da cultura. Estes componentes serão geralmente de origem procariótica, de levedura ou eucariótica não humana, e estão de preferência presentes em quantidades contaminantes inócuas, na ordem de menos que cerca de 1 por cento em peso. Tais preparações encontram-se tipicamentemente isente outras proteínas que poderão estar normalmente associadas à proteína LbeIF4A tal como é encontrada na natureza na sua espécie de origem.

A síntese automatizada proporciona um método alternativo para a preparação de polipéptidos deste invento que possuam menos do que cerca de 100 aminoácidos, e tipicamente menos do que cerca de 50 aminoácidos. Por exemplo, poderá ser usado o método de Merrifield de síntese em fase sólida, no qual os aminoácidos são sequencialmente adicionados a uma cadeia de aminoácidos nascente. Ver Merrifield, *J. Am. Chem. Soc. 85*:2149-2146, 1963. O equipamento para a síntese automatizada de polipéptidos encontra-se comercialmente disponível a partir de fornecedores como a Applied Biosystems, Inc., de Foster City, CA.

Para além dos polipéptidos e sequências de DNA acima descritas, o invento proporciona ainda métodos para o uso dos polipéptidos acima referidos na avaliação de respostas imunitárias e na estimulação de respostas imunitárias protectoras e da produção de IL-12. Verificou-se, no âmbito do presente invento, que a LbeIF4A contém epitopo(s) de células T que estimulam a proliferação das CMSPs de indivíduos infectados por *Leishmania*. A LbeIF4A estimula também as CMSPs dos indivíduos infectados para gerar um perfil de citocinas Th1; ver Skeiky et al., *J. Immunol. 150*:93a, 1993. Uma resposta Th1 é caracterizada pela produção das citocinas Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-12 (IL-12) ou Interferão-γ (IFN-γ), assim como o Factor de Necrose de Tumores-α (TNF-α). A IL-12 é uma molécula heterodimérica compreendendo as subunidades p40 e p35, que terão de ser co-expressas para que se produza p70 da IL-12, a qual é biologicamente activa. A subunidade p40 é produzida apenas por células produtoras de IL-12 e é induzida *in vitro* e *in vivo* após estimulação por bactérias ou parasitas, enquanto que a subunidade p35 é ubiquitária e expressa constitutivamente. Assim, as células que produzem IL-12 possuem também um grande excesso (de 10-100 vezes) de cadeias p40 livres biologicamente inactivas.

A LbeIF4A estimula igualmente um perfil de citocinas Th1, por intermédio dos mRNAs que codificam para IFN-γ, IL-1, IL-2, subunidade p40 da IL-12 e TNF-α, em CMSPs de pacientes infectados por *Leishmania*. Não se encontra presente em quantidade detectável mRNA de IL-4 ou IL-10, que seria indicativo de uma resposta Th2, em tais CMSPs estimuladas. De facto, a LbeIF4A geralmente exerce uma regulação negativa sobre a expressão de IL-10 e do mRNA presente nas CMSPs "em repouso" de alguns pacientes com leishmaníase, assim como sobre a produção, induzida por LPS, de IL-10 por parte das CMSPs normais e de pacientes. Estas propriedades da LbeIF4A sugerem que esta poderá desempenhar um papel numa resposta imunitária protectora após infecção por *L. braziliensis*.

Adicionalmente, a LbeIF4A estimula a produção de IL-12 e IL-2 em CMSPs obtidas a partir de indivíduos de controlo não infectados, assim como em culturas de macrófagos humanos, na linha celular de leucemia mielóide humana THP-1 e em ratinhos. A LbeIF4A actua também sinergisticamente com o IFN-γ para estimular as

células THP-1 a secretar IL-12, e a indução da produção do IFN-γ pelas CMSPs dos pacientes é anulada pela presença de anticorpo anti-IL-12. A capacidade de estimular a produção de IL-12 e IL-2 indica que a LbeIF4A tem a capacidade de induzir uma resposta imunitária protectora, e que os polipéptidos aqui descritos possuem uma larga aplicabilidade na prevenção e tratamento de doenças como o cancro, assim como de doenças infecciosas.

Deste modo, em um dos aspectos deste invento, são apresentados métodos para a avaliação da capacidade global de um paciente para gerar uma resposta imunitária. Tal como aqui é usado, o termo "paciente" refere-se a qualquer animal de sangue quente, de preferência um ser humano. Um paciente poderá sofrer de uma doença, tal como a leishmaníase (ou outras doenças infecciosas) ou cancro, ou poderá ser normal (i.e., livre de doença ou infecção detectável). Em geral, a intensidade da resposta proliferativa ou associada a Th1 que é provocada por exposição das CMSPs de um paciente a um polipéptido LbeIF4A é indicativa da capacidade de geração de uma resposta imunitária por parte do paciente.

Abreviadamente, uma tal avaliação da capacidade de geração de uma resposta imunitária por um paciente poderá ser efectuada fazendo contactar CMSPs obtidas do paciente, que poderá estar infectado ou não infectado, com um polipéptido deste invento, e medindo uma resposta adequada das células. As CMSPs destinadas a este fim poderão ser isoladas através de métodos conhecidos da técnica, incluindo a centrifugação para separação por densidade em, por exemplo, Ficoll™ (Winthrop Laboratories, New York). Em geral, a quantidade de polipéptido que é suficiente para a avaliação de cerca de 10^4-10^6 células varia entre cerca de 1 μg/ml a cerca de 50 μg/ml, e é de preferência de cerca de 10 μg/ml. A incubação do polipéptido com as CMSPs é tipicamente realizada a 37°C durante cerca de cinco dias. Após a incubação com o polipéptido, as CMSPs são ensaiadas quanto a uma resposta adequada. Por exemplo, a resposta medida poderá ser uma resposta proliferativa, a qual poderá ser avaliada através de métodos conhecidos dos técnicos de perícia média, tal como a exposição das células a um pulso de timidina radiomarcada e a medição da incorporação do marcador no DNA celular. Em geral, uma resposta proliferativa em que o índice de estimulação (i.e., a média

de cpm das células estimuladas com antigénio dividida pela média de cpm das células sem antigénio) é igual ou superior a 5 é indicativa de um indivíduo com uma capacidade reduzida de gerar uma resposta imunitária. Alternativamente, a resposta medida poderá ser a secreção de uma ou mais citocinas específicas (tais como IFN-γ, IL-2, p70 da IL-12, subunidade p40 da IL-12, IL-1 e TNF-α), tal como acima descrito, ou a concentração de mRNA codificando para uma ou mais citocinas específicas (tais como IFN-γ, IL-2, subunidade p40 da IL-12, IL-1 e TNF-α) tal como determinado por meio de técnicas bem conhecidas dos técnicos de perícia média (as quais poderão incluir a amplificação através de reacção em cadeia por polimerase (PCR)). Os níveis elevados de tal secreção de citocinas ou de expressão de mRNA correspondem a uma capacidade superior para a geração de uma resposta imunitária. Em geral, um paciente possui uma capacidade diminuída para gerar uma resposta imunitária se não é possível detectar (pelos métodos aqui expostos) a IL-12, ou o mRNA codificando para a IL-12, nas CMSPs tratadas com um polipéptido LbeIF4A.

Em outros aspectos, o presente invento proporciona métodos para a estimulação de respostas imunitárias em CMSPs e componentes isolados de células (incluindo, mas não se limitando a, macrófagos, monócitos, células B e células dendríticas). Para a estimulação de tais células, as células poderão ser isoladas por qualquer uma de uma variedade de técnicas bem conhecidas dos peritos (tal como a centrifugação para separação por densidade em Ficoll), sendo estas células postas em contacto com um polipéptido LbeIF4A em quantidades suficientes e durante tempo suficiente para gerar uma resposta imunitária, tal como acima descrito. As células tratadas de acordo com este invento poderão (mas não forçosamente) ser isoladas a partir de um doente que sofra de leishmaníase, ou outra doença, e poderão ser reintroduzidas num paciente após o tratamento. Para as células obtidas a partir de indivíduos infectados por *Leishmania*, as respostas imunitárias que poderão ser geradas incluem uma resposta imunitária Th1 preferencial (que inclui a estimulação da produção de IL-12) e a regulação negativa da expressão de IL-10. Para as células de indivíduos não infectados, a resposta imunitária poderá ser a produção de IL-12.

Em aspectos relacionados, o presente invento fornece métodos para a estimulação ou reforço de respostas imunitárias em pacientes, incluindo seres humanos. Em uma das formas de realização, poderá ser usado um polipéptido LbeIF4A como agente imunomodulador para reforçar uma resposta imunitária celular e/ou humoral face a um antigénio diferente. Através da administração de um polipéptido LbeIF4A a um paciente em combinação com um antigénio específico diferente, a resposta imunitária do paciente ao antigénio poderá ser reforçada. Neste aspecto, o polipéptido LbeIF4A poderá ser administrado na mesma preparação (p.ex., uma vacina) que o antigénio, ou ambos serem administrados em separado. Em geral, no entanto, o antigénio e o polipéptido LbeIF4A são administrados ao mesmo tempo e no mesmo local. Deste modo, os polipéptidos LbeIF4A poderão ser usados, por exemplo, como adjuvantes em preparações de vacinas com agentes heterólogos. As doses e métodos de administração adequados são abaixo apresentados em detalhe.

Os polipéptidos LbeIF4A poderão igualmente ser administrados a indivíduos infectados por *Leishmania*, tanto isoladamente como em combinação com outros antigénios de *Leishmania* para estimular a produção de anticorpos que se liguem a parasitas de *Leishmania*. Verificou-se que a imunização de ratinhos com LbeIF4A, num modelo geralmente reconhecido como sendo razoavelmente preditivo de uma resposta à espécie *Leishmania* em seres humanos e outros mamíferos, resultava numa resposta imunitária protectora contra *L.braziliensis*, confirmando a utilidade do LbeIF4A como vacina. Os polipéptidos deste invento poderão ser administrados, por exemplo, a pacientes sofrendo de leishmaníase cutânea crónica para estimular uma resposta imunitária curativa.

Em outras formas de realização, os polipéptidos aqui apresentados poderão ser administrados a um paciente para gerar uma resposta imunitária. Para os indivíduos infectados com *Leishmania*, as respostas imunitárias que poderão ser geradas incluem uma resposta imunitária preferencialmente Th1 (o que inclui a estimulação da produção de IL-12) e a regulação negativa da expressão de IL-10. Para os indivíduos não infectados, a resposta imunitária poderá ser a produção de

IL-12 e/ou IL-2, ou a estimulação das células T gama. As doses e métodos de administração adequados são abaixo apresentados.

Ainda em outro aspecto do invento, poderão administrar-se um ou mais polipéptidos LbeIF4A a um paciente afectado por uma doença que responda à estimulação pela Interleucina 12. Tais doenças incluem infecções (as quais poderão ser, por exemplo, bacterianas, virais ou protozoárias) ou doenças como o cancro. Em geral, o grau de resposta de uma doença em particular à estimulação por IL-12 poderá ser determinado por avaliação do efeito do tratamento com um polipéptido LbeIF4A sobre factores clinicamente correlacionados com a imunidade. Por exemplo, se o tratamento resultar numa resposta Th1 aumentada ou na conversão de um perfil Th2 para um perfil Th1, com uma melhoria clínica acompanhante do paciente tratado, a doença responde à estimulação por IL-12. A administração do polipéptido poderá realizar-se como se descreve abaixo, ou poderá prolongar-se por um período mais alargado de tempo, dependendo da indicação.

Nos aspectos acima expostos, em que é usado um polipéptido LbeIF4A para estimular ou reforçar uma resposta imunitária num paciente, o polipéptido é preferencialmente formulado sob a forma de uma composição farmacêutica ou uma vacina. As composições farmacêuticas compreendem geralmente um ou mais polipéptidos LbeIF4A em combinação com um veículo, excipiente ou diluente fisiologicamente aceitáveis. Tais veículos serão não tóxicos para os receptores às dosagens e concentrações utilizadas. As vacinas compreendem um ou mais polipéptidos LbeIF4A e um ou mais antigénios adicionais apropriados para a indicação. A utilização de proteínas LbeIF4A em conjunção com receptores solúveis de citocinas ou com citocinas é também contemplada.

As vias e frequência de administração, e as doses de polipéptido, variarão de indivíduo para indivíduo e poderão corresponder às actualmente usadas em imunização ou tratamento de outras infecções. Em geral, as composições farmacêuticas e vacinas poderão ser administradas por injecção (p.ex., intramuscular, intravenosa ou subcutânea), por via intranasal (p.ex., por aspiração), ou oralmente. A quantidade e frequência de administração dependerão, como é óbvio, de factores como a natureza e a severidade da indicação em tratamento, a

resposta desejada, o estado do paciente, entre outros. Tipicamente, poderão ser administradas entre 1 e 4 doses durante um período de 2-6 semanas. De preferência, serão administradas duas doses, sendo a segunda dose administrada 2-4 semanas após a primeira. Uma dose adequada corresponde a uma quantidade de polipéptido LbeIF4A que estimule a produção de IL-12 no paciente, de tal forma que a quantidade de IL-12 presente nos sobrenadantes das CMSPs isoladas do paciente se encontre entre cerca de 10 ng e 10 μg por ml. Em geral, a quantidade de IL-12 poderá ser determinada usando qualquer ensaio apropriado e conhecido dos técnicos de perícia média, incluindo os ensaios aqui descritos. A quantidade de polipéptido LbeIF4A presente numa dose varia tipicamente entre cerca de 1 pg e cerca de 100 mg por kg de hospedeiro, tipicamente de cerca de 10 pg a cerca de 1 mg, e de preferência de cerca de 100 pg a cerca de 1 μg. As dimensões adequadas para as doses variarão com a dimensão do animal, mas estão tipicamente compreendidas entre cerca de 0,01 ml e cerca de 5 ml por animal de 10-60 kg. As dosagens específicas apropriadas para uma indicação particular poderão ser facilmente determinadas.

Se bem que qualquer veículo apropriado conhecido dos técnicos de perícia média possa ser utilizado nas composições farmacêuticas deste invento, o tipo de veículo variará dependendo do modo de administração e de ser ou não desejada uma administração de libertação prolongada. Para administração parentérica, tal como uma injecção subcutânea, o veículo compreende preferencialmente água, soro fisiológico, álcool, um lípido, uma cera ou um tampão. Para administração oral, poderá utilizar-se qualquer dos veículos acima referidos ou um veículo sólido, tal como manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glucose, sacarose e carbonato de magnésio. Poderão ainda usar-se microesferas biodegradáveis (p.ex., de galactido poliláctico) como veículos para as composições farmacêuticas deste invento. São apresentadas microesferas biodegradáveis adequadas, por exemplo, nas Patentes dos E.U.A. nos. 4.897.268 e 5.075.109.

As composições farmacêuticas e vacinas poderão também conter diluentes tais como tampões, antioxidantes como o ácido ascórbico, polipéptidos de baixo

peso molecular (inferior a cerca de 10 resíduos), proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono incluindo a glucose, sacarose ou dextrinas, agentes quelantes como o EDTA, glutatião e outros estabilizadores e excipientes. O soro fisiológico neutro tamponado ou o soro fisiológico misturado com albumina sérica não específica constituem exemplos de diluentes apropriados. De preferência, o produto é formulado sob a forma de liofilizado usando soluções excipientes adequadas (p.ex., sacarose) como diluentes.

Poderá usar-se qualquer um de uma variedade de adjuvantes nas vacinas ou composições farmacêuticas deste invento, em adição ao polipéptido LbeIF4A, para reforçar inespecificamente a resposta imunitária. A maioria dos adjuvantes contém uma substância concebida para proteger o antigénio de um rápido catabolismo, tal como hidróxido de alumínio ou óleo mineral, e um estimulador não específico de respostas imunitárias, tal como o lípido A, *Bordetella pertussis* ou *Mycobacterium tuberculosis.* Tais adjuvantes encontram-se disponíveis no mercado como, por exemplo, Adjuvante Incompleto de Freund e Adjuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI) e Adjuvante 65 da Merck (Merck and Company, Inc., Rahway , NJ).

Em outro aspecto deste invento, são fornecidos métodos para determinar a capacidade de um dado antigénio para estimular uma resposta imunitária protectora. A capacidade do LbeIF4A para estimular a produção de Interleucina-12 correlaciona-se com o desenvolvimento de uma resposta Th1 protectora em pacientes infectados e em CMSPs isolados a partir de pacientes infectados. Assim, a determinação da capacidade de um antigénio seleccionado para estimular a produção de IL-12, IFN-γ ou IL-2 constitui um método de avaliação rápido e reprodutível para uso no desenvolvimento de vacinas. Os antigénios com a capacidade de provocar uma resposta Th1, tal como demonstrado pela estimulação das células T gama e pela estimulação da produção de IL-12 e/ou IL-2 em células mononucleares normais do sangue periférico usando os métodos acima descritos, são geralmente adequados para a preparação de uma vacina.

Os derivados da proteína LbeIF4A poderão também ser usados como imunogénios, como reagentes em imunoensaios ou como agentes ligantes para

procedimentos de purificação por afinidade. Os polipéptidos LbeIF4A destinados a ensaios ou procedimentos de purificação poderão ser ligados a um suporte sólido. O polipéptido poderá ligar-se ao suporte através de uma variedade de técnicas conhecidas dos técnicos, as quais estão amplamente descritas na literatura científica e de patentes. No contexto deste aspecto do presente invento, o termo "ligado" refere-se tanto a uma associação não covalente, tal como a adsorção, como a uma ligação covalente (que poderá corresponder a uma ligação directa entre o antigénio e grupos funcionais do suporte ou a uma ligação efectuada através de um agente de cross-linking). A ligação por adsorção a um poço numa placa de microtitulação ou a uma membrana é preferida. Em tais casos, a adsorção poderá ser conseguida fazendo contactar o polipéptido, num tampão apropriado, com o suporte sólido durante o tempo adequado. O tempo de contacto varia com a temperatura, mas varia tipicamente entre 1 hora a 1 dia. Em geral, quando um poço de uma placa de microtitulação de plástico (tal como poliestireno ou cloreto de polivinilo) é posto em contacto com uma quantidade de polipéptido variando entre cerca de 10 ng a cerca de 1 μg, e de preferência de cerca de 250 ng, tal é suficiente para ligar uma quantidade suficiente de antigénio.

Os polipéptidos poderão ser ligados de modo covalente a um suporte sólido usando uma variedade de técnicas. Por exemplo, a ligação poderá ser conseguida usando agentes de cross-linking, tais como o M-maleimidobenzoil-succinimidaéster e a N-hidroxisuccinimida, que se ligam covalentemente ao polipéptido a nível dos resíduos de cisteína e lisina. Os polipéptidos LbeIF4A poderão também ligar-se covalentemente por meio de grupos laterais reactivos a diversos substratos insolúveis, tal como as estruturas de agarose activadas por brometo de cianogénio, por bisoxirano, por carbonildiimidazol ou por tosilo, ou poderão ligar-se por adsorção a superfícies de poliolefinas (com ou sem cross-linking por glutaraldeído).

Uma vez ligados a um substrato, os polipéptidos LbeIF4A poderão ser usados em ensaios de anticorpos que se ligam à proteína LbeIF4A. Os ensaios adequados incluem os ensaios de imunoadsorção e ligação a enzima (ELISA). Os ensaios têm início ao fazer-se contactar um antigénio polipeptídico que foi imobilizado num suporte sólido, vulgarmente o poço de uma placa de microtitulação, com uma

amostra que contém anticorpos, fazendo desta forma com que os anticorpos contra o polipéptido que se encontram na amostra se liguem ao polipéptido imobilizado. A porção não ligada da amostra é então removida do polipéptido imobilizado e é adicionado um reagente de detecção que tem a capacidade de se ligar ao complexo imobilizado de anticorpo-polipéptido. A quantidade de reagente de detecção que permanece ligada ao suporte sólido é então determinada usando um método adequado ao reagente de detecção específico.

Poderão também usar-se polipéptidos imobilizados para purificar anticorpos que se ligam ao polipéptido LbeIF4A. Tais anticorpos poderão ser preparados por diversas técnicas conhecidas dos técnicos de perícia média. Ver, p.ex., Harlow e Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Em uma destas técnicas, um imunogénio compreendendo o polipéptido é inicialmente injectado em um mamífero escolhido de entre uma larga variedade destes animais (p.ex., ratinhos, ratos, coelhos, ovelhas e cabras). Neste passo, os polipéptidos deste invento poderão servir como o imunogénio sem qualquer modificação. Alternativamente, e em particular para os polipéptidos relativamente curtos, poderá ser provocada uma resposta imunitária superior se o polipéptido for reunido a uma proteína veiculadora, tal como a albumina sérica bovina ou a hemocianina de lapa. O imunogénio é injectado no animal e o anticorpo poderá então ser combinado com o antigénio polipeptídico imobilizado num suporte sólido adequado. O anticorpo que não se tenha ligado a um antigénio da amostra poderá então ligar-se ao antigénio imobilizado, e a quantidade remanescente da amostra e do anticorpo é removida. A quantidade de anticorpo ligado ao suporte sólido está inversamente relacionada com a quantidade de antigénio na amostra. Assim, uma quantidade reduzida de anticorpo ligado ao suporte sólido indica a presença de *Leishmania* na amostra. Outros formatos que utilizem anticorpos monoespecíficos para detectar *Leishmania* numa amostra tornar-se-ão evidentes aos técnicos de perícia média, e os formatos acima referidos são apresentados apenas como exemplo.

Os exemplos que se seguem são oferecidos para fins de ilustração, e não com propósitos limitativos. Os peritos na técnica reconhecerão que as formas de realização do invento que foram apresentadas nos exemplos são susceptíveis de

variações, especialmente à luz dos ensinamentos recolhidos nas diversas referências aqui citadas.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Preparação de DNA Codificando Para LbeIF4A

Este exemplo ilustra a clonagem molecular de uma sequência de DNA codificando para o antigénio ribossomal de *L. braziliensis* LbeIF4A.

Foi construída uma biblioteca de expressão genómica a partir de DNA de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) inserido no bacteriófago λZAPII (Stratagene, La Jolla, CA). A biblioteca de expressão foi sondada com soro de doente pré-adsorvido em *E. coli*, proveniente de um indivíduo infectado com *L. braziliensis* e sofrendo de leishmaníase mucosa. As placas contendo antigénios recombinantes imunoreactivos foram purificadas, e o fagemídeo pBSK(-) foi excisado usando os protocolos do fabricante. Foram realizadas delecções com Exonuclease III de modo a gerar delecções projectantes para preparações e sequenciamento de moldes de cadeia simples. Os moldes de cadeia simples foram isolados após infecção com o fago helper VCSM13, tal como recomendado pelo fabricante (Stratagene, La Jolla, CA) e sequenciados pelo método de terminação da cadeia por didesoxi ou pelo sistema terminador Taq usando o Sequenciador Automatizado da Applied Biosystems, Modelo 373A.

Os antigénios recombinantes imunoreactivos foram então analisados em ensaios com células T de pacientes quanto à sua capacidade para estimular uma resposta proliferativa, tal como descrito no Exemplo 5, abaixo, e um perfil de citocinas Th1 dominante, tal como descrito no Exemplo 7, abaixo.

Foi identificado um clone recombinante nos ensaios acima que, após comparação de sequências entre a sua sequência prevista de aminoácidos e as sequências de outras proteínas, foi identificado como um homólogo de *Leishmania braziliensis* do factor eucariótico de iniciação 4A (eIF4A). O clone isolado (pLeIF.1) não possuía os primeiros 48 resíduos de aminoácidos (144 nucleótidos) existentes

na sequência completa da proteína. A inserção pLeIF.1 foi subsequentemente usada para isolar a sequência genómica de extensão completa.

A SEQ ID NO:1 mostra a sequência completa de nucleótidos do polipéptido LbeIF4A de extensão completa. O molde aberto de leitura (nucleótidos 115 a 1323) codifica para uma proteína de 403 aminoácidos com um peso molecular previsto de 45,3 kD. Uma comparação da sequência prevista da proteína LbeIF4A com as sequências das proteínas homólogas do tabaco (TeIF4A), ratinho (MeIF4A) e levedura (YeIF4A) mostra uma extensa homologia de sequências, sendo os primeiros 20-30 aminoácidos os mais variáveis. As extensões (403, 413, 407 e 395 aminoácidos), pesos moleculares (45,3, 46,8, 46,4 e 44,7 kDa) e pontos isoeléctricos (5,9 , 5,4 , 5,5 e 4,9) de LbeIF4A, TeIF4A, MeIF4A e YeIF4A, respectivamente, são semelhantes. LbeIF4A exibe uma homologia global de 75,5% (57% de identidade, 18,5% de substituição conservativa) com TeIF4A, 68,6% (50% de identidade, 18,6% de substituição conservativa) com MeIF4A e 67,2% (47,6% de identidade, 19,6% de substituição conservativa) com YeIF4A.

EXEMPLO 2

Caracterização do Gene LbeIF4A

Este exemplo descreve uma análise por Southern Blot do DNA de LbeIF4A na espécie *Leishmania*. Usaram-se *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. chagasi* (MHOM/BR/82/BA-2,Cl e MHOM/BR/84/Jonas), *L. donovani* (MHOM/Et/67/HU3), *L. infantum* (IPT-1), *L. major* (LTM p-2), *L. tropica* (1063C), *Trypanossoma cruzi* (MHOM/CH/00/Tulahuen C2) e *T. brucei* (TREU 667), que foram já anteriormente descritos (ver Burns et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90*:775-779, 1993). Os promastigotas e epimastigotas foram cultivados em meios axénicos. Os amastigotas de *L. chagasi* e *L . amazonensis* foram obtidos a partir de baços de Hamsters sírios e de almofadas plantares de ratinhos BALB/c ByJ, respectivamente, e foram purificados tal como descrito em Burns et al., *J. Immunol. 146*:742-748, 1991.

O DNA genómico foi preparado, digerido com enzimas que cortaram tanto no interior (*Pst*I e *Not*I) como fora de LbeIF4A (*Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Pvu*II e

*Sst*I), separado em gel de agarose a 0,7% e transferido por "blot" para uma membrana Nytran, tal como descrito por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989. Um fragmento de restrição compreendendo um fragmento de ~0,94 kb (nucleótidos 143 a 1083) da região codificante de LbeIF4A foi radiomarcada pelo método de priming ao acaso (ver Feinberg e Vogelstein, *Anal. Biochem. 137*:266-268, 1984) e os "blots" foram hibridizados a 65°C durante 12 horas. Os "blots" foram lavados duas vezes a 65°C durante 20 minutos, de cada vez com 2X, 0,5X e 0,2X SSC contendo SDS a 0,1%. O DNA genómico de *L. braziliensis* continha pelo menos duas cópias de LbeIF4A, tal como exemplificado pela presença de duas bandas de hibridização nas carreiras de *Bam*HI e *Pvu*II (Fig. 1).

A mesma figura ilustra também a conservação inter-espécies entre o homólogo eIF4A de *L. braziliensis* e outras espécies de *Leishmania*. Foram detectados dois grandes fragmentos de hibridização na carreira de *Pst*I em todas as outras espécies de *Leishmania* testadas, sendo que os membros do complexo de *L. donovani* (*L. chagasi, L. donovani* e *L. infantum*) mostraram padrões de hibridização idênticos. O LbeIF4A também exibe uma hibridação cruzada com o parasita mais distantemente relacionado *T.cruzi*, mas não com *T. brucei*, sob condições rigorosas de hibridação. Estes dados mostram uma extensa conservação inter-espécies do homólogo eIF4A de *Leishmania*.

EXEMPLO 3

Preparação de LbeIF4A

Este exemplo ilustra a expressão e purificação do produto genético de antigénio LbeIF4A com ~45 kDa. O antigénio recombinante de 45 kDa do clone genómico pLeIF.1 (i.e., o antigénio sem os 48 resíduos N-terminais) foi purificado a partir de 500 ml de culturas induzidas por IPTG. Os corpos de inclusão foram isolados e lavados sequencialmente em 10 ml de TNE (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM e EDTA 10 mM) contendo ureia a 2, 4 e 8 M. As fracções contendo o antigénio recombinante solubilizado (geralmente os sobrenadantes com ureia a 4 e 8 M) foram reunidas, dialisadas contra soro fisiológico tamponado com Tris (TBS) e

concentradas por precipitação com sulfato de amónio a 30%. A purificação até à homogeneidade foi conseguida através de electroforese preparativa em SDS-PAGE, seguida de excisão e electroeluição dos antigénios recombinantes. Todos os antigénios usados nos nossos estudos continham menos do que 10 mg/ml de endotoxina num ensaio de amebócitos de Limulus realizado pela Immunex Corp., Seattle, WA.

O antigénio recombinante foi usado para imunizar um coelho para a produção de um antisoro policlonal. Um coelho adulto (new Zealand White; R & R Rabbitry, Stanwood, WA) foi imunizado por imunização subcutânea com 100 μg de LbeIF4A purificado em adjuvante incompleto de Freund (IFA, GIBCO, Grand Island, NY) juntamente com 100 μg de muramil-dipéptido (péptido adjuvante, Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, Ca), seguindo-se um reforço quatro semanas mais tarde com 100 μg do antigénio recombinante apenas em IFA. Três semanas mais tarde, o coelho recebeu um reforço intravenoso com 25 μg de LbeIF4A em soro fisiológico e recolheu-se soro uma semana mais tarde.

Foram então efectuados imunoblots de lisados de *L. braziliensis*, obtidos a partir de promastigotas colhidos durante as fases precoce, intermédia ou tardia de crescimento ou após uma mudança de temperatura da cultura de 22-35°C, usando o anti-soro policlonal de coelho como sonda (Fig. 2). O Painel A da Figura 2 mostra a análise por imunoblot dos marcadores de peso molecular (carreira M), dos lisados de *E.coli* provenientes de culturas não induzidas (carreira 1) e induzidas (carreira 2), e do antigénio recombinante purificado (carreira 3). O Painel B da Figura 2 mostra a análise por imunoblot do lisado de promastigotas de *L. braziliensis* (carreira 1), do lisado de promastigotas de *L. chagasi* (carreira 2), e do lisado de promastigotas (carreira 3) ou de amastigotas (carreira 4) de *L. amazonensis*.

Foram preparados lisados de parasitas e de células de mamífero, procedendo-se à lise por congelamento/descongelamento de pellets em tampão de SDS sem glicerol e β-mercaptoetanol. O material insolúvel foi separado do sobrenadante por centrifugação a 10K rpm numa microcentrífuga. As concentrações de proteínas foram determinadas usando o kit de ensaio de proteínas Pierce BCA. Cinco a 10 μg de extractos de parasitas ou células ou 0,5 a 1,0 μg de antigénios

recombinantes foram separados em SDS-PAGE a 12,5% e transferidos electroforeticamente para membranas de nitrocelulose. As reactividades dos antisoros foram avaliadas tal como previamente descrito (Skeiky et al., *J. Exp. Med. 176*:201-211, 1992) usando [^{125}I]-Proteína A, seguindo-se uma autoradiografia.

O antisoro de coelho detectou um tipo dominante de proteína de dimensão ~45 kD. As intensidades relativas do homólogo de eIF4A de 45 kD foram semelhantes para todos os lisados analisados, sugerindo deste modo que este antigénio é constitutivamente expresso durante as fases de crescimento precoce a intermédia do parasita ou após uma transição de temperatura que simula o estádio intracelular de amastigota. Este achado distingue-se do que ocorre com os membros da família de proteínas de choque térmico de *Leishmania*, cujos produtos sofrem uma regulação positiva após uma transição de temperatura de 22-35°C. O soro pré-imune de coelho não reagiu com os lisados de parasitas.

EXEMPLO 4

Preparação de Anticorpos Monoclonais que se Ligam a LbeIF4A

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais contra LbeIF4A. Poderão utilizar-se preparações de LbeIF4A recombinante purificado ou células transfectadas expressando níveis elevados de LbeIF4A para gerar anticorpos monoclonais contra o LbeIF4A recorrendo a técnicas convencionais, tais como as apresentadas na Patente dos E.U.A. nº 4.411.993. Tais anticorpos poderão ser usados para interferir com a activação das CMSPs pelo LbeIF4A, como componentes de ensaios de diagnóstico ou pesquisa para o LbeIF4A, ou na purificação por afinidade do LbeIF4A.

Para imunizar roedores, o imunogénio LbeIF4A é emulsionado num adjuvante (tal como o adjuvante completo ou incompleto de Freund, o alúmen ou outro adjuvante, tal como o adjuvante Ribi R700 (Ribi, Hamilton, MT)), e injectado subcutaneamente num roedor seleccionado, por exemplo, ratinhos BALB/c ou ratos Lewis, em quantidades que variam entre 10-100 μg. De 10 dias a três semanas mais tarde, os animais imunizados recebem um reforço com mais imunogénio e continuam a receber reforços periodicamente, com um calendário de imunização de

uma semana, duas semanas ou três semanas de intervalo entre doses. São periodicamente recolhidas amostras de soro por sangramento retro-orbital ou excisão da ponta da cauda, para teste num ensaio dot-blot (sandwich de anticorpo) ou ELISA (ensaio de imunoadsorção e ligação a enzima). São também adequados outros procedimentos de ensaio, como a inibição da estimulação de uma resposta Th1.

Após a detecção de um título de anticorpos adequado, os animais positivos recebem uma injecção intravenosa de antigénio em soro fisiológico. Entre três a quatro dias mais tarde, os animais são sacrificados e os seus esplenócitos são recolhidos e fundidos com uma linha celular de mieloma de rato (p.ex., NS1 ou preferencialmente Ag 8.653 [ATCC CRL 1580]. As linhas celulares de hibridoma geradas por este procedimento são plaqueadas em múltiplas placas de microtitulação num meio selectivo (por exemplo, um meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina, ou HAT) para inibir a proliferação de células não fundidas, de híbridos mieloma-mieloma e de híbridos esplenócito-esplenócito.

As linhas de hibridoma assim geradas poderão ser pesquisadas por ELISA quanto à reactividade com LbeIF4A, por exemplo através de adaptações das técnicas expostas em Engvall et al., *Immunochem.8*:871 (1971) e na Patente dos E.U.A. nº 4.703.004. Uma técnica de pesquisa preferida é a técnica de captura de anticorpos descrita por Beckman et al., *J. Immunol. 144*:4212 (1990). As linhas de hibridoma são clonadas, por exemplo, por diluição limitante ou por clonagem em agar semi-sólido, para se obter uma linha celular monoclonal. Os clones positivos são então injectados nas cavidades peritoneais dos roedores singeneicos para produzir ascites que contêm altas concentrações (>1mg/ml) de anticorpo monoclonal anti-LbeIF4A. O anticorpo monoclonal resultante pode ser purificado por precipitação com sulfato de amónio seguida de cromatografia de exclusão em gel. Alternativamente, poderá utilizar-se uma cromatografia de afinidade baseada na ligação do anticorpo à proteína A ou à proteína G, assim como uma cromatografia de afinidade baseada na ligação ao LbeIF4A.

EXEMPLO 5

Estimulação da Proliferação das CMSPs Pelo LbeIF4A

Este exemplo ilustra a capacidade do LbeIF4A recombinante purificado para estimular a proliferação de CMSPs de indivíduos infectados por *L. braziliensis*. Foi obtido sangue periférico de indivíduos que viviam numa área (Corte de Pedra, Bahia, Brasil) endémica para a transmissão de *L. braziliensis*, na qual têm vindo a ser efectuados estudos epidemiológicos, clínicos e imunológicos ao longo de mais de uma década. O diagnóstico dos pacientes baseou-se em achados clínicos associados a pelo menos um dos seguintes factores: isolamento do parasita a partir de lesões, um teste cutâneo positivo com lisado de *Leishmania* ou um teste serológico positivo.

Foi recolhido sangue periférico e as CMSPs foram isoladas por centrifugação para separação por densidade em Ficoll™ (Winthrop Laboratories, New York). Para os ensaios de proliferação *in vitro*, foram cultivadas 2–4 x 10^5 células/poço em meio completo (RPMI 1640 suplementado com gentamicina, 2-ME, L-glutamina e 10% de pool de soros A + humano; Trimar, Hollywood, CA) em placas de 96 poços de fundo plano com ou sem 10 μg/ml dos antigénios indicados ou 5 μg/ml de PHA (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO) durante cinco dias. As células foram então submetidas a pulsos com 1 μCi de [^{3}H]timidina durante as 18 horas finais de cultura.

Os dados estão representados sob a forma de médias de cpm das culturas em triplicado e o índice de estimulação (IE) é definido como a média de cpm das culturas com antigénios/ média de cpm das culturas sem antigénio. Tal como mostra a Tabela 1 e a Figura 3, as CMSPs da maioria (>70%) dos pacientes com leishmaníse mucosa e leismaníase cutânea activa ou curada responderam ao LbeIF4A com um padrão de proliferação heterogéneo, com índices de estimulação variando entre 12 a 233 e entre 2 a 64, respectivamente.

TABELA 1

Proliferação In Vitro de CMSPs de Indivíduos Infectados por *L. braziliensis* Em Resposta a Lisado de Parasitas e a Antigénios LbeIF4A

	Incorporação de [^{3}H]Tdr (Média de cpm (SD) x 10^{-3})				
PACIENTES	MEIO	LISADO	I.E.	LbeIF4A	I.E.
MUCOSA					
JV	0.15 (0.0)	41.30 (1.3)	294	11.90 (4.8)	81
SZ	0.45 (0.1)	140.60 (7.6)	308	105.90 (5.6)	233
AB	0.42 (0.3)	44.20 (0.5)	104	5.00 (1.3)	12
NO	0.38 (0.1)	52.70 (3.3)	138	12.80 (1.6)	33
TE	0.18 (0.0)	27.40 (1.5)	150	12.81 (0.3)	48
MB	0.18 (0.0)	300.10 (9.4)	1634	41.50 (4.5)	226
OM	0.28 (0.0)	35.40 (3.2)	124	6.90 (2.5)	24
CUTÂNEA					
AS	0.22 (0.0)	19.14 (1.3)	87	14.30 (2.3)	64
JP	0.25 (0.0)	55.63 (8.6)	218	4.40 (0.3)	17
VS	0.17 (0.0)	0.26 (0.0)	1.5	0.3 (0.0)	2
RJ	0.10 (0.0)	0.32 (0.2)	3.0	1.5 (0.6)	15
JA	0.16 (0.0)	0.77 (0.1)	4.7	2.5 (0.2)	16
AD	4.20 (1.0)	4.01 (1.0)	2.0	14.1 (2.2)	3.5
HN	0.36 (0.0)	4.73 (1.7)	13	4.69 (1.7)	13
CUTÂNEA DIFUSA					
VAL	0.22 (0.0)	0.51 (0.3)	2.0	2.12 (0.2)	9.0
CUTÂNEA DE					

CURA ESPONTÂNEA					
GS	0.21 (0.0)	19.70 (4.4)	94	41.50 (2.8)	198
MS	0.09 (0.0)	0.60 (0.1)	6.5	5.10 (2.1)	57
AH	0.11 (0.0)	59.60 (7.1)	519	9.60 (4.7)	83
DJ	0.12 (0.0)	0.20 (0.1)	1.6	19.00 (6.7)	151
HS	0.12 (0.0)	27.10 (2.0)	225	12.40 (2.7)	103
MCT	0.38 (0.0)	130.30 (14)	340	6.20 (1.5)	16
NORMAL					
LV	0.14 (0.0)	0.19 (0.0)	1.4	0.71 (0.1)	4.0
VV	0.18 (0.0)	0.31 (0.1)	1.7	0.28 (0.1)	1.5
N3	0.14 (0.0)	0.36 (0.1)	2.6	0.27 (0.1)	1.9
N4	0.59 (0.1)	2.00 (0.3)	3.8	0.56 (0.0)	1.0

Em geral, os índices de estimulação foram superiores para as CMSPs dos indivíduos com leishmaníase mucosa. As CMSPs de alguns pacientes com leishmaníase mucosa responderam ao LbeIF4A com índices de estimulação comparáveis aos observados com lisado de parasitas. Curiosamente, em alguns pacientes com leishmaníase cutânea, as respostas proliferativas ao LbeIF4A foram superiores às provocadas pelo lisado de parasitas. Em contraste com os pacientes com doença mucosa e cutânea, as CMSPs de todos os seis indivíduos com leishmaníase cutânea de cura espontânea proliferaram em resposta ao LbeIF4A, com índices de estimulação (16-198) comparáveis aos de indivíduos com doença mucosa. As CMSPs de dois dos indivíduos com leishmaníase cutânea de cura espontânea (MS e DJ) apresentaram respostas que foram significativamente superiores às obtidas com lisado de parasitas. As células de indivíduos normais não infectados foram apenas marginalmente estimuladas pelo LbeIF4A.

EXEMPLO 6

Estimulação por LbeIF4A da Expressão do mRNA de Citocinas em CMSPs

Este exemplo apresenta uma análise dos padrões de expressão do mRNA de citocinas por parte das CMSPs de pacientes com casos confirmados de infecção por *L. braziliensis*. Para a análise do mRNA das citocinas foram cultivadas 0,5 a 1 ml de CMSPs, a 1-2 x 10^6 células/ml, com ou sem 10 μg/ml de um antigénio LbeIF4A que não possui os 48 resíduos N-terminais da SEQ ID NO:2 (tal como descrito no Exemplo 3), durante 48 e 72 horas. Os sobrenadantes e as células foram recolhidos e analisados quanto à presença de mRNA de citocinas através de uma reacção em cadeia por polimerase (PCR). Para a análise por PCR do mRNA das citocinas, o RNA total foi isolado das CMSPs usando o método de extracção do tiocianato ácido de guanidínio-fenol-clorofórmio, tal como descrito por Chomczynski e Sacchi, *Anal. Biochem. 162*:156-159, 1987. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando poli(dT) (Pharmacia) e a transcriptase reversa AMV (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) num volume final de 20 μl. O volume das amostras de cDNA foi completado com água até 200 μl.

Após normalização para a β-actina, fez-se a amplificação por PCR de 12 a 20 μl de cDNA diluído usando a polimerase Taq (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) com 0,2 μM dos respectivos primers externos 5' e 3' num volume de reacção de 50 μl. As condições usadas foram: desnaturação a 94°C (1 minuto para a β-actina, IL-2 e IL-4; 45 seg para o IFN-γ e 30 seg para a IL-10), annealing a 55°C (1 minuto para a β-actina, IL-2 e IL-4; 30 seg para a IL-10) ou 60°C durante 45 seg para o IFN-γ e elongação a 72°C. Verificou-se que as nossas condições de PCR se enquadravam dentro da gama semi-quantitativa depois de se terem inicialmente testado diluições em série dos cDNAs e um variado número de ciclos de PCR. Em todas as experiências subsequentes, foram usados 30 ciclos nas reacções de amplificação da β-actina, IL-2, IL-4 e IFN-γ. No caso da PCR de IL-10, foram usados 25 ciclos.

Os pares de primers usados e as condições de PCR basearam-se nas informações publicadas; β-actina, IL-2, IL-4 e IFN-γ (Ehlers et al., *J. Exp. Med. 173*:23-36, 1991) e IL-10 (Viera et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*:1172-1176,

1991). As sequências nucleotídicas para os primers oligonucleotídicos 5' e 3', respectivamente, foram as seguintes: (1) β-actina, TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA e CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG; (2) IL-2, ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT e GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC; (3) IL-4, ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT e CGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCAT; (4) IFN-γ, ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTT e GATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCAT; (5) IL-10, TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA e ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA.

As sondas foram obtidas usando plasmídeos que contêm as sequências de IL-2, IFN-γ e IL-4 humanas (Lewis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*:9743-9747, 1988) e β-actina (nº 65128; American Type Culture Collection, Rockville, MD), os quais foram digeridos com HindIII/EcoRI, EcoRI, SacI/HindII e EcoRI, respectivamente. O cDNA da IL-10 humana foi clonado por PCR, a partir de CMSPs estimuladas por mitogénio e obtidas de dadores normais, usando-se primers oligonucleotídicos concebidos para amplificar um fragmento de 535 pares de bases que abrange toda a região codificante da IL-10 humana (Lewis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*:9743-9747, 1988). O cDNA foi subclonado para pBluescript e digerido com BamHI/EcoRI. Após separação em geles de agarose a 1%, os fragmentos inseridos de DNA foram excisados, electroeluídos e purificados. Foram preparadas sondas radiomarcadas com ^{32}P através do método de priming ao acaso.

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em geles de agarose a 1,5%, transferidos para membranas de nylon e sondados com o fragmento de DNA apropriado marcado com ^{32}P. As hibridizações processaram-se a 55°C durante 12 horas. As lavagens pós-hibridação foram realizadas a 55°C durante 20 minutos, em duas vezes, cada uma com 2x e 1x SSC contendo SDS a 0,2%.

Os resultados destas análises foram apresentados nas Figuras 4A e 4b. As análises de citoquinas por PCR foram realizadas com células antes da cultura (carreiras 0), após cultura na ausência de antigénio (carreiras -), ou após cultura na presença de 10 μg/ml de lisado de *L. braziliensis* (carreiras Lb) ou na presença de

10 μg/ml de LbeIF4A (carreiras IF). A Fig. 4A mostra os resultados da PCR do mRNA de citocinas para as CMSPs de três dos seis pacientes com leishmaníase mucosa analisados (JV, SZ e TE) e de um paciente (VA) com infecção por *L. amazonensis*, manifestada sob a forma de leishmaníase cutânea difusa (DCL). Em três dos seis pacientes com leishmaníase mucosa (TE, Fig. 4A; NO e EO, não apresentados), as CMSPs não cultivadas *in vitro* possuíam concentrações detectáveis de mRNA para o IFN-γ e a IL-4, assim como para a IL-2 (pacientes TE e EO). O mRNA de IL-10 não foi detectado nas CMSPs "em repouso" de qualquer dos pacientes com leishmaníase mucosa. No entanto, após a cultura in vitro na ausência de estimulação por antigénio, a síntese de mRNA de IL-10 foi alvo de regulação positiva na maioria das CMSPs de doença mucosa analisadas. Adicionalmente, as concentrações de mRNA de citocinas detectadas nas CMSPs "em repouso" dos pacientes TE, NO e EO baixaram até aos níveis basais.

O lisado de parasitas estimulou a expressão dos mRNAs das citocinas Th1 IFN-γ e IL-2, assim como o da citocina Th2 IL-4 (em três dos seis pacientes). Foi detectado um aumento do mRNA de IL-10 nas CMSPs de um dos pacientes (SZ) após cultura com o lisado de parasitas. Tanto o antigénio LbeIF4A como o lisado de parasitas estimularam a produção de mRNA de IFN-γ e IL-2 pelas CMSPs de todos os pacientes com leishmaníase mucosa, sendo que o LbeIF4A estimulou um perfil de citocinas exclusivamente Th1. De facto, o LbeIF4A exerceu uma regulação negativa sobre a síntese do mRNA de IL-10 que havia sido detectado, antes da estimulação com antigénio, nas culturas de CMSPs da maior parte dos pacientes com doença mucosa. Curiosamente, tal como se verificou com as CMSPs de pacientes com leismaníase mucosa, o LbeIF4A exerceu também uma regulação negativa sobre a síntese de mRNA de IL-10 no paciente com DCL, VA.

De modo geral, os níveis de mRNAs de IFN-γ e IL-2 aumentaram desde quantidades indetectáveis, antes da estimulação com antigénio, até níveis imediatamente visualizáveis em geles corados com brometo de etídio, após a estimulação com antigénio. No entanto, os mRNAs das citocinas IL-4 e IL-10 só puderam ser detectados após sondagem radioactiva dos produtos de PCR separados.

Foi efectuada uma análise semelhante por PCR sobre as CMSPs derivadas de pacientes com doença cutânea (Fig. 4B). As CMSPs em repouso provenientes de três (VS, JP e CA)(não apresentado)) dos quatro pacientes analisados revelaram níveis elevados de mRNAs tanto das citocinas Th1 (IFN-γ e IL-2) como das Th2 (IL-4 e IL-10). Foram detectados mRNAs do IFN-γ e da IL-2, mas não da IL-10 e IL-4, nas CMSPs em repouso do quarto doente com doença cutânea (AS). Assim, em contraste com o verificado nos pacientes com doença mucosa, os pacientes com leishmaníase cutânea possuem mRNA de IL-10, para além dos mRNAs de IL-4, IL-2 e IFN-γ, nas suas CMSPs em repouso. Curiosamente, enquanto que os mRNAs de IL-2 e IFN -γ foram reduzidos até níveis quase indetectáveis após a cultura *in vitro* das CMSPs na ausência de antigénio, os mRNAs de IL-10 permaneceram inalterados ou aumentaram. Assim, em pacientes com doença cutânea, os níveis em repouso do mRNA de IL-10 mantêm-se estáveis ou as suas CMSPs continuam a sintetizar mRNA de IL-10 na ausência de estimulação por antigénio. A observação de uma tal resposta em pacientes com leishmaníase cutânea poderá ser explorada para diferenciar os indivíduos que manifestam uma predisposição para o desenvolvimento de leishmaníase cutânea crónica daqueles que desenvolverão lesões de cura espontânea.

Todos os pacientes com doença cutânea responderam ao antigénio LbeIF4A, assim como ao lisado de parasitas, com uma regulação positiva da síntese de mRNAs de IL-2 e IFN-γ e, em dois dos quatro pacientes (VS e AS), a concentração de mRNA de IL-4 aumentou também após a estimulação com lisado de parasitas. Nos três pacientes (VS, JP e CA) com níveis "em repouso" detectáveis de mRNA de IL-10, tanto o LbeIF4A como o lisado de parasitas exerceram uma regulação negativa sobre a expressão do mRNA de IL-10.

Os perfis de mRNA de citocinas obtidos a partir das CMSPs dos pacientes com CL de cura espontânea (CL-SH) foram similares aos dos pacientes com ML no sentido em que (a) excepto em um indivíduo em que existiam níveis detectáveis de mRNA de IL-10, as CMSPs em repouso de três dos quatro pacientes analisados possuíam níveis detectáveis de mRNA de IL-2, IFN-γ e IL-4, mas pouco ou nenhum mRNA de IL-10; (b) o mRNA de IL-10 sofreu uma regulação positiva após cultura

das CMSPs sem antigénio, enquanto que os mRNAs de IL-2, IFN-γ e IL-4 diminuíram até aos níveis basais; e (c) o lisado de Leishmania estimulou a expressão de um perfil misto de citocinas Th1/Th2, enquanto que o LbeIF4A estimulou o aumento da expressão de mRNA de apenas as citocinas de tipo Th1 e exerceu uma regulação negativa sobre a expressão do mRNA de IL-10 nas culturas de CMSPs da maioria dos indivíduos com doença de cura espontânea (não apresentado).

EXEMPLO 7

Estimulação por LbeIF4A da Secreção de Citocinas pelas CMSPs

Este exemplo apresenta as concentrações no sobrenadante das citocinas secretadas pelas CMSPs de indivíduos infectados por *L. braziliensis* após estimulação com um antigénio LbeIF4A que não possui os 48 resíduos N-terminais da SEQ ID NO:2 (tal como descrito no Exemplo 3) ou com lisado de parasitas. Foram ensaiadas alíquotas dos sobrenadantes das CMSPs quanto à presença de IFN-γ, TNF-α, IL-4 e IL-10. O IFN-γ foi quantificado por um ensaio de ELISA em duplo sandwich usando mAb de ratinho anti-IFN-γ humano (Chemicon, Temucula, CA) e soro policlonal de coelho anti-IFN-γ humano. Foi usado rIFN-γ humano (Genentech Inc., San Francisco, CA) para gerar uma curva padrão. A IL-4 foi quantificada nos sobrenadantes por meio de ELISA em duplo sandwich usando um mAb de ratinho anti-IL-4 humana (M1) e um soro policlonal de coelho anti-IL-4 humana (P3). Foi usada IL-4 humana (Immunex Corp., Seattle, WA) para gerar uma curva-padrão na gama de 50 pg/ml a 1 ng/ml. A IL-10 foi medida usando um mAb de ratinho anti-IL-10 humana (PharMingen, San Diego, CA, Cat. # 18551D) para "capturar" a IL-10 secretada e um mAb biotinilado de ratinho anti-IL-10 humana (PharMingen, San Diego, CA, Cat. # 18562D) para detecção da IL-10 ligada utilizando peroxidase de rábano conjugada com streptavidina e com ABTS como substrato. Foi obtida uma curva-padrão usando rIL-10 humana (amavelmente cedida por DNAX Research Institute, Palo Alto, CA), na gama de 30 pg a 2 ng/ml.

As células de todos os três grupos de pacientes (i.e., de doença mucosa, cutânea e cutânea de cura espontânea) secretaram IFN-γ e TNF-α após a

estimulação com 10 μg/ml de antigénio LbeIF4A ou com 10μg/ml de lisado de parasitas (Figs. 5 e 6). Similarmente, o LbeIF4A estimulou as células dos pacientes infectados por *L. tropica* (Pacientes da "Tempestade no Deserto") a proliferar e a secretar IFN-γ (não mostrado). As concentrações de IFN-γ e de TNF-α detectadas nos sobrenadantes das CMSPs dos pacientes foram significativamente superiores às obtidas a partir de controlos não infectados. Na ausência de estimulação por antigénio, apenas as CMSPs dos pacientes com doença mucosa (cinco em seis) produziram níveis detectáveis de TNF-α para o sobrenadante (60 a 190 pg/ml). Foi detectada uma quantidade mínima ou mesmo nula de IL-4 ou IL-10 em todos os sobrenadantes analisados (não mostrado), indicando níveis abaixo do limite de detecção do ensaio de ELISA utilizado. Por comparação, o lisado de Leishmania estimulou igualmente as CMSPs a secretar IFN-γ e TNF-α e, em alguns pacientes, foi também detectada IL-10 (não apresentado). Considerados no seu conjunto, os resultados demonstram que o LbeIF4A estimula um perfil de citocinas predominantemente Th1 em CMSPs de indivíduos infectados por *L. braziliensis*, enquanto que o lisado de parasitas estimula um perfil misto de citocinas Th1/Th2.

Os níveis de TNF-α detectados nos sobrenadantes das CMSPs de pacientes com doença mucosa e doença de cura espontânea após estimulação por antigénio foram superiores aos encontrados nos pacientes com doença cutânea (Fig. 6). As CMSPs de quatro em cinco pacientes com doença mucosa (JV, SZ, AB e MB) exibiam concentrações de TNF-α no sobrenadante (0,80 a 2,20 ng/ml) superiores às detectadas em culturas de CMSPs de controlos não infectados após estimulação com lisado de parasitas. De modo similar, as mesmas CMSPs foram estimuladas pelo LbeIF4A para produzir concentrações sobrenadantes de TNF-α com valores que variaram entre 0,66 e 3,14 ng/ml. Por comparação com os controlos não infectados, as CMSPs de três (GS, HS e MCT) entre seis indivíduos com doença de cura espontânea analisados produziram concentrações mais elevadas de TNF-α em resposta ao lisado de parasitas, e todos os seis (GS, MS, AH, DJ, HS e MCT) dos seis indivíduos com doença de cura espontânea analisados produziram concentrações mais elevadas de TNF-α em resposta ao LbeIF4A. As concentrações

de TNF-α produzidas pelas CMSPs de pacientes com leishmaníase cutânea em resposta ao lisado de parasitas foram comparáveis às detectadas em controlos não infectados. No entanto, o LbeIF4A estimulou as CMSPs em três destes pacientes (RJ, AD e JS) no sentido de produzirem TNF-α. Estes pacientes poderão encontrar-se em vias de desenvolver uma leishmaníase cutânea aguda.

EXEMPLO 8

Estimulação da Produção de IL-12 Pelo LbeIF4A

Este exemplo mostra que o LbeIF4A estimula as CMSPs de indivíduos infectados por *L. braziliensis*, macrófagos humanos em cultura, CMSPs aderentes obtidos do sangue de dadores normais e a linha celular da leucemia mielóide humana THP-1 a secretar IL-12. Foi já demonstrado que a IL-12 desempenha um papel imunoregulador essencial no desenvolvimento da imunidade mediada por células, na geração das respostas Th1 e na produção de IFN-γ em infecções intracelulares bacterianas ou parasitárias. O polipéptido LbeIF4A usado foi o antigénio LbeIF4A que não possui os 48 resíduos N-terminais da SEQ ID NO:2 (tal como descrito no Exemplo 3).

Foi medida por RIA (limite de detecção de 10 pg/ml) a concentração da subunidade p40 da IL-12 em sobrenadantes livres de células, usando os pares mAb C11.79/C8.6, tal como descrito por D'Andrea et al., *J. Exp. Med. 179*:1387-1398, 1992. O heterodímero biologicamente activo p70 da IL-12 (limite de detecção 1 pg/ml) foi medido tal como descrito por Kubin et al., *Blood 83*:1847-1855, 1994.

A Fig. 7A mostra que 10 μg/ml de LbeIF4A (LeIF) estimularam as CMSPs dos pacientes com doença mucosa a secretar p40 de IL-12 para o sobrenadante da cultura numa quantidade significativamente superior relativamente aos níveis de p40 de IL-12 obtidos ao usar-se como antigénio 10 μg/ml de lisado de parasitas (Lb). A quantidade de p40 de IL-12 secretada na ausência de lisado ou de antigénio é também mostrada (Med.). A mesma figura mostra também que 10 μg/ml de IL-10 exerceram uma regulação negativa sobre a produção de p40 de IL-12 por parte das CMSPs dos pacientes após a estimulação com LbeIF4A (LeIF + IL-10) ou lisado (Lb + IL-10).

As CMSPs de indivíduos não infectados produziram igualmente p40 de IL-12 quando cultivadas com LbeIF4A (LeIF, Fig. 7B), embora não tenha sido detectada a presença de p40 em resposta ao lisado de parasitas (Lb). Este achado poderá sugerir que o IFN-γ poderá participar na produção de p40 induzida por lisado que se observa nas CMSPs dos pacientes, as quais produziram 5-100 vezes mais IFN-γ do que as CMSPs normais após a estimulação com antigénio (ver Fig. 5).

Para determinar se a p40 de IL-12 observada nas culturas de CMSPs estimuladas por antigénio reflectia a citocina biologicamente activa, pesquisou-se igualmente a p70 de IL-12 nestas culturas (Figs. 7C e 7D). Em geral, a produção de p70 ocorreu em paralelo com a de p40, o que demonstra que foi produzida IL-12 biologicamente activa em resposta ao LbeIF4A tanto em CMSPs de pacientes como em células normais.

O antigénio LbeIF4A estimula igualmente a produção de IL-12 em culturas de macrófagos humanos (Fig. 9A) e em CMSPs aderentes (Fig. 9B). As células aderentes foram preparadas a partir de CMSPs provenientes do sangue de dadores normais e separadas por centrifugação em gradiente de Ficoll. Foram cultivadas 2 x 10^6 CMSPs durante 2 horas em 500 μl RPMI, soro AB humano a 2%. As células aderentes foram purificadas por lavagem das placas por 3 vezes com PBS. Foram então adicionados 500 μl do meio de teste (RPMI, soro AB humano a 2%) com o respectivo estímulo (IFN-γ 1000 U/ml, LbeIF4A (Lf) 10 μg/ml). Os sobrenadantes foram recolhidos após 18 horas.

A produção de IL-12 por parte das CMSPs aderentes foi medida através de um bioensaio de captura usando blastos PHA com 5 dias. Abreviadamente, o anticorpo de captura da IL-12 C11.5.14 (amavelmente cedido pelo Winstar Institute) foi usado para revestir placas de 96 poços. Os sobrenadantes da experiência de indução e a IL-12 recombinante, como padrão, foram incubados durante 4 horas. Após diversos passos de lavagem, foram adicionados blastos PHA com 5 dias e a proliferação destes blastos foi usada para determinar as concentrações de IL-12 nos sobrenadantes das células aderentes.

Foram gerados macrófagos através da cultura de células aderentes (2 x 10^6 CMSPs) durante 5 dias em meio de teste. Em seguida, os macrófagos foram lavados

em PBS e foram adicionados 500 µl RPMI, soro AB humano a 2% e 1000 U/ml de IFN-γ. Os macrófagos foram estimulados com LbeIF4A (10 µg/ml) ou cultivados em meio (M) apenas. Em um dos conjuntos de experiência, foram incubados macrófagos de controlo do LbeIF4A com LbeIF4A em 500 µl RPMI, soro AB humano a 2%, sem IFN-γ. Os sobrenadantes foram recolhidos após 18 horas e usados para a indução da proliferação dependente de IL-12. Abreviadamente, incubaram-se blastos com 5 dias nos sobrenadantes dos macrófagos durante 2 dias. Durante as últimas 18 horas, foi adicionada ^{3}H-timidina. Foi adicionado soro policlonal neutralizante de cabra anti-IL-12 (5 µg/ml), tal como indicado.

Adicionalmente, o LbeIF4A estimula a produção de IL-12 na linha celular de leucemia mielóide humana, THP-1 (Fig. 10). As células foram cultivadas a 10^{6} células/ml durante 24-48 horas em meio RPMI isento de endotoxinas contendo soro fetal bovino a 5%. O LbeIF4A a 10 µg/ml actuou sinergisticamente com o IFN-γ, estimulando as células THP-1 a secretar IL-12. Estes resultados indicam a utilidade do LbeIF4A como vacina.

EXEMPLO 9

Efeito da IL-12 e da IL-10 Sobre a Indução da Produção de IFN-γ Pelo LbeIF4A

Este exemplo examina a interacção entre a IL-12, a IL-10 e o IFN-γ em resposta ao polipéptido LbeIF4A que não possui os 48 resíduos N-terminais da SEQ ID NO:2 (tal como descrito no Exemplo 3). Tal como mostra a Fig. 8A, as CMSPs de pacientes com leishmaníase mucosa foram estimuladas com 10 µg/ml de LbeIF4A na ausência (LeIF) ou na presença de 10 ng/ml de anti-IL-12 (LeIF + Anti-IL-12), ou IL-10 (LeIF + IL-10), e os sobrenadantes de cultura foram ensaiados quanto à secreção de IFN-γ. Tanto o mAb anti-IL-12 como a IL-10 anularam a secreção de IFN-γ induzida por LbeIF4A. No entanto, o mAb anti-IL-12 reduziu apenas parcialmente a produção de IFN-γ após estimulação com lisado de Leishmania (Fig. 8B). Estes resultados mostram que a produção de IFN-γ é dependente da IL-12, e é inibida pela IL-10, enquanto que a produção de IL-12 é regulada tanto por uma via dependente do IFN-γ como por uma via independente.

EXEMPLO 10

Estimulação por LbeIF4A de um Perfil TH1 em Ratinhos

Este exemplo demonstra que o polipéptido LbeIF4A que não possui os 48 resíduos N-terminais da SEQ ID NO:2 (tal como descrito no Exemplo 3) estimula um perfil de citocinas Th1 dominante em ratinhos BALB/c. Os animais foram activados com LbeIF4A ou com 8E (a porção C-terminal da proteína mitocondrial hsp70 de *L. braziliensis*, que estimula as CMSPs dos pacientes a produzir níveis elevados de IL-10), usando quilA ou CFA como adjuvantes. Dez dias após a activação, as células dos nódulos linfáticos (LN) foram re-estimuladas *in vitro* com os antigénios recombinantes e os sobrenadantes de cultura foram analisados quanto às citocinas secretadas. Os resultados (Fig. 11) mostram que as células LN dos ratinhos activados com LbeIF4A proliferaram e secretaram um perfil de citocinas quase exclusivamente Th1 (IFN-γ) após o estímulo com LbeIF4A usando ambos os tipos de adjuvantes. Em contraste, as células LN de ratinhos activados com 8E produziram uma resposta de citocinas de tipo Th0, com o CFA como adjuvante, ou Th1/Th2 (com o quilA como adjuvante), com uma forte tendência no sentido das citocinas Th2, IL-4 e IL-10, em resposta específica ao estímulo com 8E. De modo similar, os ratinhos activados com lisado de parasitas produziram um perfil misto de citocinas, um resultado que poderá pôr em causa o uso de lisado de parasitas em separado como um candidato a vacina (Fig. 11).

Estes resultados indicam que o LbeIF4A poderá ser usado como um adjuvante. Uma vez que o LbeIF4A induziu uma poderosa resposta Th1, incluindo as duas citocinas mais claramente associadas à protecção na leishmaníase experimental, o IFN-γ e a IL-12, estudámos a capacidade manifestada por este antigénio na protecção de ratinhos contra a leishmaníase. Foram imunizados ratinhos BALB/c em dose única com LbeIF4A e sem adjuvante, seguindo-se uma infecção subcutânea com *L. major* sete dias mais tarde. Em comparação com o grupo de controlo, o LbeIF4A proporcionou uma protecção significativa contra a infecção por *L. major* (Fig. 12). Assim, um antigénio heterólogo derivado de *L. braziliensis* poderá conferir alguma protecção contra a infecção por *L. major*, o que

sugere que pelo menos alguns dos epitopos "protectores" são conservados entre os dois parasitas.

A partir do acima descrito se poderá apreciar que, se bem que tenham sido apresentadas diversas formas específicas de realização do invento para fins de ilustração, o mesmo poderá ser alvo de diversas modificações.

Lisboa, - 5 DEZ. 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

FRANCISCO DE NOVAES
AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Av. Duque [illegible], 31, F - 1000 LISBOA
TEL.: 54[illegible]

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(I) REQUERENTE: Corixa, Corporation

(ii) TÍTULO DO INVENTO: COMPOSTOS E MÉTODOS PARA A ESTIMULAÇÃO E REFORÇO DE RESPOSTAS IMUNITÁRIAS PROTECTORAS E DA PRODUÇÃO DE IL-12

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 2

(iv) MORADA PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) DESTINATÁRIO: SEED e BERRY

(B) RUA: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue

(C) CIDADE: Seattle

(D) ESTADO: Washington

(E) Pais: EUA

(F) CODIGO POSTAL: 98104-7092

(v) FORMA DE LEITURA EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: disquete

(B) COMPUTADOR: compatível com PC IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #10, Versão #1.30

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO DE PATENTE:

(A) NUMERO DO PEDIDO DE PATENTE: US

(B) DATA DE ENTRDA: 24-ABR-1995

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O ADVOGADO/AGENTE:

(A) NOME: Kadlecek, Ann T.

(B) NÚMERO DE REGISTO: P-39, 244

(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA: 210121.404PC

(ix) INFORMAÇÃO SOBRE TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: (206)622-4900

(B) TELEFAX: (206) 682-6031

(C) TELEX: 3723836 SEEDANDBERRY

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 1618 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(ix) CARACTERIZAÇÃO:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 115..1326

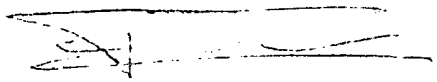
(x) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

```
CCACTCTCTC GGTCGTCTGT CTCCCACGCG CGCACGCAGT TGATTTCCGC CTTCTTAAAC      60

GCTCTCTTTT TTTTTATTTT TCACCTGACC AACCGCACCA CGTCGGCCTC CATC ATG       117
                                                              Met
                                                               1

TCG CAG CAA GAC CGA GTT GCC CCA CAG GAC CAG GAC TCG TTC CTC GAC       165
Ser Gln Gln Asp Arg Val Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu Asp
             5                  10                  15

GAC CAG CCC GGC GTC CGC CCG ATC CCG TCC TTC GAT GAC ATG CCG TTG       213
Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro Leu
         20                  25                  30
```



```
CAC CAG AAC CTT CTG CGC GGC ATC TAC TCG TAC GGC TTC GAG AAA CCG      261
His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys Pro
     35                  40                  45

TCC AGC ATC CAG CAG CGC GCC ATC GCC CCC TTC ACG CGC GGC GGC GAC      309
Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly Asp
 50                  55                  60                  65

ATC ATC GCG CAG GCG CAG TCC GGT ACC GGC AAG ACG GGC GCC TTC TCC      357
Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe Ser
                 70                  75                  80

ATC GGC CTG CTG CAG CGC CTG GAC TTC CGC CAC AAC CTG ATC CAG GGC      405
Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His Asn Leu Ile Gln Gly
             85                  90                  95

CTC GTG CTC TCC CCG ACC CGC GAG CTG GCC CTG CAG ACG GCG GAG GTG      453
Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu Val
        100                 105                 110

ATC AGC CGC ATC GGC GAG TTC CTG TCG AAC AGC GCG AAG TTC TGT GAG      501
Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser Ala Lys Phe Cys Glu
    115                 120                 125

ACC TTT GTG GGT GGC ACG CGC GTG CAG GAT GAC CTG CGC AAG CTG CAG      549
Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu Gln
130                 135                 140                 145

GCT GGC GTC GTC GTC GCC GTG GGG ACG CCG GGC CGC GTG TCC GAC GTG      597
Ala Gly Val Val Val Ala Val Gly Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp Val
                150                 155                 160

ATC AAG CGC GGC GCG CTG CGC ACC GAG TCC CTG CGC GTG CTG GTG CTC      645
Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu Arg Val Leu Val Leu
            165                 170                 175
```

GAC GAG GCT GAT GAG ATG CTG TCT CAG GGC TTC GCG GAT CAG ATT TAC 693
Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser Gln Gly Phe Ala Asp Gln Ile Tyr
180 185 190

GAG ATC TTC CGC TTC CTG CCG AAG GAC ATC CAG GTC GCG CTC TTC TCC 741
Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe Ser
195 200 205

GCC ACG ATG CCG GAG GAG GTG CTG GAG CTG ACA AAG AAG TTC ATG CGC 789
Ala Thr Met Pro Glu Glu Val Leu Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met Arg
210 215 220 225

GAC CCC GTA CGC ATT CTC GTG AAG CGC GAG AGC CTG ACG CTG GAG GGC 837
Asp Pro Val Arg Ile Leu Val Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Glu Gly
230 235 240

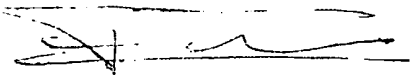
ATC AAG CAG TTC TTC ATC GCC GTC GAG GAG GAG CAC AAG CTG GAC ACG 885
Ile Lys Gln Phe Phe Ile Ala Val Glu Glu Glu His Lys Leu Asp Thr
245 250 255

CTG ATG GAC CTG TAC GAG ACC GTG TCC ATC GCG CAG TCC GTC ATC TTC 933
Leu Met Asp Leu Tyr Glu Thr Val Ser Ile Ala Gln Ser Val Ile Phe
260 265 270

GCC AAC ACC CGC CGC AAG GTG GAC TGG ATC GCC GAG AAG CTG AAT CAG 981
Ala Asn Thr Arg Arg Lys Val Asp Trp Ile Ala Glu Lys Leu Asn Gln
275 280 285

AGC AAC CAC ACC GTC AGC AGC ATG CAC GCC GAG ATG CCC AAG AGC GAC 1029
Ser Asn His Thr Val Ser Ser Met His Ala Glu Met Pro Lys Ser Asp
290 295 300 305

CGC GAG CGC GTC ATG AAC ACC TTC CGC AGC GGC AGC TCC CGC GTG CTC 1077
Arg Glu Arg Val Met Asn Thr Phe Arg Ser Gly Ser Ser Arg Val Leu
310 315 320



```
GTA ACG ACC GAC CTC GTG GCC CGC GGC ATC GAC GTG CAC CAC GTG AAC      1125
Val Thr Thr Asp Leu Val Ala Arg Gly Ile Asp Val His His Val Asn
            325                 330                 335

ATC GTC ATC AAC TTC GAC CTG CCG ACG AAC AAG GAG AAC TAC CTG CAC      1173
Ile Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Thr Asn Lys Glu Asn Tyr Leu His
        340                 345                 350

CGC ATT GGC CGC GGC GGC CGC TAC GGC GTA AAG GGT GTT GCC ATC AAC      1221
Arg Ile Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Gly Val Lys Gly Val Ala Ile Asn
    355                 360                 365

TTC GTG ACG GAG AAA GAC GTG GAG CTG CTG CAC GAG ATC GAG GGG CAC      1269
Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Gly His
370                 375                 380                 385

TAC CAC ACG CAG ATC GAT GAG CTC CCG GTG GAC TTT GCC GCC TAC CTC      1317
Tyr His Thr Gln Ile Asp Glu Leu Pro Val Asp Phe Ala Ala Tyr Leu
                390                 395                 400

GGC GAG TGA GCGGGCCCCT GCCCCCCTTC CCTGCCCCCC TCTCGCGACG              1366
Gly Glu *

AGAGAACGCA CATCGTAACA CAGCCACGCG AACGATAGTA AGGGCGTGCG GCGGCGTTCC    1426

CCTCCTCCTG CCAGCGGCCC CCCTCCGCAG CGCTTCTCTT TTGAGAGGGG GGCAGGGGGA    1486

GGCGCTGCGC CTGGCTGGAT GTGTGCTTGA GCTTGCATTC CGTCAAGCAA GTGCTTTGTT    1546

TTAATTATGC GCGCCGTTTT GTTGCTCGTC CCTTTCGTTG GTGTTTTTTC GGCCGAAACG    1606

GCGTTTAAAG CA                                                        1618
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 403 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

```
Met Ser Gln Gln Asp Arg Val Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu
 1               5                  10                  15

Asp Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro
            20                  25                  30

Leu His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys
        35                  40                  45

Pro Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly
    50                  55                  60

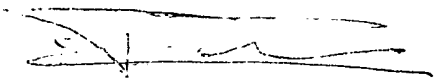
Asp Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe
65                  70                  75                  80

Ser Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His Asn Leu Ile Gln
                85                  90                  95

Gly Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu
            100                 105                 110

Val Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser Ala Lys Phe Cys
        115                 120                 125

Glu Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu
    130                 135                 140
```



Gln Ala Gly Val Val Val Ala Val Gly Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp
145 150 155 160

Val Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu Arg Val Leu Val
165 170 175

Leu Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser Gln Gly Phe Ala Asp Gln Ile
180 185 190

Tyr Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe
195 200 205

Ser Ala Thr Met Pro Glu Glu Val Leu Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met
210 215 220

Arg Asp Pro Val Arg Ile Leu Val Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Glu
225 230 235 240

Gly Ile Lys Gln Phe Phe Ile Ala Val Glu Glu Glu His Lys Leu Asp
245 250 255

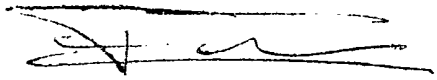
Thr Leu Met Asp Leu Tyr Glu Thr Val Ser Ile Ala Gln Ser Val Ile
260 265 270

Phe Ala Asn Thr Arg Arg Lys Val Asp Trp Ile Ala Glu Lys Leu Asn
275 280 285

Gln Ser Asn His Thr Val Ser Ser Met His Ala Glu Met Pro Lys Ser
290 295 300

Asp Arg Glu Arg Val Met Asn Thr Phe Arg Ser Gly Ser Ser Arg Val
305 310 315 320

Leu Val Thr Thr Asp Leu Val Ala Arg Gly Ile Asp Val His His Val
325 330 335



Asn Ile Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Thr Asn Lys Glu Asn Tyr Leu
340 345 350

His Arg Ile Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Gly Val Lys Gly Val Ala Ile
355 360 365

Asn Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Gly
370 375 380

His Tyr His Thr Gln Ile Asp Glu Leu Pro Val Asp Phe Ala Ala Tyr
385 390 395 400

Leu Gly Glu

REIVINDICAÇÕES

1- Uma molécula de DNA isolada, caracterizada pelo facto de compreender uma sequência de DNA seleccionada a partir do grupo que consiste em:

(a) Nucleótidos 115 a 1323 da SEQ ID NO:1;

(b) Sequências de DNA que se hibridizam com uma sequência nucleotídica complementar aos nucleótidos 115 a 1323 da SEQ ID NO:1 sob condições moderadamente rigorosas, sendo que a sequência de DNA codifica para um polipéptido que estimula uma resposta imunitária Th1 em células mononucleares do sangue periférico obtidas a partir de um indivíduo infectado por *Leishmania*; e

(c) DNA que codifica para um polipéptido codificado por qualquer uma das sequências de DNA que se seguem.

2- Um vector recombinante de expressão, caracterizado pelo facto de compreender a molécula de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 1.

3- Uma célula hospedeira transformada ou transfectada com o vector de expressão, conforme reivindicado na reivindicação 2.

4- Um método para a preparação de um polipéptido que estimula uma resposta imunitária Th1 em células mononucleares do sangue periférico obtidas a partir de um indivíduo infectado por *Leishmania*, caracterizado pelo facto de compreender a cultura da célula hospedeira da reivindicação 3, sob condições que promovam a expressão da sequência de DNA, e a recuperação do polipéptido.

5- Um polipéptido caracterizado pelo facto de compreender uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de DNA, conforme reivindicado na reivindicação 1.

6- Um polipéptido, caracterizado pelo facto de compreender os aminoácidos 49-403 da SEQ ID NO:2, ou uma sua variante que difira apenas em substituições e/ou modificações conservativas.

7- Um método para a avaliação da capacidade de um paciente para gerar uma resposta imunitária, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) a colocação em contacto de uma amostra biológica obtida de um paciente com o polipéptido tal como reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, sendo que a amostra biológica compreende células seleccionadas a partir do grupo que consiste em células mononucleares do sangue periférico, monócitos, células B, células dendríticas, macrófagos, e combinações destas; e

(b) a medição da resposta das células.

8- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 7, caracterizado pelo facto de a resposta ser uma resposta proliferativa.

9- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 7, caracterizado pelo facto de a resposta ser a secreção de uma citocina seleccionada a partir do grupo que consiste em Interferão-γ, Interleucina-2, p70 da Interleucina-12, subunidade p40 da Interleucina-12, Interleucina-1 e Factor de Necrose de Tumores-α.

10- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 7, caracterizado pelo facto de a resposta ser a expressão de mRNA codificando para uma citocina seleccionada a partir do grupo que consiste em Interferão-γ, Interleucina-2, subunidade p40 da Interleucina-12, Interleucina-1 e Factor de Necrose de Tumores-α.

11- Um método para a estimulação de uma resposta Th1 numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de compreender a colocação em contacto de uma amostra biológica obtida de um indivíduo infectado por *Leishmania*, com o polipéptido tal como reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, sendo que a amostra biológica compreende células seleccionadas a partir do grupo que consiste em células mononucleares do sangue periférico, monócitos, células B, células dendríticas, macrófagos, e combinações destas.

12- Um método para promover a regulação negativa da expressão de Interleucina-10 numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de compreender a colocação em contacto, de uma amostra biológica obtida de um indivíduo infectado por *Leishmania*, com o polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, sendo que a amostra biológica compreende células seleccionadas a partir do grupo

que consiste em células mononucleares do sangue periférico, monócitos, células B, células dendríticas, macrófagos, e combinações destas.

13- Um anticorpo monoclonal, caracterizado pelo facto de se ligar especificamente ao polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6.

14- Uma composição farmacêutica, caracterizada pelo facto de comprender o polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6 e um veículo fisiologicamente aceitável.

15- Uma vacina para estimular uma resposta imunitária protectora contra um antigénio, caracterizada pelo facto de comprender o polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, e um antigénio.

16- Um método para a estimulação da produção de IL-12 numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de compreender a colocação em contacto de uma amostra biológica com o polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, sendo que a amostra biológica compreende células seleccionadas a partir do grupo que consiste em células mononucleares do sangue periférico, monócitos, células B, células dendríticas e combinações destas.

17- Um polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo facto de ser para a estimulação da produção de anticorpos num paciente, que se liguem a parasitas de *Leishmania*.

18- Um polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, para a estimulação de uma resposta imunitária Th1 num paciente.

19- Um polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, para a regulação negativa da expressão de Interleucina-10 num paciente.

20- Um polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo facto de ser para a estimulação da Interleucina-12 num paciente.

21- Um polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo facto de ser para o tratamento de um paciente afectado por uma doença que responda à estimulação pela Interleucina-12.

22- Um polipéptido, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de a doença ser uma doença infecciosa.

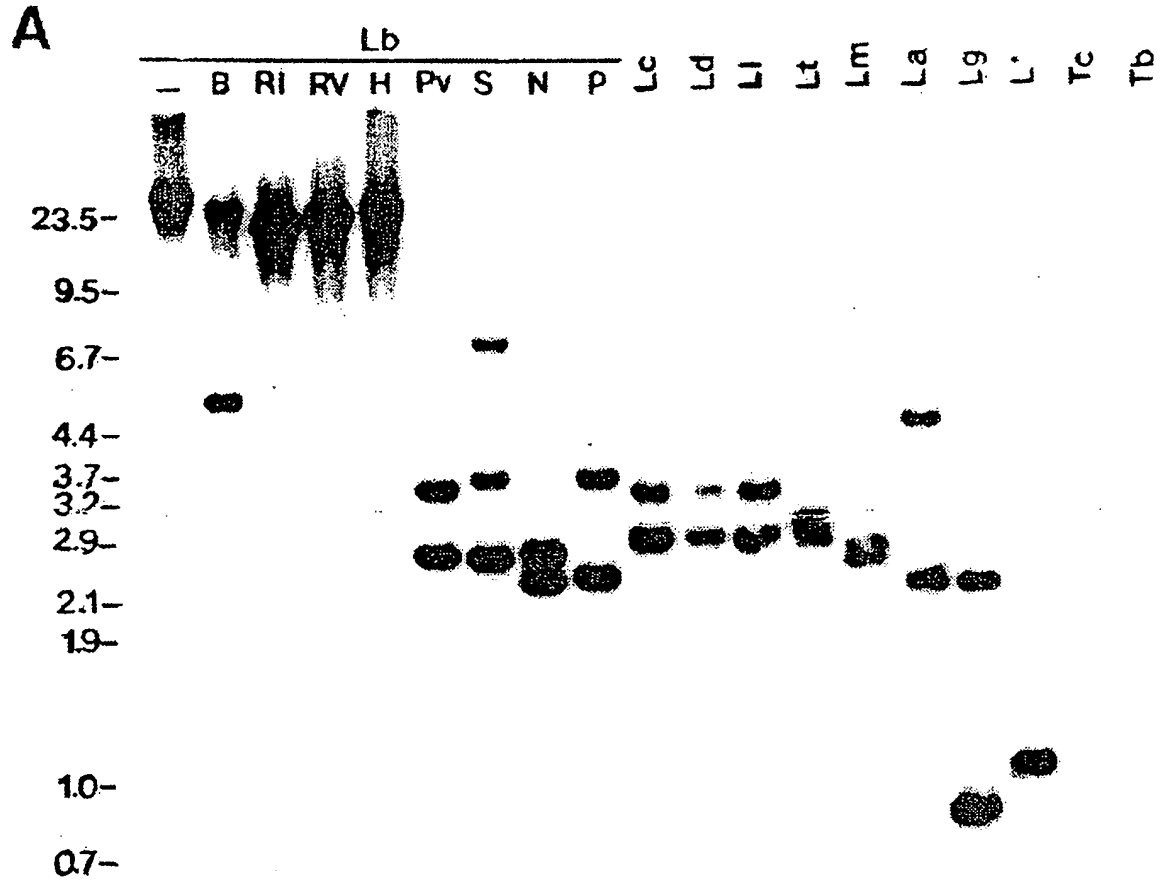
23- Um polipéptido, conforme reivindicado pela reivindicação 21, caracterizado pelo facto de a doença ser o cancro.

24- Um polipéptido, conforme reivindicado nas reivindicações 5 ou 6, caracterizado pelo facto de ser para o reforço de uma resposta imunitária celular e/ou humoral num paciente.

Lisboa, - 5 DEZ. 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

FRANCISCO DE NOVAES
AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Av. Duque D' Ávila, 32, 1 - 1000 LISBOA
TEL.: 547763 / 3155038



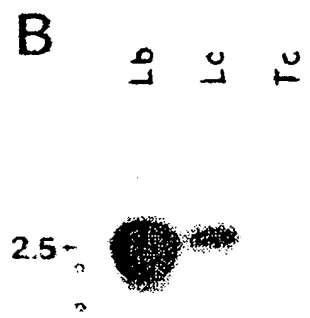
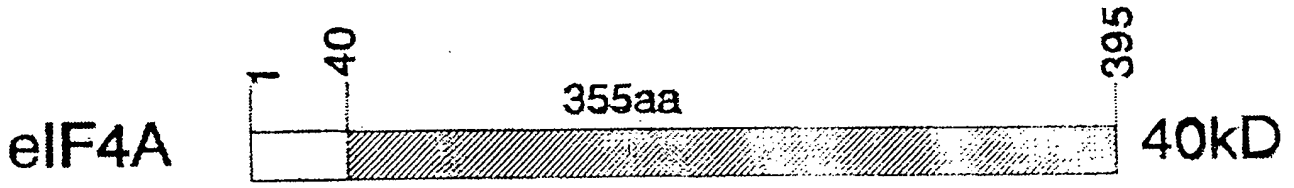
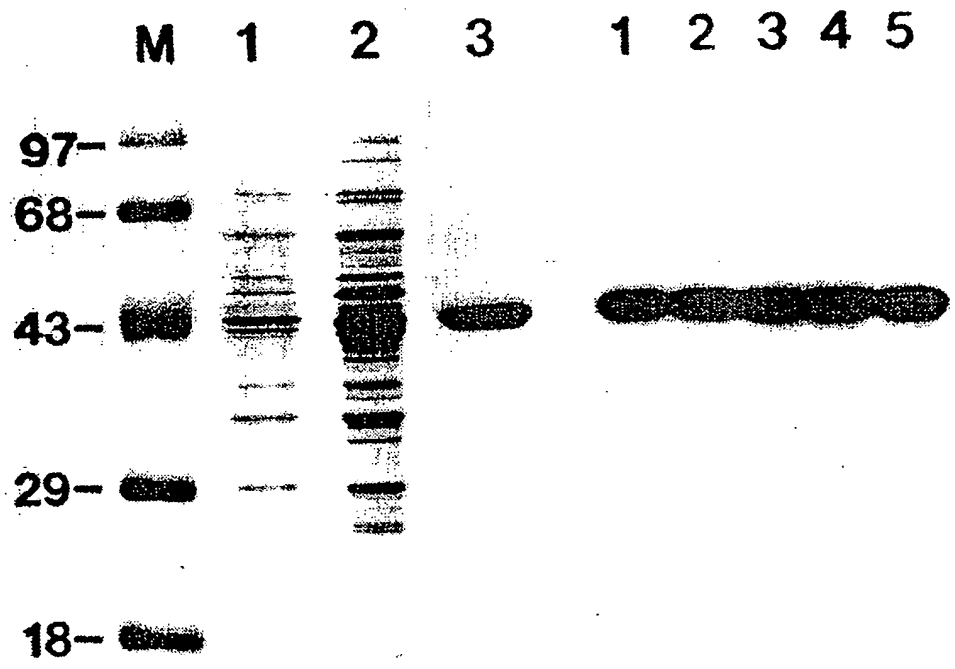


FIG. 1

14 FOLHAS - FOLHA 1





A B

FIG. 2

14 FOLHAS - FOLHA 2

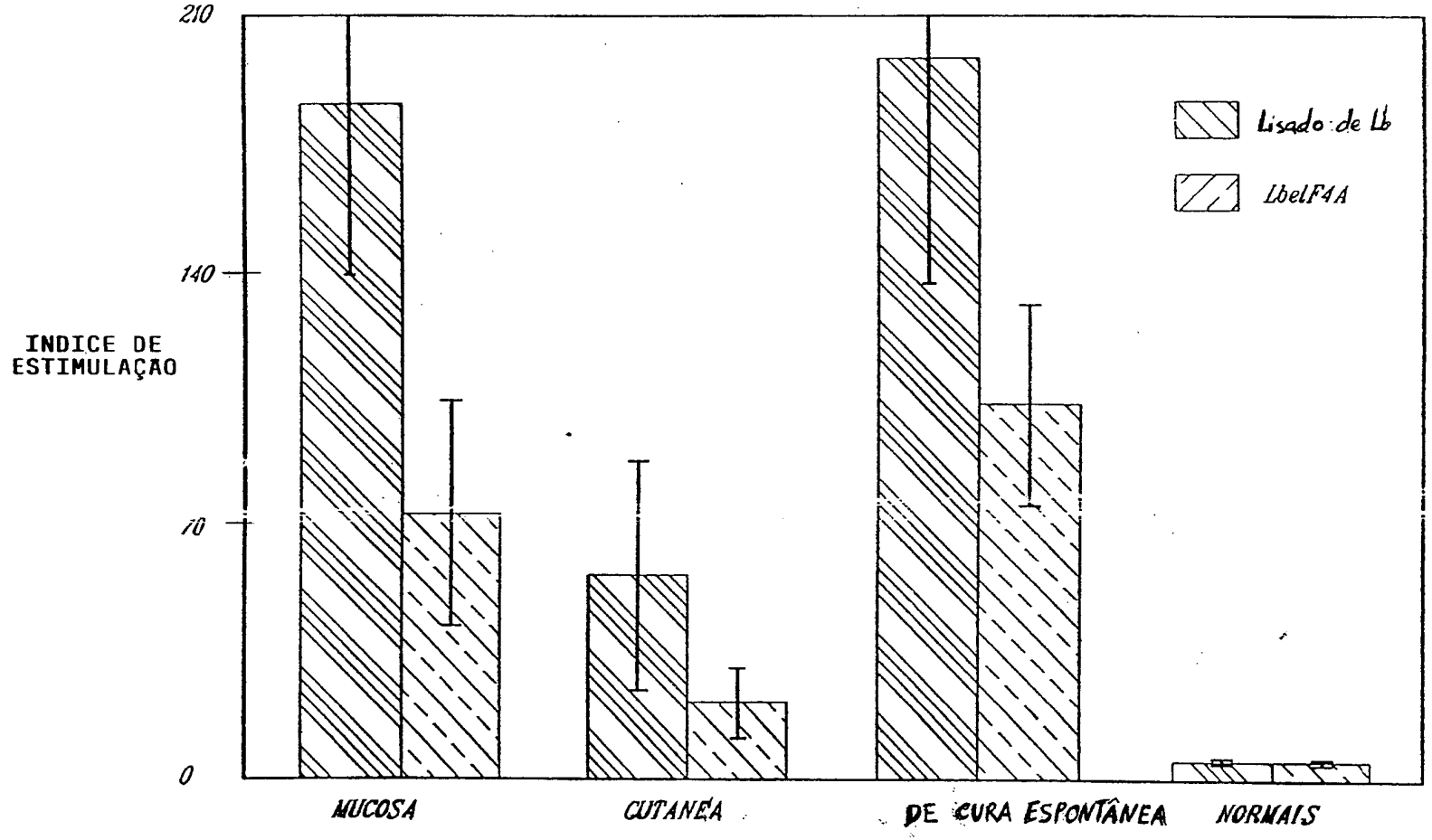


Fig. 3

14 FOLHAS - FOLHA 3

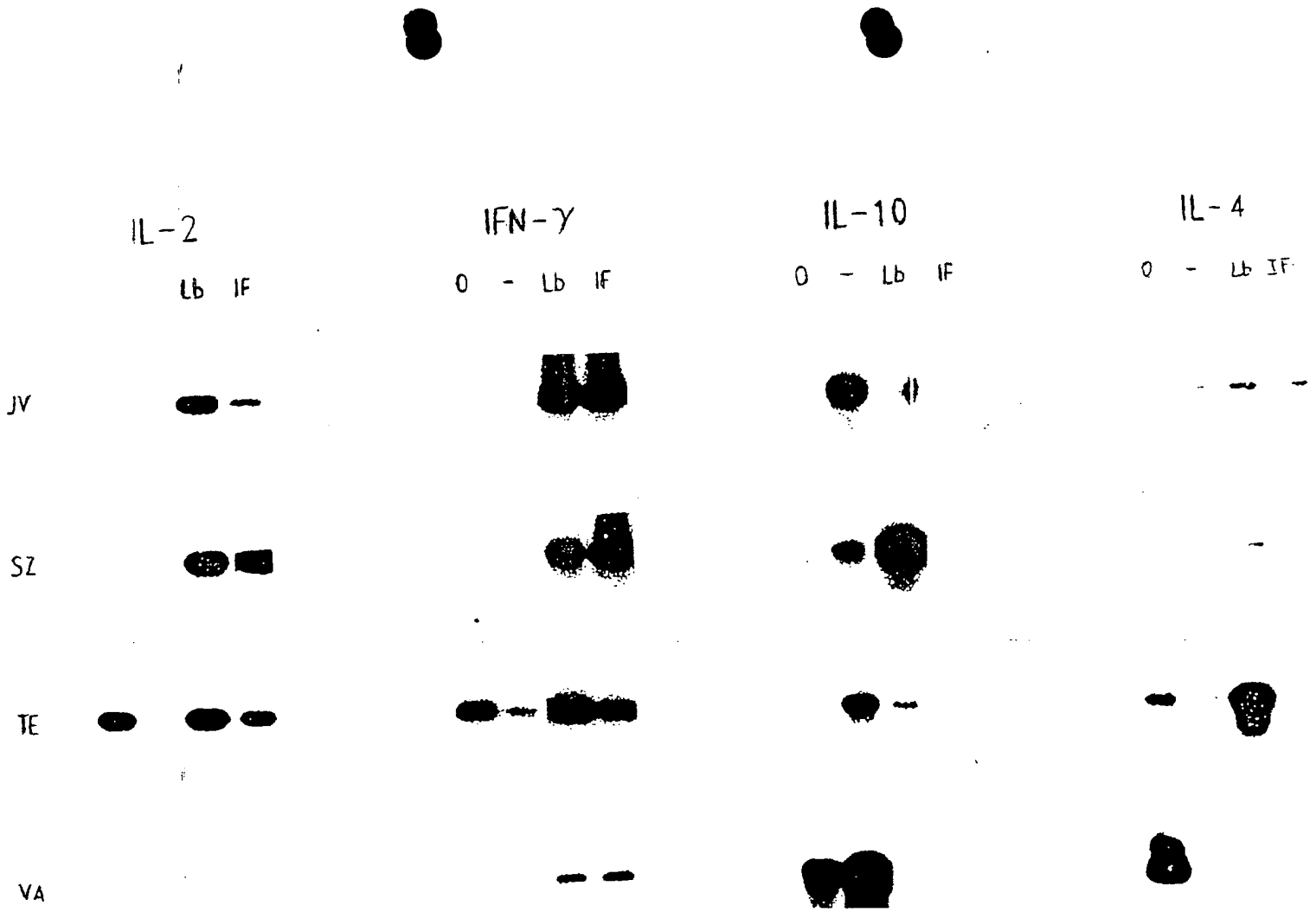


Fig. 4A

14 FOLHAS - FOLHA 4

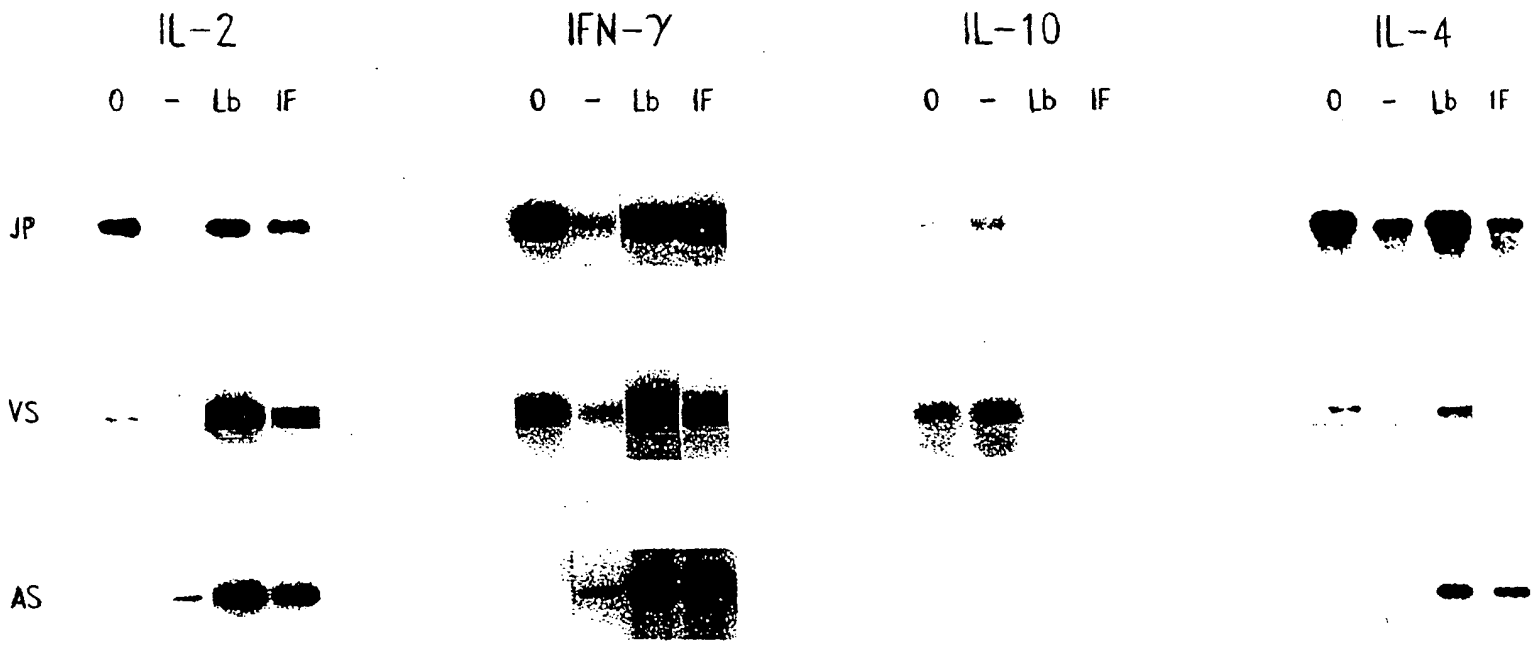


Fig. 4B

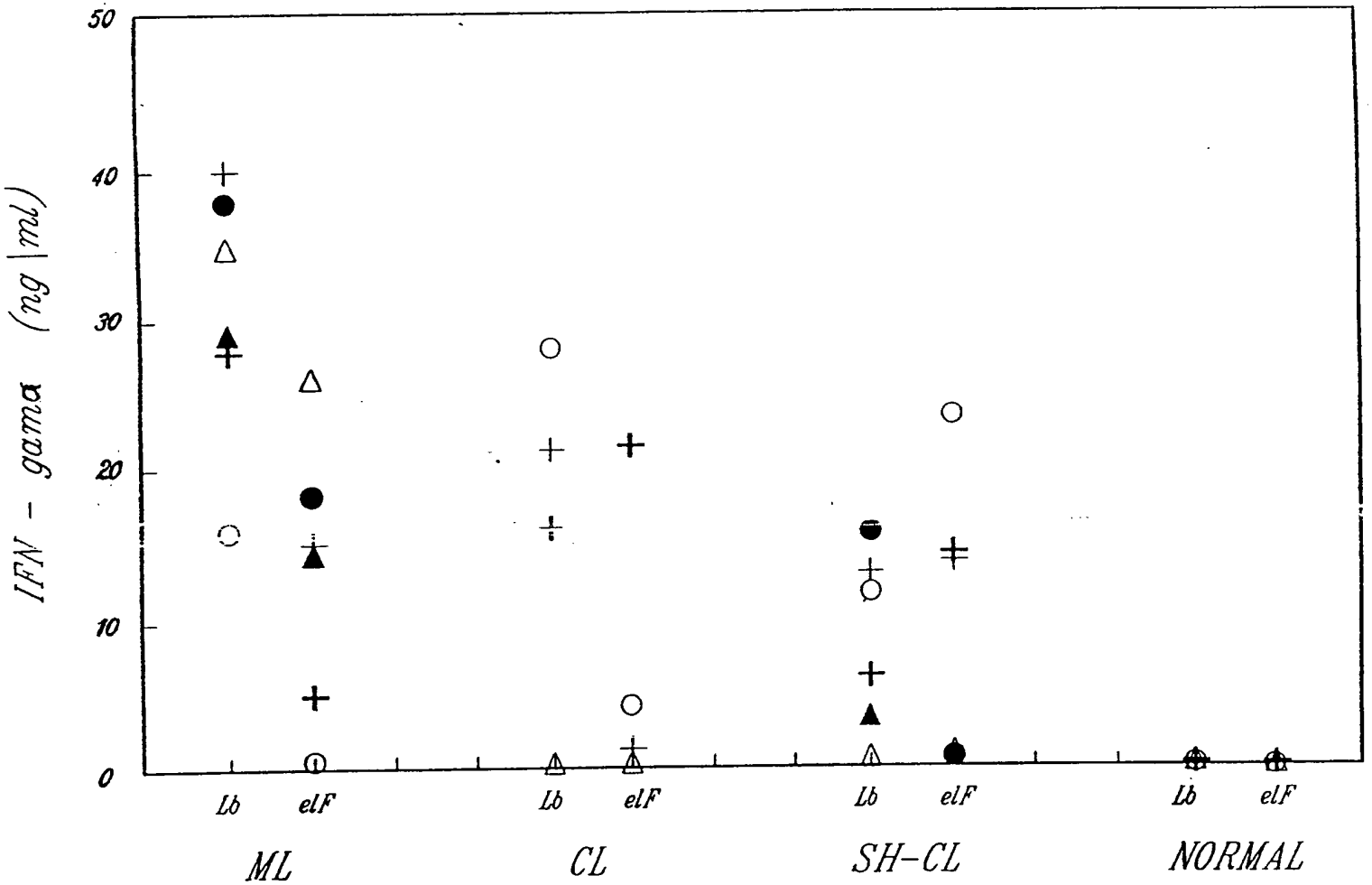

IFN - gama (ng/ml)
50
40
30
20
10
0
Lb
elF
Lb
elF
Lb
elF
Lb
elF
ML
CL
SH-CL
NORMAL

Fig. 5

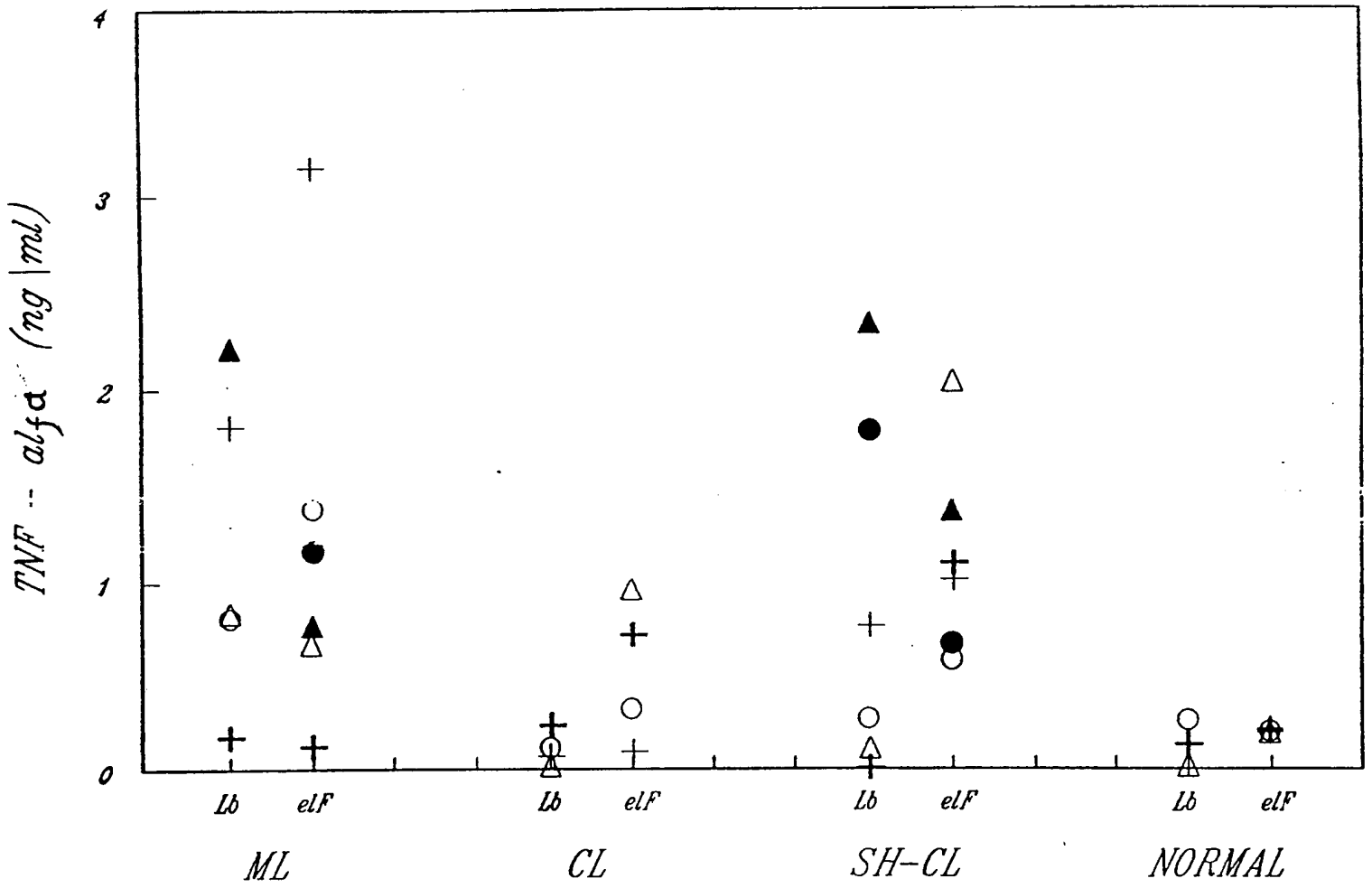


Fig. 6

14 FOLHAS - FOLHA 7

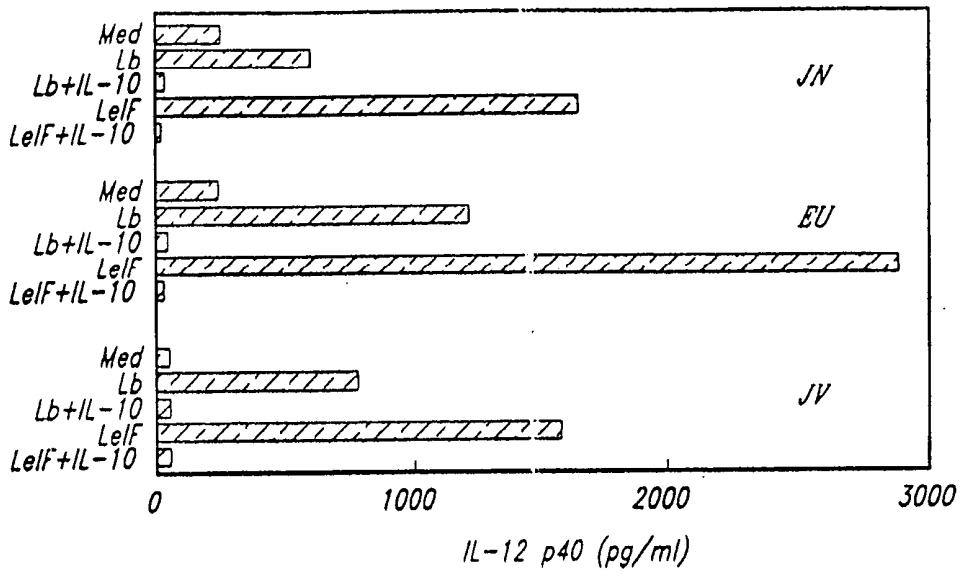

Med
Lb
Lb+IL-10
LelF
LelF+IL-10
JN
EU
JV
0
1000
2000
3000
IL-12 p40 (pg/ml)

Fig 7A

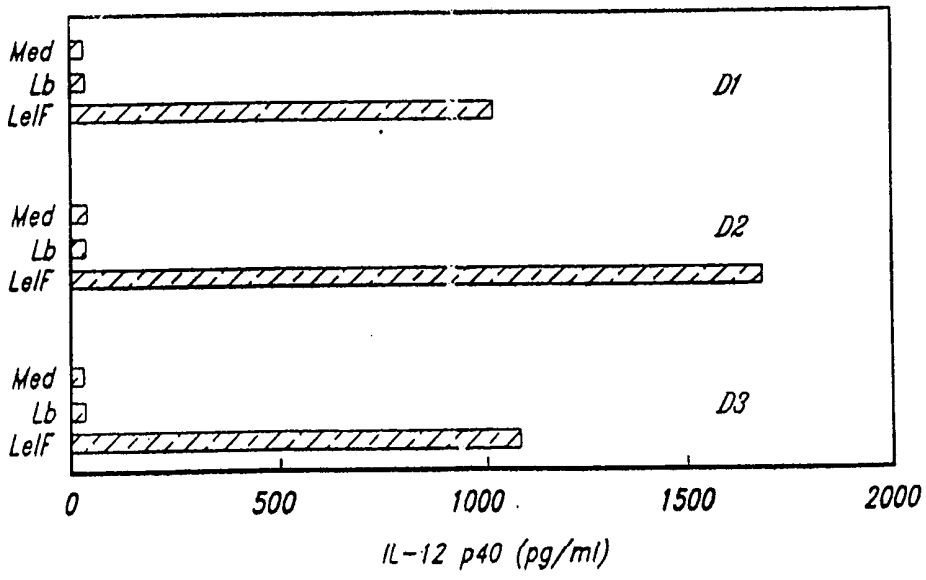

Med
Lb
LelF
D1
D2
D3
0
500
1000
1500
2000
IL-12 p40 (pg/ml)

Fig. 7B

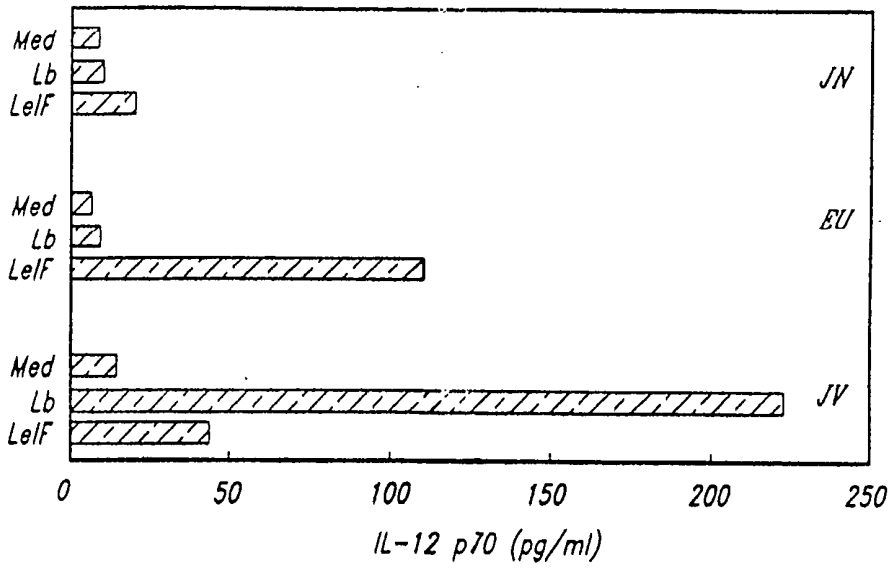

Med
Lb
LelF
JN
Med
Lb
LelF
EU
Med
Lb
LelF
JV
0
50
100
150
200
250
IL-12 p70 (pg/ml)

Fig. 7C

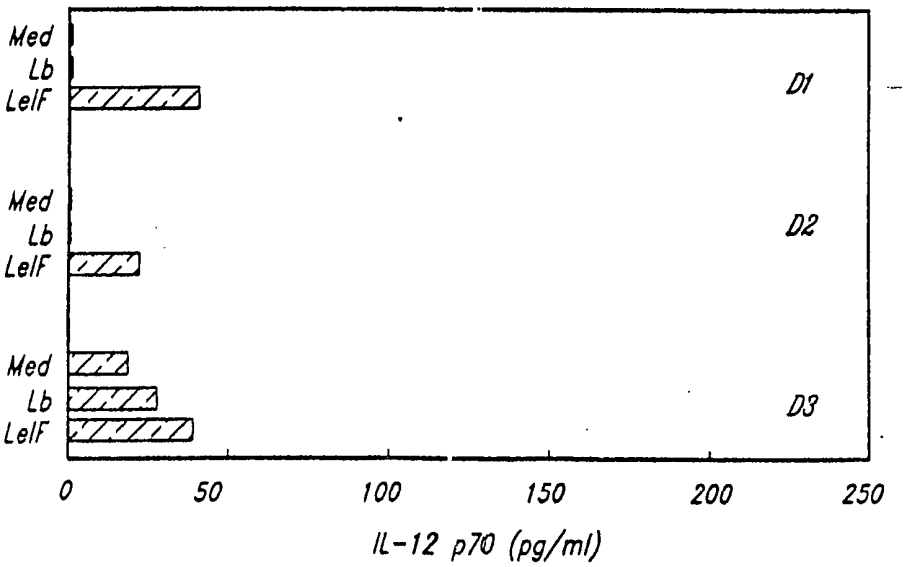

Med
Lb
LelF
D1
Med
Lb
LelF
D2
Med
Lb
LelF
D3
0
50
100
150
200
250
IL-12 p70 (pg/ml)

Fig. 7D

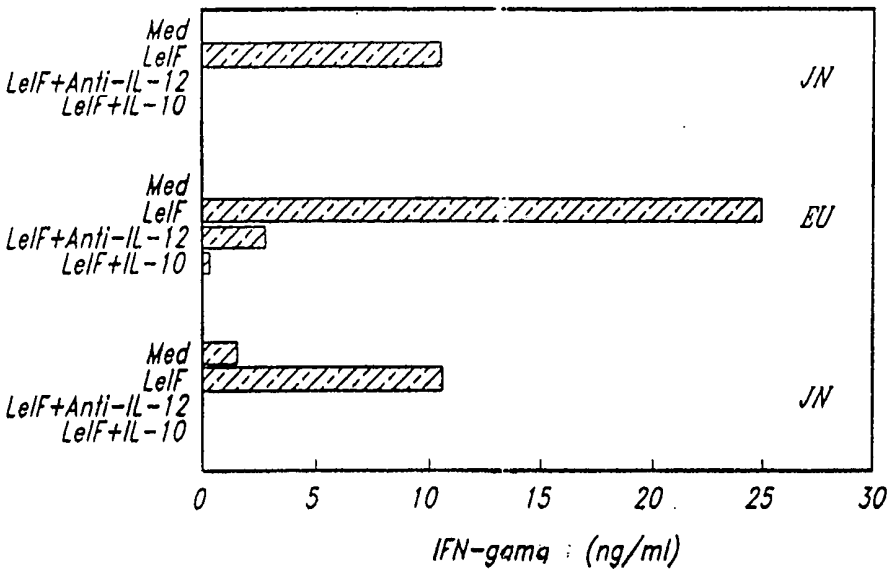

Med
LeIF
LeIF+Anti-IL-12
LeIF+IL-10
JN
Med
LeIF
LeIF+Anti-IL-12
LeIF+IL-10
EU
Med
LeIF
LeIF+Anti-IL-12
LeIF+IL-10
JN
0
5
10
15
20
25
30
IFN-gama (ng/ml)

Fig. 8A

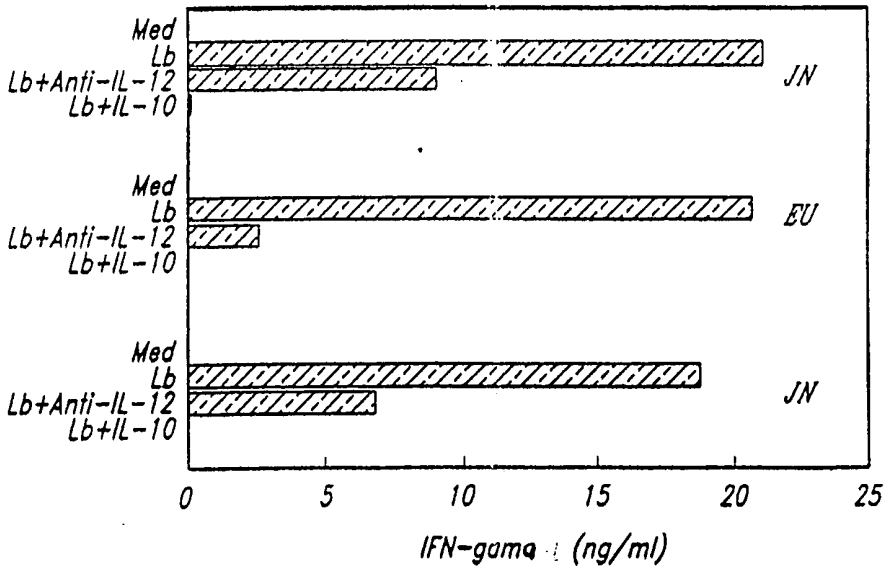
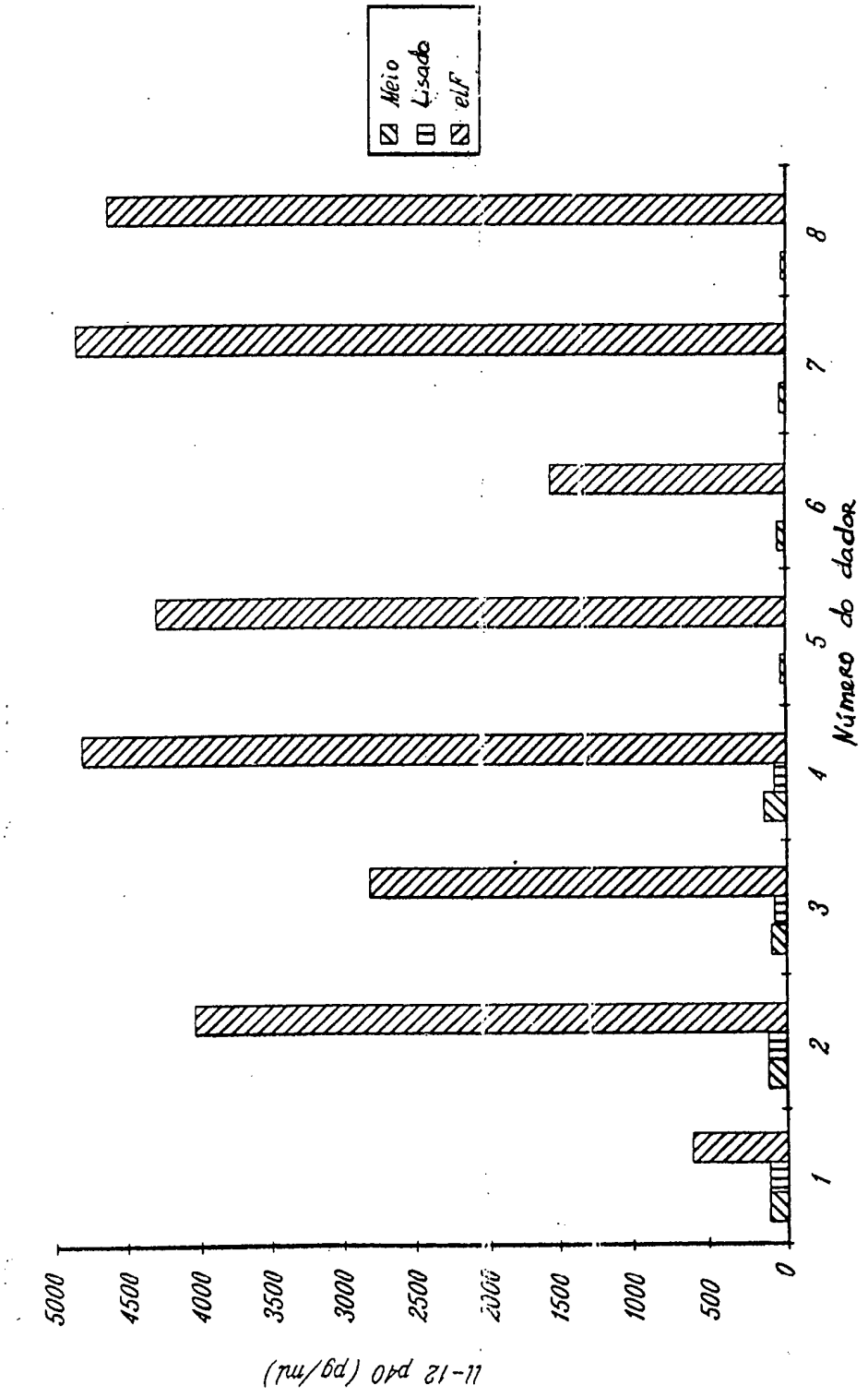

Med
Lb
Lb+Anti-IL-12
Lb+IL-10
JN
Med
Lb
Lb+Anti-IL-12
Lb+IL-10
EU
Med
Lb
Lb+Anti-IL-12
Lb+IL-10
JN
0
5
10
15
20
25
IFN-gama (ng/ml)

Fig. 8B

14 FOLHAS - FOLHA 11



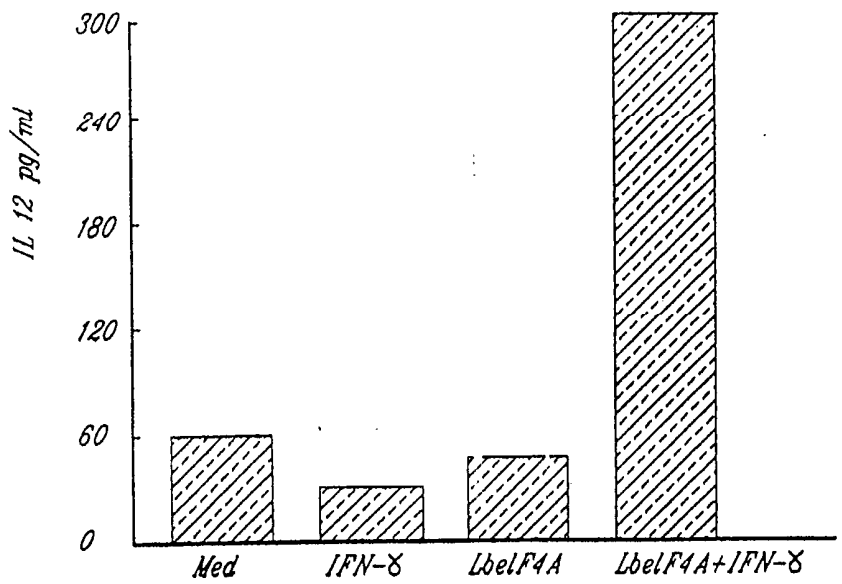

IL 12 pg/ml
300
240
180
120
60
0
Med
IFN-γ
LbelF4A
LbelF4A+IFN-γ

Fig. 9B

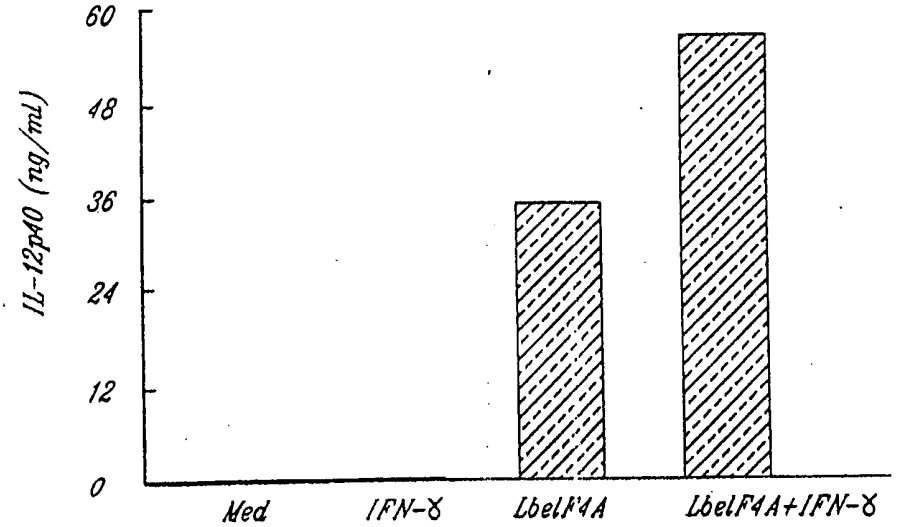

IL-12p40 (ng/ml)
60
48
36
24
12
0
Med
IFN-γ
LbelF4A
LbelF4A+IFN-γ

Fig. 10

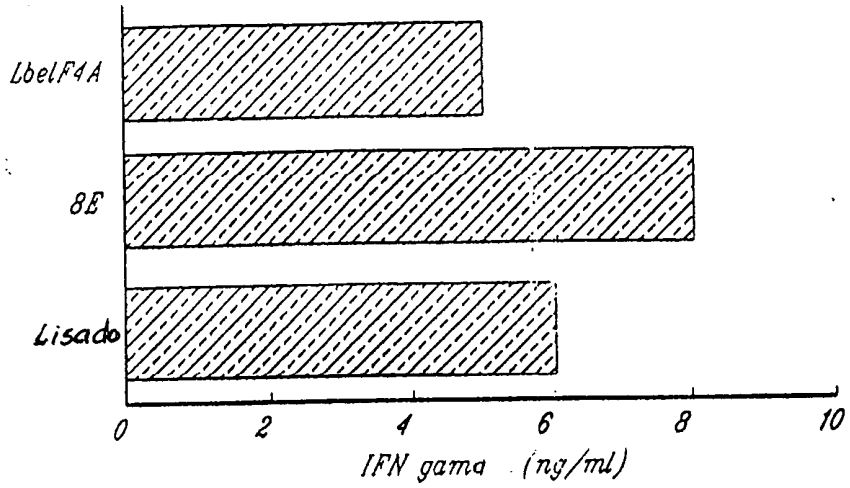


Fig. 11A

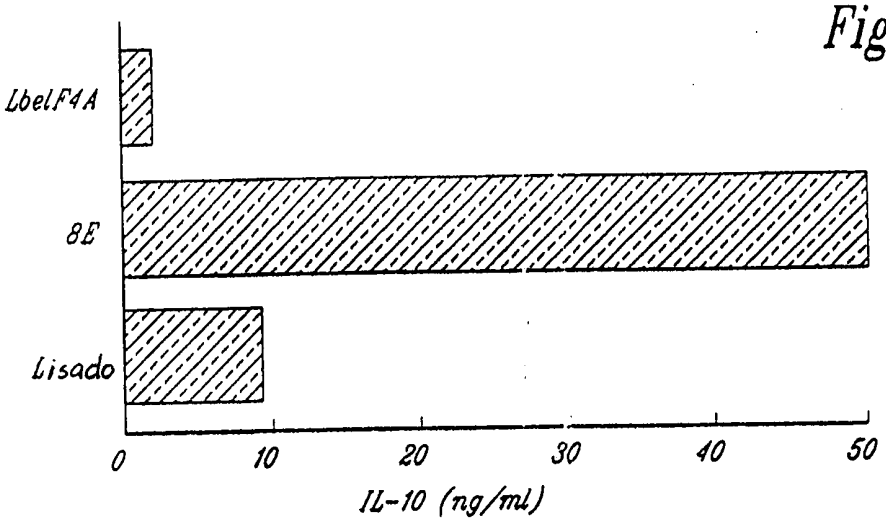


Fig. 11B

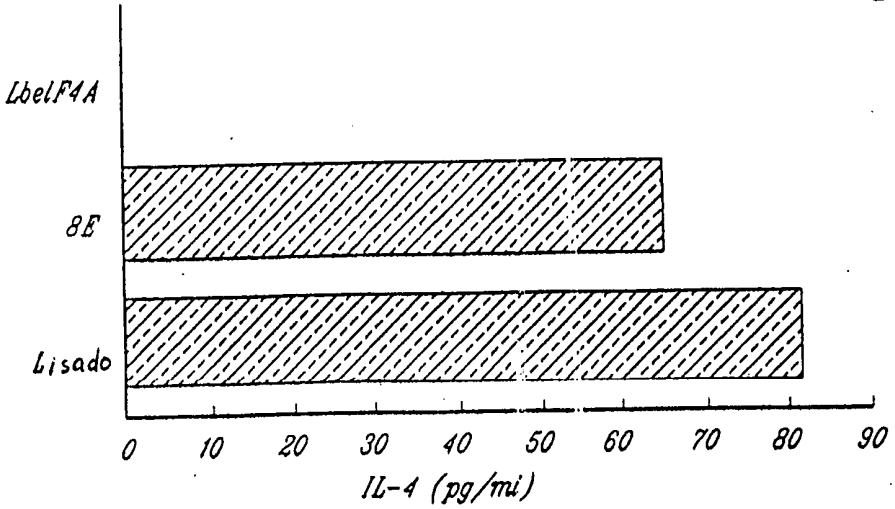


Fig. 11C

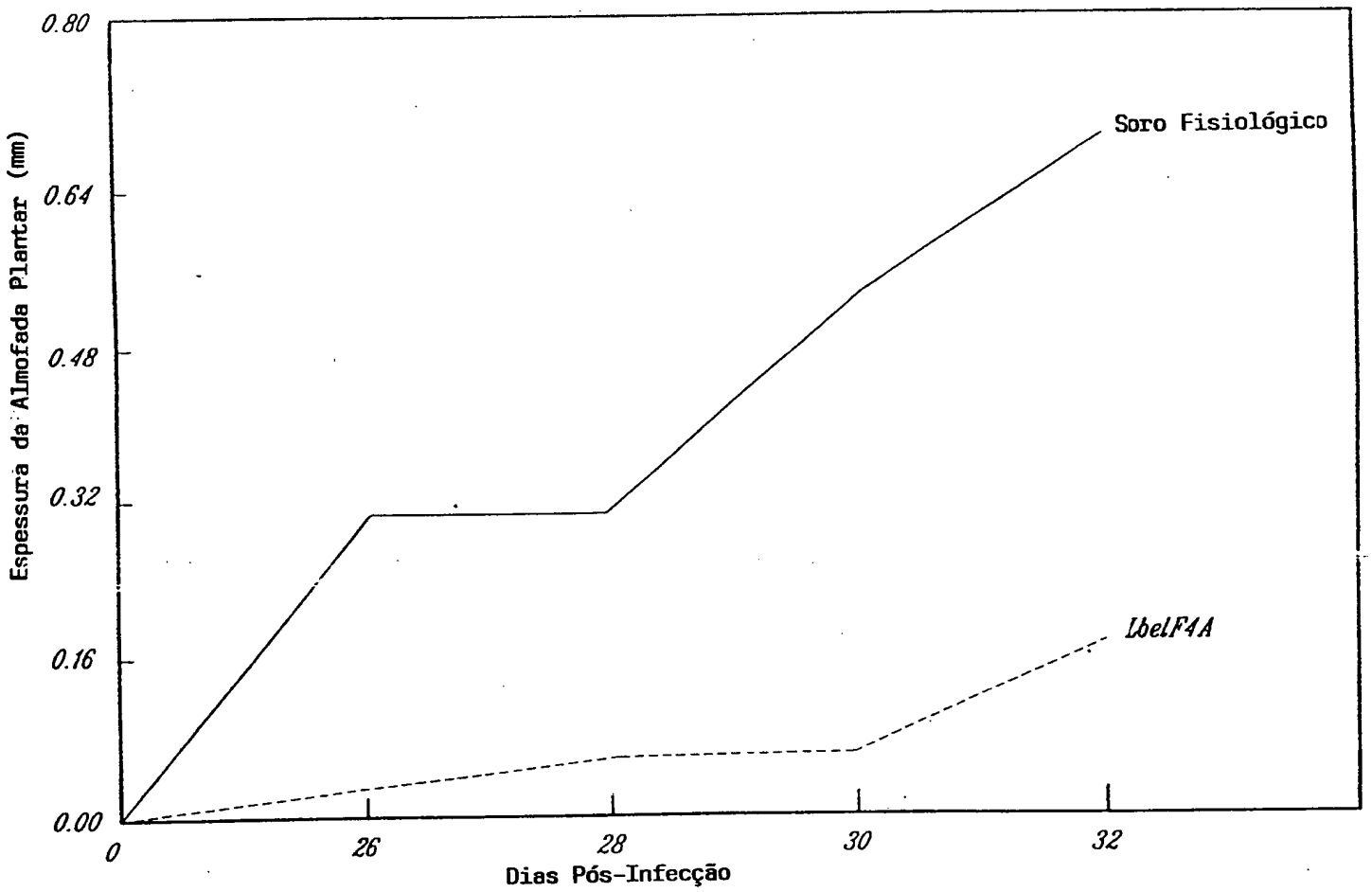

0.80
0.64
0.48
0.32
0.16
0.00
Espessura da Almofada Plantar (mm)
Soro Fisiológico
LbelF4A
0
26
28
30
32
Dias Pós-Infecção

Fig. 12