

(11) Número de Publicação: **PT 1449922 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/31 (2006.01) **A61K 39/04** (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) **G01N 33/569** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **C07K 16/12** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1998.04.01**

(30) Prioridade(s): **1997.04.02 DK 37697**
1997.04.18 US 44624 P
1997.11.10 DK 127797
1998.01.05 US 70488 P

(43) Data de publicação do pedido: **2004.08.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.08.15**
118/2007

(73) Titular(es):

STATENS SERUM INSTITUT
ARTILLERIVEJ 5 DK-2300 COPENHAGEN K DK

(72) Inventor(es):

PETER BIRK RASMUSSEN	DK
PETER ANDERSEN	DK
WALTER FLORIO	IT
THOMAS OETTINGER	DK
IDA ROSENKRANDS	DK

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **FRAGMENTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS E FRAGMENTOS POLIPEPTÍDICOS**
OBTIDOS A PARTIR DE M. TUBERCULOSIS

(57) Resumo:

RESUMO**"FRAGMENTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS E FRAGMENTOS POLIPEPTÍDICOS
OBTIDOS A PARTIR DE *M. TUBERCULOSIS*"**

A presente invenção baseia-se na identificação e caracterização de uma multiplicidade de proteínas e fragmentos de proteínas novos obtidos a partir de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO:s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 17-23, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72-86, 88, 90, 92, 94, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153 e 168-171). A presente invenção diz respeito aos polipeptídos e seus fragmentos imunologicamente activos, aos genes que os codificam e às composições imunológicas, tais como vacinas e reagentes de testes dérmicos, que contêm tais polipeptídos. Há uma outra parte da presente invenção que se baseia na descoberta surpreendente de que os produtos de fusão entre ESAT-6 e MPT59 são imunogénios melhores, em comparação com cada uma das proteínas não fundidas, respectivamente.

DESCRICAÇÃO

**"FRAGMENTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS E FRAGMENTOS POLIPEPTÍDICOS
OBTIDOS A PARTIR DE M. TUBERCULOSIS"**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a uma multiplicidade de novos fragmentos polipeptídicos imunologicamente activos, obtidos a partir do抗ígeno CFP7 de *Mycobacterium tuberculosis*, vacinas e outras composições imunológicas que contêm os fragmentos como componentes imunogénicos e métodos de produção e utilização dos polipeptídios. A presente invenção também diz respeito a novos fragmentos de ácidos nucleicos obtidos a partir do抗ígeno CFP7 de *M. tuberculosis* que são úteis na preparação dos fragmentos polipeptídicos da presente invenção ou no diagnóstico de infecção com *M. tuberculosis*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A tuberculose humana (doravante designada por "TB") provocada por *Mycobacterium tuberculosis* é um grave problema de saúde global, responsável aproximadamente por 3 milhões de mortes anualmente, de acordo com a OMS. A incidência a nível mundial de novos casos de TB tem vindo a diminuir progressivamente durante a última década, mas nos anos mais recentes esta tendência sofreu uma mudança radical devido ao aparecimento da SIDA e ao aparecimento de estirpes de *M. tuberculosis* multi-resistentes aos fármacos.

A única vacina actualmente existente para uso clínico é a BCG, uma vacina cuja eficácia continua a ser um assunto controverso. De um modo geral, a BCG induz um elevado nível de resistência adquirida em modelos de TB em animais, mas nos

diversos ensaios humanos realizados em países desenvolvidos não foi possível demonstrar uma protecção significativa. Curiosamente, a BCG não tem aprovação da FDA para utilização nos Estados Unidos.

Consequentemente, o desenvolvimento de uma vacina nova e aperfeiçoada contra a TB é um assunto urgente, ao qual foi atribuída uma prioridade muito elevada pela OMS. Têm sido feitas muitas tentativas para definir substâncias micobacterianas protectoras e, entre 1950 e 1970, foi descrito, por vários investigadores, um aumento da resistência após vacinação experimental. No entanto, ainda não se conseguiu demonstrar uma resposta imunitária protectora específica de longo prazo com a potência da BCG, obtida por administração de proteínas ou fragmentos da parede celular solúveis, apesar de actualmente estarem a ser feitos com base em polipeptídos obtidos a partir de filtrados de culturas de curto prazo, *cf.* a descrição infra.

A imunidade ao *M. tuberculosis* é caracterizada por três aspectos básicos: i) os bacilos vivos induzem, eficientemente, uma resposta imunitária protectora, ao contrário do que sucede com as preparações mortas; ii) esta resposta é mediada por linfócitos T especificamente sensibilizados e iii) aparentemente, a molécula mediadora mais importante é o interferão gama (INF- γ).

Um filtrado de cultura de curto prazo (ST-CF) é uma mistura complexa de proteínas libertadas a partir de *M. tuberculosis* durante os primeiros dias de crescimento em meio líquido (Andersen *et al.*, 1991). Foi já sugerido que os filtrados de culturas possuem抗igénios protectores reconhecidos pelo hospedeiro na primeira fase da infecção de TB (Andersen *et al.* 1991, Orme *et al.* 1993). A partir de dados recentes provenientes de vários laboratórios demonstrou-se que as vacinas de subunidades experimentais, à

base de抗原s de filtrados de culturas, podem proporcionar elevados níveis de resistência adquirida à TB (Pal e Horwitz, 1992; Roberts et al., 1995; Andersen, 1994; Lindblad et al., 1997). No entanto, os filtrados de cultura são misturas complexas de proteínas, não havendo, até ao momento presente, muitas informações disponíveis sobre as moléculas responsáveis por esta resposta imunitária protectora. Neste contexto, apenas se descreveu a participação de dois抗原s de filtrados de culturas na imunidade protectora, os抗原s ESAT-6 de baixo peso molecular (Andersen et al., 1995 e EP-A-0 706 571) e a molécula Ag85B de 31 kDa (EP-0 432 203).

Por conseguinte, existe a necessidade de identificar mais抗原s implicados na indução da imunidade protectora contra a TB, para assim se produzir eventualmente uma vacina de subunidades eficaz.

O documento WO97709428 (Corixa Corp.), de 13 de Março de 1997, e o documento WO97/09429 (Corixa Corp.), de 13 de Março de 1997, descrevem sequências de ácidos nucleicos e seus polipeptídos correspondentes, entre outros, ESAT6, obtidos a partir de *Mycobacterium tuberculosis*, e a sua utilização para a imunização e o diagnóstico de infecções com *M. tuberculosis*. Os polipeptídos da presente invenção têm uma identidade de sequência global de 29,2% em relação ao polipeptídeo ESAT6. A maior identidade, nomeadamente 71,4%, foi registada numa sobreposição de 7 aminoácidos.

OBJECTO DA INVENÇÃO

Constitui um objectivo da presente invenção proporcionar novos抗原s que são eficazes como componentes numa vacina de subunidades contra TB ou que são úteis como componentes em composições de diagnóstico para a detecção da infecção com micobactérias, em especial micobactérias

associadas a virulência. Os novos antigénios podem também ser importantes alvos para fármacos.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se, *inter alia*, na identificação e na caracterização de vários antigénios de filtrados de culturas de *M. tuberculosis* que ainda não tinham sido caracterizados. Em modelos animais de TB, as células T que intervêm indirectamente na imunidade centram-se, predominantemente, em antigénios nas regiões 6-12 e 17-30 kDa de STCF. De acordo com a presente invenção, foi identificado um antigénio na região de baixo peso molecular (CFP7).

Determinou-se o gene codificador para o antigénio, investigou-se a distribuição do antigénio em várias estirpes micobacterianas e caracterizou-se a actividade biológica do produto. O antigénio tem potencial para utilização em vacinas, bem como para fins de diagnóstico, uma vez que é segregado por micobactérias durante o seu metabolismo.

O quadro seguinte enumera o antigénio da presente invenção pelo nome presentemente utilizado, bem como pela referência a SEQ ID n°s relevantes de sequências de aminoácidos completas e sequências de ADN que codificam o antigénio:

Antigénio	Sequência do terminal N	Sequência nucleotídica SEQ ID NO:	Sequência de aminoácidos SEQ ID NO:
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
CFP7	1		2

É do conhecimento geral na especialidade que os epítopos de células T são responsáveis pelo desencadeamento da imunidade adquirida contra TB, ao passo que os epítopos de células B não têm nenhuma influência significativa sobre a

imunidade adquirida e o reconhecimento das micobactérias *in vivo*. Uma vez que estes epítopos de células T são lineares e sabendo-se que têm um comprimento mínimo de 6 resíduos de aminoácidos, a presente invenção diz especialmente respeito à identificação e à utilização de tais epítopos de células T.

Sendo assim, no seu aspecto mais lato, a presente invenção diz respeito a um fragmento polipeptídico praticamente puro que

a) comprehende uma sequência de aminoácidos, tal como ilustrado por SEQ ID NO: 2,

b) comprehende uma subsequência do fragmento polipeptídico definido em a) que tem um comprimento pelo menos de 12 resíduos de aminoácido, sendo tal subsequência imunologicamente equivalente ao polipeptídeo definido em a) no que se refere à capacidade de provocar uma resposta imunitária protectora contra infecções com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou no que se refere à capacidade de desencadear uma resposta imunitária significativa em termos de diagnóstico, indicadora de sensibilização anterior ou em curso, com抗énios obtidos a partir de micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou

c) comprehende uma sequência de aminoácidos que possui uma identidade de sequêncipelo menos a de 80% em relação ao polipeptídeo definido em a), ou à subsequência definida em b), e que também é imunologicamente equivalente ao polipeptídeo definido em a) no que se refere à capacidade para evocar uma resposta imunitária protectora contra infecções com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou no que se refere à capacidade para desencadear uma resposta imunitária significativa sob o ponto de vista de diagnóstico, indicadora de uma sensibilização anterior ou em curso com

antigénios obtidos a partir de micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*,

em que tal preparação contém no máximo 5% em peso de outro material polipeptídico ao qual o fragmento polipeptídico se encontra originalmente associado, desde que, no caso de ser constituído pela sequência de aminoácidos 1 a 96 de SEQ ID NO: 2, então o fragmento polipeptídico esteja isento livre de qualquer outro antigénio proveniente de bactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*.

Há outras partes da presente invenção que dizem respeito aos fragmentos de ADN que codificam um polipeptídeo tal como definido antes, bem como fragmentos de ADN úteis para a determinação da presença de ADN codificador de tais polipeptídos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA PRESENTE INVENÇÃO

Nas presentes memória descritiva e reivindicações, o termo "fragmento polipeptídico" designa tanto os péptidos curtos, com um comprimento pelo menos de dois resíduos de aminoácidos e no máximo de 10 resíduos de aminoácidos, como os oligopeptídos (11 a 100 resíduos de aminoácidos) e os péptidos mais longos (a interpretação habitual do termo "polipeptídeo", isto é, com um comprimento superior a 100 resíduos de aminoácidos), bem como as proteínas (a entidade funcional que comprehende pelo menos um péptido, oligopeptídeo ou polipeptídeo que pode ser quimicamente modificado por glicosilação, lipidação ou incorporação de grupos protéticos). A definição do termo "polipeptídos" também abrange as formas originais de péptidos/proteínas em micobactérias, bem como as proteínas ou os péptidos recombinantes em qualquer tipo de vectores de expressão que transformam qualquer tipo de hospedeiro e ainda os péptidos sintetizados por via química.

No presente contexto, a expressão "fragmento polipeptídico praticamente puro" designa uma preparação polipeptídica que contém um máximo de 5% em peso de outro material polipeptídico ao qual está originalmente associado (são preferíveis valores percentuais menores de outro material polipeptídico, por exemplo, no máximo 4%, no máximo 3%, no máximo 2%, no máximo 1% e no máximo ½%). É preferível que o polipeptídeo praticamente puro tenha uma pureza pelo menos a de 96%, isto é, que o polipeptídeo constitua pelo menos a 96% em peso do material polipeptídico total presente na preparação, sendo ainda preferíveis valores percentuais superiores, tais como pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,25%, pelo menos 99,5% e pelo menos 99,75%. É especialmente preferível que o fragmento polipeptídico assuma uma "forma praticamente pura", isto é, que o fragmento polipeptídico esteja praticamente isento de qualquer outro抗原 ao qual esteja originalmente associado, isto é, isento de qualquer outro抗原 proveniente de bactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*. Isto pode ser conseguido através da preparação do fragmento polipeptídico por métodos recombinantes numa célula hospedeira não micobacteriana, tal como adiante se descreverá mais minuciosamente, ou através da síntese do fragmento polipeptídico por métodos bem conhecidos de síntese peptídica em fase sólida ou líquida, por exemplo, pelo método descrito por Merrifield ou suas variações.

No caso de ser utilizado a propósito de um polipeptídeo da presente invenção com a sequência ilustrada por SEQ ID NO: 2, o termo "subsequência" designa qualquer segmento contínuo pelo menos com 12 resíduos de aminoácidos, retirado do polipeptídeo obtido a partir de *M. tuberculosis*, na SEQ ID NO: 2, e que é lhe imunologicamente equivalente em termos da capacidade para conferir maior resistência a infecções com as

bactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*. Assim, o termo também abrange um polipeptido obtido a partir de fontes diferentes, tais como outras bactérias ou mesmo a partir de células eucarióticas.

A expressão "imunologicamente equivalente", utilizada a propósito de um polipeptido, pretende indicar que o polipeptido, no caso de ser formulado numa vacina ou num agente de diagnóstico (isto é, em conjunto com um transportador ou veículo farmaceuticamente aceitável e facultativamente com um adjuvante), irá:

I) conferir, após a sua administração (quer por si só quer em conjunto com outros抗énios, enquanto constituinte imunologicamente activo), a um murganho e/ou a uma cobaia e/ou a um primata, tal como um ser humano, uma maior resistência específica adquirida contra infecções com bactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*, que é pelo menos 20% da resistência intensificada adquirida conferida por *Mycobacterium bovis* BCG e também pelo menos 20% da resistência intensificada adquirida conferida pelo polipeptido primitivo que compreende SEQ ID NO: 2 (em que o referido polipeptido primitivo tem praticamente a mesma localização relativa e o mesmo padrão num gel 2DE, preparado tal como o gel 2DE apresentado na fig. 6, cf. exemplos), em que a resistência intensificada adquirida é avaliada pela redução observada nas contagens de micobactérias em homogeneizados de baço, pulmão ou outros órgãos isolados a partir de murganhos ou cobaias que foram infectadas com uma estirpe virulenta de *M. tuberculosis* ou então, num primata, tal como um ser humano, é avaliada por determinação da protecção contra o desenvolvimento de tuberculose clínica num grupo vacinado em função da observada num grupo de contraprova que recebe um placebo ou BCG (de preferência, a resistência intensificada é superior e corresponde pelo menos

a 50% da resposta imunitária protectora provocada por *M. bovis*, tal como pelo menos 60%, ou, mais preferencialmente, pelo menos a 80% da resposta imunitária protectora provocada por *M. bovis BCG*, tal como pelo menos 90%; em alguns casos, prevê-se que a resistência intensificada venha a ultrapassar a que é conferida por *M. bovis BCG* e por tal motivo é preferível que a resistência seja pelo menos 100%, tal como pelo menos de 110%, da referida resistência intensificada) e/ou

II) provocar uma resposta imunitária significativa em termos de diagnóstico, num mamífero, que seja indicadora de sensibilização anterior ou em curso com antigénios obtidos a partir de micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*; tal resposta imunitária significativa em termos de diagnóstico pode assumir a forma de uma reacção de hipersensibilidade de tipo retardado, que pode ser determinada, v.g., através de um teste dérmico, ou assumir a forma de libertação de IFN- γ , determinada, v.g., por um ensaio de IFN- γ , conforme adiante se descreverá minuciosamente. Uma resposta significativa em termos de diagnóstico, num enquadramento de teste dérmico, será uma reacção que dê origem a uma reacção dérmica pelo menos com 5 mm de diâmetro e que é pelo menos 65% (de preferência, pelo menos 75%, tal como pelo menos 85%) da reacção dérmica (avaliado pelo diâmetro da reacção dérmica) provocada pelo polipeptídeo primitivo que compreende SEQ ID NO: 2.

Assim, é possível avaliar a capacidade do fragmento polipeptídico para conferir uma maior imunidade, recorrendo para tal à medição num animal experimental, v.g., um murganho ou uma cobaia, da redução nas contagens micobacterianas em homogeneizados de baço, pulmão ou outros órgãos isolados a partir do animal experimental que foi infectado com uma estirpe virulenta de micobactérias pertencentes ao complexo

de *tuberculosis* depois de ter sido imunizado previamente com o polipeptídeo, comparativamente com as contagens micobacterianas num grupo de contraprova de animais experimentais infectados com a mesma estirpe virulenta, mas que não foram previamente imunizados contra a tuberculose. A comparação com as contagens micobacterianas pode também ser efectuada com contagens micobacterianas obtidas a parir de um grupo de animais experimentais que foram infectados com a mesma estirpe virulenta, depois de terem sido imunizados com *Mycobacterium bovis* BCG.

As contagens de micobactérias em homogeneizados de animais experimentais imunizados com um fragmento polipeptídico de acordo com a presente invenção têm de ser 5 vezes superiores, no máximo, às contagens dos murganhos ou nas cobaias que foram imunizados com a *Mycobacterium bovis* BCG, tal como 3 vezes superior, no máximo, a tais contagens e de preferência 2 vezes superior, no máximo, a tais contagens.

Uma avaliação mais relevante da capacidade do fragmento polipeptídico da presente invenção para conferir maior resistência consiste em comparar a incidência de tuberculose clínica em dois grupos de indivíduos (v.g., seres humanos ou outros primatas), em que a um dos grupos se administra uma vacina de acordo com a invenção que contém um antigénio da presente invenção e ao outro grupo se administra um placebo e outra vacina anti-tuberculose conhecida (v.g., BCG). Em tal contexto, o antigénio da presente invenção deveria proporcionar uma imunidade protectora significativamente superior à obtida por administração do placebo (conforme determinado por métodos estatísticos conhecidos pelos especialistas na matéria).

O "complexo de *tuberculosis*" tem o seu significado convencional, isto é, o complexo de micobactérias que provocam TB, as quais são *Mycobacterium tuberculosis*,

Mycobacterium bovis, *Mycobacterium bovis BCG* e *Mycobacterium africanum*.

No presente contexto, a expressão "micobactérias metabolizadoras" designa micobactérias vivas que se multiplicam logaritmicamente e libertam polipeptídos para o meio de cultura em que estão a ser cultivadas.

A expressão "identidade de sequência" designa uma medida quantitativa do grau de homologia entre duas sequências de aminoácidos ou entre duas sequências nucleotídicas de igual comprimento: a identidade de sequência pode ser calculada por

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})}{N_{ref}} \cdot 100$$

, em que

N_{dif} é o número total de resíduos não idênticos existentes nas duas sequências alinhadas e N_{ref} é o número de resíduos existente numa das sequências. Assim, a sequência de ADN AGTCAGTC terá uma identidade de sequência de 75% em relação à sequência AATCAATC ($N_{dif}=2$ e $N_{ref}=8$).

A identidade de sequência é aqui utilizada para ilustrar o grau de identidade entre a sequência de aminoácidos de um dado polipeptído e a sequência de aminoácidos ilustrada por SEQ ID NO: 2. A sequência de aminoácidos que se pretende comparar com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2 pode ser deduzida a partir da sequência de ADN, v.g., obtida por meio de hibridação, tal como adiante definido, ou pode ser obtida por métodos convencionais de sequenciação de aminoácidos. De preferência, a identidade da sequência é determinada sobre a sequência de aminoácidos de um polipeptído maduro, isto é, sem tomar em consideração nenhuma sequência líder.

Conforme será evidente a partir da descrição anterior, os polipeptídos que não são idênticos ao polipeptído de SEQ ID NO: 2 também são abrangidos pela presente invenção. A presente invenção permite pequenas variações que não têm um

efeito prejudicial sobre a imunogenicidade em comparação com as sequências originais e que podem dar origem a novas propriedades de ligação ou funções biológicas e imunogenicidades interessantes e úteis, etc..

Assim, cada fragmento polipeptídico pode ser caracterizado por sequências específicas de aminoácidos e ácidos nucleicos. Faz-se observar que tais sequências compreendem os análogos e as variantes produzidos por métodos recombinantes, em que tais sequências polipeptídicas e de ácidos nucleicos tenham sido modificadas por substituição, inserção, adição e/ou eliminação de um ou mais nucleótidos nas referidas sequências de ácidos nucleicos para assim provocar a substituição, inserção, adição ou eliminação de um ou vários resíduos de aminoácidos no polipeptídeo recombinante. Doravante, sempre que se utilizar o termo ADN, considerar-se-á que, nos casos em que o ADN pode ser substituído por ARN, o termo ADN abrange variantes de ARN que serão evidentes para os especialistas na matéria. Para fins de hibridação, é possível utilizar PNA em vez de ADN, uma vez que se demonstrou que o PNA possui um perfil de hibridação muito dinâmico (o PNA foi já descrito por Nielsen P.E. et al., 1991, 'Science' 254: 1497-1500).

Frequentemente, tanto para fins de imunodiagnóstico como para a preparação de vacinas, é possível e prático preparar抗igénios a partir de segmentos de uma proteína ou polipeptídeo imunogénico conhecido. É possível utilizar determinadas regiões epitópicas para produzir respostas semelhantes às produzidas por todo o polipeptídeo抗igénico. As potenciais regiões抗igénicas ou imunogénicas podem ser identificadas por qualquer uma de várias metodologias, v.g., as análises de antigenicidade de Jameson-Wolf ou Kyte-Doolittle ou as análises de hidrofobicidade de Hopp e Woods (1981) (veja-se, v.g., Jameson e Wolf, 1988; Kyte e

Doolittle, 1982 ou a patente de invenção norte-americana nº 4 554 101). A análise da hidrofobicidade atribui valores médios de hidrofolicidade a cada resíduo de aminoácido e a partir de tais valores é possível calcular os valores médios de hidrofilicidades e determinar as regiões de maior hidrofilicidade. Utilizando um ou vários de tais métodos, é possível obter regiões de antigenicidade previsível a partir da sequência de aminoácidos atribuída aos polipeptídos da presente invenção.

Em alternativa, para se identificar epítópos de células T relevantes que são reconhecidos durante uma resposta imunitária, é também possível utilizar um método de "força bruta": uma vez que os epítópos de células T são lineares, os mutantes resultantes de eliminações do polipeptído com SEQ ID NO: 2 irão, no caso de serem construídos sistematicamente, revelar quais são as regiões dos polipeptídos essenciais para o reconhecimento imunitário, v.g., submetendo tais mutantes por eliminação ao ensaio de IFN- γ aqui descrito. Há um outro método no qual se utiliza oligómeros sobrepostos (de preferência, sintéticos e com um comprimento, v.g., de 20 resíduos de aminoácidos) obtidos a partir do polipeptído com SEQ ID NO: 2. Alguns irão proporcionar uma resposta positiva no ensaio de IFN- γ e outros não.

De acordo com uma variante preferida da presente invenção, o fragmento polipeptídico da presente invenção compreende um epítopo para uma célula T auxiliadora.

Embora tenha sido demonstrado que o comprimento mínimo de um epítopo de células T é pelo menos de 6 aminoácidos, é normal que tais epítopos sejam constituídos por segmentos mais longos de aminoácidos. Assim, é preferível que o fragmento polipeptídico da presente invenção tenha um comprimento de resíduo de aminoácidos.

De acordo com outra variante preferida, o fragmento polipeptídico da presente invenção está isento de qualquer sequência de sinal; este facto é especialmente interessante quando o fragmento polipeptídico é produzido por via sintética, mas mesmo no caso de os fragmentos polipeptídicos serem produzidos por via recombinante será normalmente aceitável que não sejam exportados pela célula hospedeira para o periplasma ou espaço extracelular; os fragmentos polipeptídicos podem ser recuperados por métodos tradicionais (cf., a descrição *infra*) a partir do citoplasma após a ruptura das células hospedeiras e, no caso de ser necessário reconstituir os fragmentos polipeptídicos, então é possível recorrer a esquemas de reconstituição gerais, cf., v.g., a descrição do documento WO 94/18227, no qual se descreve um tal método de reconstituição geral aplicável.

Uma análise adequada da potencial utilidade de um determinado fragmento polipeptídico, obtido a partir de SEQ ID NO: 2, consiste em determinar a capacidade do fragmento polipeptídico para afectar a libertação de IFN- γ a partir de linfócitos T com memória amplificada. De acordo com a invenção, os fragmentos polipeptídicos que têm tal aptidão constituem variantes especialmente interessantes da presente invenção. Faz-se observar que os fragmentos polipeptídicos que estimulam a resposta imunitária dos linfócitos T pouco depois do início da infecção são muito importantes para combater as micobactérias que provocam a infecção antes que estas se consigam multiplicar até atingirem um número de bactérias que poderia dar origem a uma infecção fulminante.

Assim, constitui uma variante importante da presente invenção um fragmento polipeptídico, definido antes, o qual

1) induz uma libertação de IFN- γ a partir de linfócitos T com memória amplificada, recolhidos de um murganho ao fim de 2 semanas após a infecção primária ou ao fim de 4 dias

após uma nova infecção com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*, em que a indução tem lugar por adição do polipeptido a uma suspensão com cerca de 200 000 linfócitos esplénicos por cada mL, da qual resulta uma concentração de 1 a 4 µg de polipeptido por cada mL de suspensão, sendo possível avaliar a libertação de IFN-γ através da determinação do IFN-γ presente no sobrenadante colhido ao fim de 2 dias após a adição do polipeptido à suspensão, e/ou

2) induz uma libertação de IFN-γ que é pelo menos 300 pg/mL superior ao nível de referência de cerca de 1 000 000 CMSP (células mononucleares de sangue periférico) humanas por cada mL isolado a partir de pacientes com TB na primeira fase da infecção ou a partir de dadores saudáveis vacinados com BCG ou a partir de indivíduos saudáveis que contactaram com pacientes com TB, realizando-se a indução por adição do polipeptido a uma suspensão com cerca de 1 000 000 de células de CMSP por mL, da qual resulta uma concentração de 1 a 4 µg de polipeptido por mL de suspensão, sendo possível avaliar a libertação de IFN-γ através da determinação do IFN-γ presente no sobrenadante colhido ao fim de 2 dias após a adição do polipeptido à suspensão, e/ou

3) induz uma libertação de IFN-γ a partir de CMSP de bovino, provenientes de animais previamente sensibilizados com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*, em que tal libertação é pelo menos duas vezes superior à libertação observada de CMSP de bovino provenientes de animais que não foram previamente sensibilizados com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*.

A libertação de IFN-γ a partir de CMSP de bovino pode, v.g., ser medida pelo índice de densidade óptica (DO) em relação aos valores de referência, utilizando um ensaio convencional de ELISA com citoquina, e deveria ser pelo menos

de 2, mas são preferidos números superiores, tais como pelo menos 3, 5, 8 e 10.

De preferência, os fragmentos polipeptídicos da presente invenção compreendem uma sequência de aminoácidos com um comprimento pelo menos de 12 resíduos de aminoácidos, a qual tem identidade de sequência superior, pelo menos de 80%, em relação a SEQ ID NO: 2. A identidade de sequência mínima preferencial, em percentagem, é pelo menos de 85%, pelo menos de 90%, pelo menos de 91%, pelo menos de 92%, pelo menos de 93%, pelo menos de 94%, pelo menos de 95%, pelo menos de 96%, pelo menos de 97%, pelo menos de 98%, pelo menos de 99% e pelo menos de 99,5%.

Tal como se descreveu antes, normalmente será interessante omitir a sequência líder dos fragmentos polipeptídicos da presente invenção. No entanto, com a produção de polipeptídos de fusão, é possível obter fragmentos polipeptídicos da presente invenção com características superiores. Como exemplos de possibilidades interessantes refere-se os parceiros de fusão que facilitam a exportação do polipeptído quando este é produzido de forma recombinante, parceiros de fusão que facilitam a purificação do polipeptído e parceiros de fusão que intensificam a imunogenicidade do fragmento polipeptídico da presente invenção. Por conseguinte, a presente invenção também diz respeito a um polipeptído de fusão que compreende pelo menos um fragmento polipeptídico definido antes e pelo menos um parceiro de fusão. Com o intuito de intensificar a imunogenicidade, o parceiro de fusão pode ser seleccionado, v.g., entre o conjunto constituído por outro fragmento polipeptídico, tal como anteriormente definido (para assim permitir a expressão múltipla de epítópos relevantes) e outro polipeptído obtido a partir de uma bactéria pertencente ao complexo de *tuberculosis*, tal como ESAT-6, MPB64, MPT64 e

MPB59m ou pelo menos um epítopo de célula T de qualquer um de tais抗原s. Como exemplos de outros polipeptídos intensificadores da imunogenicidade que poderiam actuar como parceiros de fusão refere-se os epitópos de células T (v.g., obtidos a partir dos polipeptídos ESAT-6, MPB64, MPT64 ou MPB59) ou outros epitópos imunogénicos que intensificam a imunogenicidade do produto genético alvo, v.g., linfoquinas, tal como INF- γ , IL-2 e IL-12. Com o objectivo de facilitar a expressão e/ou a purificação, o parceiro de fusão pode ser, v.g., uma proteína da fímbria bacteriana, v.g., os componentes pilina e papA do pilus; proteína A; o péptido ZZ (os produtos de fusão ZZ são comercializados por Pharmacia na Suécia); a proteína de ligação da maltose; a glutationa-S-transferase; a β -galactosidase ou a poli-histidina.

Como outros parceiros de fusão interessantes refere-se os polipeptídos que são lipidados e consequentemente fazem com que o polipeptído imunogénico seja apresentado de forma adequada ao sistema imunitário. Este efeito é conhecido, v.g., nas vacinas à base do polipeptído OspA de *Borrelia burgdorferi*, em que o elemento de fixação da membrana lipidada no polipeptído confere um efeito autoadjuvante ao polipeptído (que é originalmente lipido) no acso de ser isolado a partir de células que o produzem. Pelo contrário, o polipeptído OspA é relativamente silencioso, sob o ponto de vista imunológico, no caso de ser preparado sem o elemento de fixação para lipidação.

Há uma outra parte da presente invenção que diz respeito a um fragmento de ácido nucleico isolada, o qual comprehende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um polipeptído ou polipeptído de fusão, tal como definido antes, ou comprehende uma sequência de ácidos nucleicos que lhe é complementar.

É preferível que o fragmento de ácido nucleico seja um fragmento de ADN.

É possível preparar facilmente um fragmento deste tipo, por exemplo, por síntese directa do fragmento por meios químicos, por aplicação da tecnologia de reprodução de ácidos nucleicos, tal como a tecnologia PCR descrita na patente de invenção norte-americana nº 4 603 102, ou por introdução de sequências seleccionadas em vectores recombinantes para produção recombinante.

É do conhecimento geral que o mesmo aminoácido pode ser codificado por vários codões, estando a utilização do codão relacionada, entre outros aspectos, com a preferência dos organismos em questão que expressam a sequência nucleotídica. Assim, é possível substituir pelo menos um nucleótido ou codão de um fragmento de ácidos nucleicos da presente invenção por um outro que, ao ser expresso, dê origem a um polipeptídeo praticamente idêntico ao polipeptídeo codificado pelo fragmento de ácidos nucleicos em questão. Assim, a presente invenção permite variações na sequência, tais como substituição, inserção (incluindo intrões), adição, eliminação e rearranjo de um ou mais nucleótidos, variações essas que não têm obrigatoriamente nenhum efeito substancial sobre o polipeptídeo codificado pelo fragmento de ácidos nucleicos ou uma sua subsequência. O termo "substituição" pretende designar a substituição de um ou vários nucleótidos da sequência nucleotídica completa por um ou vários nucleótidos diferentes; o termo "adição" pretende designar a adição de um ou vários nucleótidos em qualquer um dos terminais da sequência nucleotídica completa; o termo "inserção" pretende designar a introdução de um ou vários nucleótidos na sequência nucleotídica completa; o termo "eliminação" pretende designar a eliminação de um ou vários nucleótidos da sequência nucleotídica completa, tanto em

qualquer uma das extremidades da sequência ou em qualquer ponto adequado ao longo da mesma, e o termo "rearranjo" pretende indicar que dois ou vários resíduos de nucleótidos foram trocados entre si.

A sequência nucleotídica que se pretende modificar pode ser uma sequência de ADNC ou de origem genómica, conforme descrito antes, mas pode também ser de origem sintética. Além disso, a sequência pode ser uma sequência mista de ADNC e genómico, uma sequência mista de ADNC e sintético ou genómico e de origem sintética, tal como descrito antes. A sequência pode ter sido modificada, v.g., por mutagénese dirigida ao local para assim se obter o fragmento de ácido nucleico desejado que codifica o polipeptido desejado. Faz-se observar que a descrição subsequente, centrada nas modificações do ácido nucleico que codifica o polipeptido, também engloba essas possibilidades, bem como a possibilidade de construir o ácido nucleico por meio de ligação de dois ou mais fragmentos de ADN para se obter o fragmento de ácido nucleico desejado e combinações dos princípios anteriormente mencionados.

A sequência nucleotídica pode ser modificada, utilizando qualquer técnica adequada que tenha como resultado a produção de um fragmento de ácido nucleico codificador de um polipeptido da presente invenção.

A modificação da sequência nucleotídica codificadora da sequência de aminoácidos do polipeptido da presente invenção deve ser tal que não prejudique a função imunológica do polipeptido resultante.

Um dos métodos preferidos para a preparação de variantes dos抗原s aqui descritos é a mutagénese dirigida ao local. Tal técnica é útil para a preparação de péptidos individuais, ou proteínas ou péptidos equivalentes biologicamente funcionais, obtidos a partir das sequências de抗原s, por mutagénese específica do ácido nucleico

subjacente. A técnica proporciona ainda a pronta capacidade para se preparar e testar variantes da sequência, por exemplo, incorporando uma ou mais das considerações anteriores, através da introdução de uma ou várias alterações da sequência nucleotídica no ácido nucleico. A mutagénese específica do local permite produzir mutantes através da utilização de sequências oligonucleotídicas específicas que codificam a sequência nucleotídica da mutação desejada, bem como um número suficiente de nucleótidos adjacentes, para proporcionar uma sequência iniciadora com um tamanho e uma complexidade da sequência suficientes para formar uma hélice dupla estável dos dois lados da junção de eliminação atravessada. Tipicamente, é preferível um iniciador com cerca de 17 a 25 nucleótidos de comprimento e com cerca de 5 a 10 resíduos dos dois lados na junção da sequência que se pretende alterar.

De um modo geral, a técnica de mutagénese específica do local é bem conhecida na especialidade, conforme exemplificado pelas publicações (Adelman *et al.*, 1983). Faz-se observar que, em tal a técnica, se utiliza tipicamente um vector bacteriófago que existe nas variantes de cadeia simples e de cadeia dupla. Como vectores típicos, úteis para a mutagénese dirigida ao local, refere-se vectores tais como o bacteriófago M13 (Messing *et al.*, 1981). Tais bacteriófagos encontram-se comercialmente disponíveis e a sua utilização é geralmente bem conhecida pelos especialistas na matéria.

De um modo geral, realiza-se a mutagénese dirigida ao local, de acordo com a invenção, obtendo, em primeiro lugar, um vector de cadeia simples que comprehende, na sua sequência, uma sequência de ácido nucleicos que codifica os polipeptídios da presente invenção. Um iniciador oligonucleotídico que possui a sequência mutante desejada é preparado, geralmente, por via sintética, por exemplo, de acordo com o método de

Crea et al. (1978). Tal iniciador é então recombinado com o vector de cadeia simples e submetido à acção das enzimas de polimerização de ADN, tais como o fragmento de Klenow de polimerase I de *E. coli*, para se completar a síntese da cadeia que possui a mutação. Assim, forma-se um heteroduplex, no qual uma das cadeias codifica a sequência original sem mutação e a outra cadeia possui a mutação desejada. Este vector heteroduplex é então utilizado para transformar células apropriadas, tais como células de *E. coli*, sendo seleccionados clones que compreendem vectores recombinantes que possuem o arranjo de sequência mutante.

A preparação das variantes de sequências dos fragmentos de ácidos nucleicos seleccionados da invenção, utilizando mutagénese dirigida ao local, é apresentada como um meio para se produzir espécies potencialmente úteis dos genes, não possuindo nenhum intuito limitativo, na medida em que há outras hipóteses para se obter as variantes de sequências dos fragmentos de ácidos nucleicos da presente invenção. Por exemplo, é possível submeter os vectores recombinantes que codificam os genes desejados a tratamento com agentes mutagénicos para se obter variantes de sequências (veja-se, v.g., o método descrito por Eichenlaub, 1979) para a mutagénese do ADN plasmídico, utilizando hidroxilamina.

A presente invenção também diz respeito a um vector de expressão replicável que comprehende um fragmento de ácido nucleico definido antes, em especial um vector que inclui um fragmento de ácido nucleico que codifica um fragmento polipeptídico da presente invenção.

O vector pode ser qualquer vector que possa ser convenientemente submetido a procedimentos de ADN recombinante, em que a escolha do vector irá depender, frequentemente, da célula hospedeira na qual se pretende introduzi-lo. Assim, o vector pode ser um vector de

replicação autónoma, isto é, um vector que existe enquanto entidade extracromossómica, cuja replicação é independente da replicação cromossómica; como exemplos de um vector deste tipo refere-se um plasmídeo, um bacteriófago, um cosmídeo, um minicromossoma ou um vírus. Em alternativa, o vector pode ser tal que, ao ser introduzido numa célula hospedeira, é integrado no genoma da célula hospedeira e é replicado em conjunto com o(s) cromossoma(s) em que foi integrado.

Os vectores de expressão podem ser construídos de tal forma que incluem qualquer um dos segmentos de ADN aqui descritos. Tal ADN pode codificar uma proteína antigénica específica para as estirpes virulentas de micobactérias ou mesmo sondas de hibridação para a detecção de ácidos nucleicos de micobactérias em amostras. Podem ser utilizados segmentos de ADN mais longos ou mais curtos, dependendo isso da proteína antigénica desejada. Poderiam ser incluídas regiões epitópicas das proteínas expressas ou codificadas pelo ADN apresentado, tal segmentos relativamente curtos de ADN. É possível uma grande variedade de vectores de expressão, por exemplo, segmentos de ADN codificadores de produtos génicos repórter, úteis para a identificação de produtos de genes heterólogos e/ou genes de resistência, tais como genes de resistência aos antibióticos, que podem ser úteis para identificar células transformadas.

O vector da presente invenção pode ser utilizado para transformar células de forma a permitir a propagação dos fragmentos de ácido nucleico da presente invenção ou de forma a permitir a expressão dos fragmentos polipeptídicos da presente invenção. Sendo assim, a presente invenção também diz respeito a uma célula transformada que incorpore pelo menos um dos vectores de acordo com a presente invenção, sendo esta célula uma célula que não originalmente não incorpora o vector e/ou o fragmento de ácido nucleico da

presente invenção aí contido. Uma célula transformada deste tipo (que também é parte integrante da presente invenção) pode ser qualquer célula hospedeira bacteriana adequada ou qualquer outro tipo de célula, tal como um organismo eucariótico unicelular, um fungo ou uma levedura ou uma célula proveniente de um organismo multicelular, v.g., um animal ou uma planta. Utiliza-se uma célula de mamífero especialmente nos casos em que a glicosilação seja desejável, embora a glicosilação de proteínas seja um acontecimento raro em procariotas. No entanto, é normalmente preferida uma célula procariótica, tal como uma bactéria pertencente aos géneros *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Escherichia*. É preferível que a célula transformada seja uma célula de *E. coli*, *B. subtilis* ou *M. bovis* BCG e é ainda mais preferível que a célula transformada expresse um polipeptídeo de acordo com a presente invenção. Esta última abre a possibilidade de se produzir o polipeptídeo da presente invenção recuperando-o simplesmente a partir da cultura que contém a célula transformada. De acordo com a variante mais preferida desta parte da presente invenção, a célula transformada é da *Mycobacterium bovis* BCG: Danish 1331, que é a estirpe de Copenhagen de *Mycobacterium bovis* da instituição 'Copenhagen BCG Laboratory', Statens Serum Institut, Dinamarca.

Os fragmentos de ácido nucleico da presente invenção permitem a produção recombinante dos fragmentos polipeptídicos da presente invenção. No entanto, os fragmentos polipeptídicos também podem ser obtidos por isolamento a partir da fonte natural, bem como por síntese de péptidos.

Em consequência, a presente invenção também diz respeito a um método para a preparação de um fragmento polipeptídico da presente invenção, consistindo tal método em inserir um

fragmento de ácido nucleico, tal como definido antes, num vector que é capaz de se replicar numa células hospedeira, introduzir o vector recombinante resultante na célula hospedeira (as células transformadas podem ser seleccionadas por meio de várias técnicas, incluindo a pesquisa por hibridação diferencial, identificação de produtos fundidos de genes repórteres, marcadores de resistência, anticorpos anti-antigénios e semelhantes), criar a célula hospedeira num meio de cultura, sob condições suficientes para efectuar a expressão do polipeptido (evidentemente, a célula pode ser cultivada em condições adequadas às circunstâncias e no caso de se desejar ADN, então serão utilizadas condições de replicação) e recuperar o polipeptido a partir da célula hospedeira ou do meio de cultura ou

isolar o polipeptido a partir de um filtrado de cultura de curto prazo, conforme definido na reivindicação 1, ou

isolar o polipeptido a partir de micobactérias integrais do complexo de *tuberculosis* ou seus lisados ou suas fracções, v.g., fracções que contêm parede celular, ou

sintetizar o polipeptido por síntese peptídica em fase sólida ou líquida.

O meio utilizado para o crescimento das células transformadas pode ser qualquer meio convencional adequado para tal fim. Um vector adequado pode ser qualquer um dos vectores descritos antes e uma célula hospedeira apropriada pode ser uma célula de qualquer um dos tipos enumerados antes. Os métodos utilizados para construir o vector e efectuar a sua introdução na célula hospedeira podem ser quaisquer métodos conhecidos para tais fins no campo do ADN recombinante. Seguidamente, apresentar-se-á uma descrição mais pormenorizada das possibilidades existentes.

De um modo geral, como é evidente, é preferível utilizar procariotas para a clonagem inicial das sequências de ácidos

nucleicos da presente invenção e para a construção dos vectores úteis na presente invenção. Por exemplo, para além das estirpes particulares adiante referidas na descrição mais específica, é possível referir, a título de exemplo, as estirpes tais como a estirpe K12 de *E. coli* (ATCC nº 31446), estirpe B de *E. coli* e X 1776 de *E. coli* (ATCC nº 31537). Evidentemente, tais exemplos são meramente ilustrativos e não limitativos.

Os procariotas também são preferidos para fins de expressão. É possível utilizar as estirpes referidas antes, bem como W3110 de *E. coli* (F, lambda, prototrófica, ATCC nº 273325), bacilos, tal como *Bacillus subtilis*, ou outras enterobactérias, tais como *Salmonella typhimurium* ou *Serratia marcesans* e várias espécies de *Pseudomonas*. São especialmente interessantes as micobactérias de crescimento rápido, v.g., *M. smegmatis*, uma vez que estas bactérias são muito semelhantes às micobactérias do complexo de *tuberculosis* e consequentemente podem conseguir reduzir a necessidade de modificações pós-tradução do produto da expressão.

De um modo geral, para tais hospedeiros são utilizados os vectores plasmídicos que contêm replicões e sequências de regulação, provenientes de espécies compatíveis com a célula hospedeira. O vector transporta normalmente um local de replicação, bem como sequências marcadoras que são capazes de proporcionar uma selecção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, a *E. coli* é tipicamente transformada utilizando pBR32, que é um plasmídeo obtido obtido a partir de uma espécie *E. coli* (veja-se, v.g., Bolivar et al., 1977, Gene 2:95). O plasmídeo pBR32 contém genes da resistência à ampicilina e à tetraciclina e proporciona assim um meio fácil para identificar as células transformadas. O plasmídeo pBR, ou outro plasmídeo ou bacteriófago microbiano, também deve conter, ou deve ser

modificado de tal forma que contenha, promotores que podem ser utilizados pelo microrganismo para fins de expressão.

Tais promotores, mais vulgarmente utilizados para a construção de ADN recombinante, incluem B-lactamase (penicilinase) e sistemas promotores da lactose (Chang et al., 1978; Itakura et al., 1977; Goeddel et al., 1979) e um sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel et al., 1979; pedido de patente de invenção EPO nº 0036776 publicado). Embora estes sejam os que se utiliza mais vulgarmente, têm sido descobertos e utilizados outros promotores microbianos, tendo sido publicados pormenores sobre as suas sequências nucleotídicas, permitindo a um especialista ligá-los funcionalmente a vectores plasmídicos (Siebwenlist et al., 1980). Há determinados genes de procariotas que podem ser expressos eficazmente em *E.coli* a partir das suas próprias sequências promotoras, evitando a necessidade de se acrescentar outro promotor por meios artificiais.

Depois da preparação recombinante do polipeptido de acordo com a presente invenção, o isolamento do polipeptido pode ser realizado, por exemplo, por cromatografia por afinidade (ou outro procedimento bioquímico convencional baseado na cromatografia), utilizando um anticorpo monoclonal que se liga substancialmente, de uma forma específica, ao polipeptido de acordo com a presente invenção. Há outra possibilidade que consiste em recorrer à técnica de electroeluição descrita por Andersen et al. em 'J. Immunol. Methods' 161: 29-39.

De acordo com a presente invenção as modificações pós-tradução compreendem lipidação, glicosilação, clivagem ou prolongamento do polipeptido.

De acordo com determinados aspectos, as informações sobre a sequência de ADN proporcionadas pela presente invenção permitem preparar sequências de ADN (ou ARN ou PNA)

relativamente curtas, capazes de hibridar especificamente com as sequências de genes micobacterianas. De acordo com estes aspectos, prepara-se sondas de ácidos nucleicos com um comprimento adequado, tomando em consideração a sequência relevante. A capacidade de tais sondas de ácidos nucleicos para hibridar especificamente com sequências de genes micobacterianos conferiu-lhes uma utilidade particular em diversas variantes. De acordo com um aspecto mais importante, as sondas podem ser utilizadas em diversa análises de diagnóstico para detectar a presença de organismos patogénicos numa dada amostra. No entanto, estão previstas as duas as utilizações, incluindo a utilização das informações sobre a sequência para se preparar iniciadores de espécies mutantes ou iniciadores para utilização na preparação de outros arquétipos genéticos.

Para além da sua utilização como pontos de partida para a síntese de polipeptídos da presente invenção e para sondas de hibridação (úteis para ensaios de hibridação directa ou como iniciadores, *v.g.*, para PCR ou outros métodos de amplificação molecular), os fragmentos de ácidos nucleicos da presente invenção podem ser utilizados para efectuar a expressão *in vivo* de抗igénios, isto é, os fragmentos de ácido nucleico podem ser utilizados nas chamadas vacinas de ADN. As pesquisas mais recentes revelaram que é possível introduzir um fragmento de ADN, clonado num vector que é não replicativo em células eucarióticas, num animal (incluindo um ser humano), *v.g.*, por injecção intramuscular ou administração percutânea (a metodologia designada por "arma génica"). O ADN é absorvido, *v.g.*, por células musculares, e o gene relevante é expresso por um promotor que funciona em eucariotas, *v.g.*, um promotor viral, e subsequentemente o produto genético estimula o sistema imunitário. Tais métodos recentemente descobertos foram descritos por Ulmer *et al.*,

1993, documento considerando-se aqui incorporado por referência.

Assim, a presente invenção também diz respeito a uma vacina que comprehende um fragmento de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, em que a vacina efectua a expressão *in vivo* do antigénio num animal, incluindo um ser humano, a quem a vacina foi administrada, sendo a quantidade de antigénio, assim expresso, eficaz para conferir uma resistência substancialmente mais elevada a infecções com micobactérias do complexo de *tuberculosis* a um animal, incluindo um ser humano.

Possivelmente, a eficácia de uma "vacina de ADN" pode ser intensificada por administração do gene que codifica o produto de expressão em conjunto com um fragmento de ADN que codifica um polipeptído que tem a capacidade modular uma resposta imunitária. Por exemplo, seria possível administrar um gene que codifica precursores de linfoquinas ou linfoquinas (v.g., IFN- γ , IL-2 ou IL-12) em conjunto com o gene que codifica a proteína imunogénica, tendo a administração lugar quer em dois fragmentos de ADN separados quer dos dois fragmentos de ADN incorporados no mesmo vector. É também possível administrar fragmentos de ADN que comprehendem uma multiplicidade de sequências nucleotídicas, cada uma delas codificando um dos epítopos relevantes dos polipeptídos aqui descritos, de forma a efectuar uma sensibilização contínua do sistema imunitário com um espectro amplo de tais epítopos.

Tal como foi explicado antes, os fragmentos polipeptídicos da presente invenção são excelentes candidatos a constituintes de vacinas ou a constituintes de um agente de diagnóstico imunitário, devido à sua presença extracelular em meio de cultura que contêm micobactérias virulentas metabolizadoras pertencentes ao complexo de *tuberculosis*,

devido às suas elevadas homologias com tais antigénios extracelulares ou devido à sua ausência em *M. bovis* BCG.

Assim, há outra parte da presente invenção que diz respeito a uma composição imunológica que contém um polipeptído ou polipeptído de fusão de acordo com a invenção. Para se garantir um desempenho óptimo de uma tal composição imunológica, é preferível que tal composição contenha um transportador, um veículo ou um adjuvante aceitável sob os pontos de vista imunológico e farmacêutico.

Os transportadores adequados são seleccionados entre o conjunto constituído por um polímero, ao qual o(s) polipeptído(s) se ligam por interacção hidrofóbica não-covalente, tal como um plástico, *v.g.*, poliestireno, ou um polímero ao qual o(s) polipeptído(s) se ligam covalentemente, tal como um polissacárido ou um polipeptído *v.g.*, albumina do soro de bovino, ovalbumina ou hemocianina de *diodora apertura*. Os veículos adequados são seleccionados entre o conjunto constituído por um diluente e um agente de suspensão. De preferência, o adjuvante é seleccionado entre o conjunto constituído por brometo de dimetildioctadecilamónio (DDA), Quil A, poli I:C, adjuvante incompleto de Freund, IFN- γ , IL-2, IL-12, lípido A monofosforilado (MPL) e dipéptido muramílico (MDP).

Uma composição imunológica preferida de acordo com a presente invenção comprehende pelo menos dois fragmentos polipeptídicos diferentes, em que cada fragmento polipeptídico diferente é um polipeptído ou um polipeptído de fusão definido antes. É preferível que a composição imunológica comprehenda entre 3 e 20 fragmentos polipeptídicos ou polipeptídos de fusão diferentes.

De preferência, uma composição imunológica deste tipo pode assumir a forma de uma vacina ou de um reagente para teste dérmico.

No seguimento do que foi dito antes, a presente invenção também diz respeito a um método para a preparação de uma composição imunológica de acordo com a presente invenção, consistindo tal método em preparar, sintetizar ou isolar um polipeptido de acordo com a presente invenção e solubilizar ou dispersar o polipeptido num meio para uma vacina e adicionar, facultativamente, outros antigénios de *M. tuberculosis* e/ou um transportador, veículo e/ou adjuvante.

De um modo geral, a preparação de vacinas que contêm sequências peptídicas como ingrediente activo é bem conhecida na especialidade, conforme exemplificado nas patentes de invenção norte-americanas n^{os} 4 608 251, 4 601 903, 4 599 231, 4 599 230, 4 596 792 e 4 578 770, considerando-se todas estas aqui incorporadas por referência. Tipicamente, tais vacinas são preparadas em formas injectáveis, tais como soluções ou suspensões líquidas; também é possível preparar formas sólidas adequadas para dissolução ou suspensão em líquido antes da injecção. A preparação pode também ser emulsionada. O ingrediente imunogénico activo é frequentemente misturado com excipientes que são farmaceuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo. Como excipientes adequados refere-se, por exemplo, água, soluto salino, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e suas combinações. Além disso, facultativamente, a vacina pode conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares, tais como agentes humectantes ou emulsionantes, agentes tampão para o pH ou adjuvantes, que reforçam a eficácia das vacinas.

As vacinas são convencionalmente administradas por via parentérica, por meio de injecção, por exemplo, subcutânea ou intramuscular. Como outras formulações que são adequadas para outros modos de administração refere-se os supositórios e, em alguns casos, as formulações orais. No caso dos supositórios,

os aglutinantes e os transportadores tradicionais podem incluir, por exemplo, polialquíleno-glicóis ou trigliceridos, e tais supositórios podem ser preparados a partir de misturas que contenham entre 0,5% e 10% e de preferência entre 1% e 2% do ingrediente activo. As formulações orais contêm excipientes normalmente utilizados, tais como, por exemplo, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio de qualidade farmacêutica e semelhantes. Tais composições assumem a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de libertação controlada ou pós e contêm entre 10% e 95% e de preferência entre 25% e 70% de ingrediente activo.

As proteínas podem ser formuladas na vacina, em formas neutras ou de sais. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácidos (com os grupos amino livres do péptido) formados com ácidos inorgânicos, tais como, por exemplo, ácido clorídrico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido mandélico e semelhantes. Os sais formados com os grupos carboxilo livres também podem ser obtidos a partir de bases inorgânicas, tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou ferro, e bases orgânicas, tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína e semelhantes.

As vacinas são administradas de uma forma compatível com a formulação de dosagem e numa quantidade tal que seja terapeuticamente eficaz e imunogénica. A quantidade administrada irá depender do paciente que se pretende tratar, incluindo, v.g., a capacidade do sistema imunitário do indivíduo para construir uma resposta imunitária e o grau de protecção desejado. Os níveis de dosagem adequados são da ordem das várias centenas de microgramas de ingrediente

activo por vacinação, com um intervalo preferido entre cerca de 0,1 µg e 1000 µg, tal como entre cerca de 1 µg e 300 µg e especialmente entre cerca de 10 µg e 50 µg. Os regimes adequados para a administração inicial e para as injecções de reforço também podem variar, mas são caracterizados por uma administração inicial e posteriores inoculações ou outras administrações.

A forma de aplicação pode variar bastante. Qualquer um dos métodos convencionais de administração de uma vacina é aplicável. Admite-se que tais métodos incluem a aplicação oral numa base sólida fisiologicamente aceitável ou numa dispersão fisiologicamente aceitável, por via parentérica, por meio de injecção, ou semelhante. A dosagem da vacina irá depender da via de administração e irá variar em função da idade do indivíduo que se pretende vacinar e, em menor grau, do tamanho do indivíduo que se pretende vacinar.

Alguns dos polipeptidos da vacina são suficientemente imunogénicos numa vacina, mas há outros casos em que a resposta imunitária será melhor no caso de a vacina compreender ainda uma substância adjuvante.

Como exemplos dos diversos métodos utilizáveis para se conseguir um efeito adjuvante para a vacina refere-se a utilização de agentes, tais como hidróxido de alumínio ou fosfato(alum), vulgarmente utilizado sob a forma de uma solução entre 0,05% a 0,1% em soluto salino tamponado com fosfato, a mistura com polímeros sintéticos de açúcares (Carbopol) utilizados sob a forma de uma solução a 0,25%, e a agregação da proteína na vacina por tratamento térmico a temperaturas entre 70°C e 101°C durante períodos compreendidos entre 30 segundos e 2 minutos, respectivamente. Também é possível recorrer à agregação por reactivação com anticorpos (Fab) tratados com pepsina para albumina, mistura com células bacterianas, tais como *C. parvum*, ou endotoxinas

ou componentes lipopolissacarídicos de bactérias gram-negativas, emulsão em veículos oleosos fisiologicamente aceitáveis, tais como monoleato de manido (Aracel A) ou emulsão com uma solução a 20% de um perfluorocarbono (Fluosol- DA) utilizado como substituto de bloco. De acordo com a presente invenção, o DDA (brometo de dimetildioctadecilamónio) é um candidato interessante a adjuvante, mas os adjuvantes completo e incompleto de Freund, bem como Quila e RIBI, também constituem possibilidades interessantes. Como outras possibilidades refere-se o lípido A monofosforilado (MPL) e o dipéptido muramílico (MDP).

Outra possibilidade muito interessante (e, portanto, preferida) para se conseguir o efeito adjuvante consiste em utilizar a técnica descrita por Gosselin *et al.*, 1992 (que aqui se considera incorporada por referência). Resumidamente, a apresentação de um抗igénio relevante, tal como um抗igénio da presente invenção, pode ser intensificada por meio da conjugação do抗igénio com anticorpos (ou fragmentos de anticorpos que se ligam a抗igénio) contra os receptores Fcγ em monócitos/macrófagos. Em particular, foi já demonstrado que os conjugados entre抗igénios e anti-FcγRI intensificam a imunogenicidade para fins de vacinação.

Há outras possibilidades que implicam a utilização de substâncias moduladoras imunológicas, tais como linfoquinas (*v.g.*, IFN- γ , IL-2 e IL-12), ou indutores de IFN- γ sintético, tal como poli I:C, em combinação com os adjuvantes supramencionados. Tal como se descreve no exemplo 3, admite-se que tais misturas de抗igénio e adjuvante venham a proporcionar melhores formulações para vacinas.

Em muitos casos, será necessário realizar múltiplas administrações da vacina, normalmente não ultrapassando seis vacinações, mais normalmente não ultrapassando quatro vacinações e de preferência uma ou mais, normalmente pelo

menos cerca de três vacinações. As vacinações terão lugar, normalmente, a intervalos de duas a doze semanas e mais vulgarmente a intervalos de três a cinco semanas. Será desejável administrar os reforços periódicos a intervalos de 1 a 5 anos, normalmente de três anos, para manter os níveis desejados de imunidade protectora. O curso da imunização pode ser seguido por ensaios de proliferação *in vitro* de LSP (linfócitos do sangue periférico) co-cultivados com ESAT-6 ou ST-CF e especialmente por medição dos níveis de IFN- γ libertado a partir dos linfócitos amplificados. Os ensaios podem ser efectuados com marcadores convencionais, tais como radionuclidos, enzimas, agentes fluorescentes e semelhantes. Tais técnicas são bem conhecidas e encontram-se descritas numa grande variedade de patentes de invenção, tais como as patentes de invenção norte-americanas nºs 3 791 932, 4 174 384 e 3 949 064, ilustrativas de tais tipos de ensaios.

Devido à variação genética, diferentes indivíduos podem reagir ao mesmo polipeptido com respostas imunitárias de intensidade variável. Assim, a vacina de acordo com a presente invenção pode compreender diversos polipeptídios diferentes para se aumentar a resposta imunitária. A vacina pode compreender dois ou mais polipeptídios, em que todos os polipeptídios são tal como definidos antes ou em que alguns dos péptidos, mas não todos, podem ser obtidos a partir de uma bactéria pertencente ao complexo de *tuberculosis*. Neste último exemplo, os polipeptídios que não satisfaçam necessariamente os critérios estabelecidos para os polipeptídios, tanto podem actuar devido à sua própria imunogenicidade como podem actuar meramente como adjuvantes. Como exemplos de polipeptídios relevantes refere-se MPB64, MPT64 e MPB59, mas qualquer outra substância que possa ser isolada a partir das micobactérias constitui um candidato elegível.

A vacina pode compreender entre 3 e 20 polipeptidos diferentes, tais como 3 a 10 polipeptidos diferentes.

Uma das razões para se misturar os polipeptidos da presente invenção com um adjuvante consiste na activação eficaz de uma resposta imunitária celular. No entanto, tal efeito também pode ser conseguido por outras vias, por exemplo, por expressão do antígeno eficaz numa vacina num microrganismo não patogénico. Um exemplo bem conhecido de um microrganismo destes é a *Mycobacterium bovis* BCG.

Sendo assim, constitui um outro aspecto importante da presente invenção o aperfeiçoamento da vacina de BCG viva actualmente disponível, a qual é uma vacina para imunizar um animal, incluindo um ser humano, contra a TB provocada por micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*, que comprehende um microrganismo como componente eficaz, em que se incorporou no genoma do microrganismo uma ou várias cópias de uma sequência de ADN que codifica um polipeptido tal como definido antes, de tal forma que permita ao microrganismo expressar e segregar o polipeptido.

No presente contexto, o termo "genoma" designa o cromossoma dos microrganismos, bem como ADN ou ARN extracromossómico, tal como plasmídeos. No entanto, é preferível que a sequência de ADN da presente invenção tenha sido introduzida no cromossoma do microrganismo não patogénico, uma vez que tal facto irá evitar a perda do material genético introduzido.

É preferível que o microrganismo não patogénico seja uma bactéria, v.g., seleccionada entre o conjunto constituído pelos géneros *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Escherichia*. É especialmente preferível que o microrganismo não patogénico seja a *Mycobacterium bovis* BCG, tal como a subestirpe de *Mycobacterium bovis* BCG: Danish 1331.

A incorporação de uma ou várias cópias de uma sequência nucleotídica que codifica o polipeptido de acordo com a presente invenção numa micobactéria de uma estirpe de *M. bovis* BCG irá reforçar o efeito imunogénico da estirpe BCG. A incorporação de mais de uma cópia de uma sequência nucleotídica da presente invenção é contemplada, para assim reforçar ainda mais a resposta imunitária, sendo que, consequentemente, constitui um aspecto da presente invenção uma vacina em que, no genoma do microrganismo, se incorpora pelo menos 2 cópias de uma sequência de ADN que codifica um polipeptido, tal como pelo menos 5 cópias. As cópias das sequências de ADN podem ser idênticas e codificadoras de polipeptidos idênticos ou podem ser variantes da mesma sequência de ADN codificadora de polipeptidos idênticos ou homólogos ou, de acordo com outra variante, podem ser sequências de ADN diferentes, codificadoras de polipeptidos diferentes, em que pelo menos de um dos polipeptidos está de acordo com a presente invenção.

A vacina viva da presente invenção pode ser preparada por cultura de uma célula não patogénica transformada, de acordo com a presente invenção, e transferência de tais células para um meio para vacina e adição facultativa de um transportador, um veículo e/ou um adjuvante.

No caso de se pretender efectuar o diagnóstico de uma infecção anterior ou em curso com micobactérias virulentas, seria possível fazer contactar uma amostra de sangue que contém células mononucleares (*inter alia*, linfócitos T) de um paciente com uma amostra de um ou vários polipeptidos da presente invenção. Tal reacção de contacto pode ter lugar *in vitro* e uma reacção positiva poderia ser, *v.g.*, uma proliferação das células T ou a libertação de citoquinas, tal como interferão γ, para a fase extracelular (*v.g.*, para um sobrenadante da cultura); como teste adequado *in vivo* poderia

realizar-se um teste dérmico, tal como descrito antes. É também concebível fazer contactar uma amostra de soro de um indivíduo com um polipeptido da presente invenção, em que a demonstração da existência de ligação entre os anticorpos na amostra de soro e o polipeptido seria indicativa de uma infecção anterior ou em curso.

Assim sendo, a presente invenção também diz respeito a um método *in vitro* para o diagnóstico de uma sensibilização anterior ou em curso, num animal ou ser humano, com uma bactéria do complexo de *tuberculosis*, consistindo tal método em obter uma amostra sanguínea do animal ou ser humano e em fazer contactar a amostra do animal ou ser humano com o polipeptido da presente invenção, em que a ocorrência de uma libertação significativa pelo menos de uma citoquina para a fase extracelular a partir das células mononucleares na amostra de sangue seria indicativo da sensibilização do animal. A expressão "libertação significativa" pretende aqui significar que a libertação da citoquina é significativamente maior do que a libertação da citoquina de uma amostra de sangue colhida a partir de um indivíduo não tuberculoso (*v.g.*, um indivíduo que não reage num teste dérmico de TB tradicional). Normalmente, uma libertação significativa é pelo menos duas vezes superior à libertação observada numa amostra desse tipo.

Finalmente, também faz parte integrante da presente invenção um anticorpo monoclonal ou policlonal que reage especificamente com um polipeptido da presente invenção num imunoensaio ou um fragmento de ligação específico do referido anticorpo. Para a produção de tais anticorpos policlonais é necessário que o animal adequado seja imunizado com o polipeptido e que tais anticorpos sejam posteriormente isolados, de um modo conveniente, por cromatografia de imunoafinidade. A preparação de anticorpos monoclonais pode

ter lugar por métodos bem conhecidos na especialidade, visto que a presente invenção proporciona quantidades adequadas de抗igénios tanto para a imunização como para a pesquisa de hibridomas positivos.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: os murganhos com memória imunitária de longo prazo são eficazmente protegidos contra uma infecção com *M. tuberculosis*. Os murganhos foram vacinados com *M. tuberculosis* e os seus baços foram isolados em momentos diferentes. Os linfócitos esplénicos foram estimulados *in vitro* com ST-CF e a libertação de IFN- γ foi investigada (painel A). As contagens de CFU nos baços dos dois grupos de murganhos estão indicadas no painel B. Os murganhos com memória imunitária controlam a infecção ao fim da primeira semana e produzem grandes quantidades de IFN- γ em resposta aos抗igénios em ST-CF.

Figura 2: as células T implicadas na imunidade protectora são predominantemente encaminhadas para moléculas com 6 a 12 e 17 a 38 kDa. Os murganhos com memória imunitária controlam a infecção ao fim da primeira semana e produzem grandes quantidades de IFN- γ em resposta aos抗igénios em ST-CF.

Figura 3: sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 1) de *cfp7*. A sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 2) de CFP7 está indicada no código convencional de uma letra, por baixo da sequência nucleotídica. O local putativo de ligação do ribossoma está escrito em itálico sublinhado, tal como sucede com as regiões -10 e -35 putativas. Os nucleótidos escritos a negrito são os que codificam CFP7.

EXEMPLO 1

Identificação de抗igénios únicos de filtrados de culturas implicados na imunidade protectora

Criou-se um grupo de murganhos eficazmente protegidos por infecção de murganhos (fêmeas) da estirpe C57B1/6j, com a idade de 8 a 12 semanas, com *M. tuberculosis* à razão de 5×10^4 , i.v. Ao fim de 30 dias após a infecção, os murganhos foram submetidos a 60 dias de tratamento com antibióticos, com isoniazida, e foram depois deixados em repouso durante 200 a 240 dias para se garantir o estabelecimento de memória da imunidade a longo prazo. Estes murganhos com memória imunitária estão protegidos de uma forma muito eficaz contra uma infecção secundária (figura 1). Neste modelo, a imunidade a longo prazo é mediada por uma população de células CD4 muito reactivas recrutadas para o local da infecção e desencadeadas para produzirem grandes quantidades de IFN-γ em resposta a ST-CF (figura 1) (Andersen et al., 1995).

Este modelo foi utilizado para identificar抗igénios únicos reconhecidos por células T protectoras. Os murganhos com memória imunitária foram novamente infectados com *M. tuberculosis* à razão de 1×10^6 , i.v., tendo depois sido recolhidos linfócitos esplénicos entre o 4º e o 6º dia de re-infecção, momento esse em que tal população está muito reactiva a ST-CF. Os抗igénios reconhecidos por tais células T foram cartografado pela técnica de eluição múltipla (Andersen e Heron, 1993). De acordo com essa técnica, divide-se misturas complexas de proteínas, separadas em SDS-PAGE, em fracções estreitas num tampão fisiológico. Estas fracções foram utilizada para estimular linfócitos esplénicos *in vitro*, tendo a libertação de IFN-γ sido controlada (figura 2). Os murganhos com memória imunitária a longo prazo não reconheceram estas fracções antes da infecção com TB, mas os linfócitos esplénicos obtidos durante a recordação da

imunidade protectora reconheceram uma gama de抗igénios de filtrado de cultura e foi detectado um pico de produção de IFN- γ em resposta às proteínas de peso molecular aparente entre 6 e 12 e 17 e 30 kDa (figura 2). Concluiu-se assim que os抗igénios de filtrados de culturas dentro destas regiões são os principais alvos, reconhecidos pelas células T efectoras da memória, desencadeados para libertar IFN- γ durante a primeira fase de uma resposta imunitária protectora.

EXEMPLO 2

Clonagem de genes que expressam抗igénios de filtrados de culturas de baixa peso molecular

No exemplo 1 demonstrou-se que os抗igénios da fracção de baixo peso molecular são fortemente reconhecidos pelas células isoladas a partir de murganhos com memória imunitária. Assim, foram gerados anticorpos monoclonais (mAbs) para tais抗igénios por imunização com a fracção de baixo peso em adjuvante RIBI (primeira e segunda imunização), seguindo-se duas injecções com as fracções em hidróxido de alumínio. As operações de fusão e clonagem das linhagens de células reactivas foram efectuadas de acordo com os procedimentos convencionais (Kohler e Milstein 1975). O procedimento proporcionou dois mAbs: o ST-3 que visa um抗igénio de 9 kDa de filtrado de cultura (CFP9) e o PV-2 que visa um抗igénio de 7 kDa (CFP7), no caso de o peso molecular ser calculado a partir da migração dos抗igénios por SDS-PAGE.

Para se identificar os抗igénios que se ligam aos Mab foram realizadas as seguintes experiências:

pesquisou-se o banco de ADN recombinante de *M. tuberculosis* λgt11, construído por R. Young (Young, R.A. et al. 1985) e obtida através do programa IMMTUB (WHO.0032.wibr)

da Organização Mundial de Saúde, procurando bacteriófagos que expressassem produtos génicos que se ligassem aos anticorpos monoclonais ST-3 e PV-2.

Colocou-se em placas aproximadamente 1×10^5 pfu do banco de genes (contendo aproximadamente 25% de bacteriófagos recombinantes), sobre *Escherichia coli* Y1090 (DlacU169, proA⁺, Dlon, araD139, supF, trpC22::tn10 [pMC9] ATCC nº 37197) em gelose suave, e manteve-se a incubar durante 2,5 horas a 42°C.

Cobriu-se as placas com folhas de nitrocelulose saturada com isopropil-β-D-tiogalactopiranósido e manteve-se a incubar durante 2,5 horas a 37°C. Removeu-se a nitrocelulose e manteve-se a incubar com amostras dos anticorpos monoclonais em PBS com 'Tween 20' acrescentado até se obter uma concentração final de 0,05%. Os anticorpos monoclonais ligados foram visualizados por imunoglobulinas de coelho anti-murganho conjugadas com peroxidase de *Armoracia rusticana* (P260, Dako, Glostrup, DK) e uma reacção de contrastação com 5,5',3,3'-tetrametilbenzidina e H₂O₂.

As placas positivas foram novamente clonadas e os bacteriófagos originários de uma única placa foram utilizados para lisogenizar a estirpe Y1089 de *E. coli* (DlacU169, proA⁺, Dlon, araD139, strA, hfl1150 [chr::tn10] [pMC9], ATCC nº 37196). As estirpes lisogénicas resultantes foram utilizadas para propagar as partículas de bacteriófago para extracção do ADN. As estirpes de *E. coli* lisogénicas receberam as designações a seguir indicadas.

AA226 (que expressa o polipeptido CFP9 reactivo com T-3), depositado a 28 de Junho de 1993 na colecção de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), com o número DSM 8377 de admissão, ao abrigo do Tratado de Budapeste e

AA242 (que expressa o polipeptídeo CFP7 reactivo com PV-2), depositado a 28 de Junho de 1993 na colecção de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), com o número DSM 8379 de admissão, ao abrigo do Tratado de Budapeste.

Estas duas estirpes de *E. coli* lisogénicas encontram-se descritas no documento WO 95/0441, tal como sucede com os produtos polipeptídicos micobacterianos expressos pelas mesmas. No entanto, não são facultadas nenhuma das informações sobre as sequências de aminoácidos de tais polipeptídos ou a sua origem genética e por tal motivo apenas se encontram disponíveis para consulta pública os produtos da expressão directa de AA226 e AA242.

A proteína de ligação st-3 é expressa sob a forma de uma proteína fundida com β -galactosidase, ao passo que a proteína de ligação pv-2 aparentemente é expressa numa versão não fundida.

Sequenciação da sequência nucleotídica que codifica a proteína de ligação a PV-2 e ST-3

Para se obter a sequência nucleotídica do gene codificador da proteína de ligação pv-2, efectuou-se a subclonagem do fragmento de EcoRI - EcoRI de AA242 com cerca de 3 kb, obtido a partir de *M. tuberculosis*, no local EcoRI em pBluescriptSK + (Stratagene) e utilizou-se depois para transformar XL-1 Blue de *E. coli* (Stratagene).

De um modo semelhante, para se obter a sequência nucleotídica do gene codificador da proteína de ligação st-3, efectuou-se a subclonagem do fragmento de EcoRI - EcoRI de AA226 com cerca de 5 kb, obtido a partir de *M. tuberculosis*, no local EcoRI em pBluescriptSK + (Stratagene) e utilizou-se depois para transformar XL-1 Blue de *E. coli* (Stratagene).

Obteve-se a sequência de ADN completa dos dois genes pelo método didesoxi de terminação da cadeia adaptado para ADN super-espiralado, utilizando para tal a versão 1.0 do estojo 'Sequenase' de sequenciação de ADN (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH), e por sequenciação em ciclo, utilizando o sistema 'Dye Terminator' em combinação com um leitor de gel automático (modelo 373A; Applied Biosystems) de acordo com as instruções fornecidas. As sequências de ADN estão ilustradas na SEQ ID NO: 1 (CFP7) e na SEQ ID NO: 3 (CFP9), bem como nas figuras 3 e 4, respectivamente. Foram sequenciadas as duas estirpes de ADN.

CFP7

Identificou-se um quadro de leitura ininterrupta (ORF), que codifica uma sequência com 96 resíduos de aminoácidos, a partir de um codão de partida ATG na posição 91-93 que se prolonga até um codão de paragem TAG na posição 379-381. A sequência de aminoácidos deduzida está apresentada na SEQ ID NO: 2 (e na figura 3, na qual são utilizados códigos de aminoácidos convencionais de uma letra).

Aparentemente, o CFP7 é expresso em *E. coli* sob a forma de versão não fundida. Admite-se que a sequência nucleotídica na posição 78-84 seja a sequência Shine Delgarno e admite-se que as sequências desde a posição 47-50 e 14-19 sejam as regiões -10 e -35, respectivamente.

Subclonagem de CFP7 em vectores de expressão

Efectuou-se a clonagem do ORF que codifica CFP7, por PCR, no vector pRVN01 de expressão pMST24 (Theisen et al., 1995).

A amplificação por PCR foi efectuada num reactor térmico (Rapid cycler, Idaho Technology, Idaho), misturando 10 ng de ADN plasmídico com a mistura principal (0,5 µM de cada um dos

iniciadores oligonucleótidos, BSA 0,25 µM (Stratagene), tampão de baixo teor salino (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, MgSO_4 2 mM e 0,1% de 'Triton X-100') (Stratagene), 0,25 mM de cada desoxinucleósido-trifosfato e 0,5 U de polimerase de ADN 'Taq Plus Long' (Stratagene)). O volume final era de 10 µL (todas as concentrações indicadas são concentrações no volume final). A pré-desnaturação foi realizada a 94°C durante 30 segundos. Foram executados 30 ciclos de: desnaturação a 94°C durante 30 segundos, recombinação a 55°C durante 30 segundos e prolongamento a 72°C durante 1 minuto.

Os iniciadores oligonucleótidos foram sintetizados automaticamente num sintetizador de ADN (Applied Biosystems, Forster City, Ca, ABI-391, modo de PCR), desbloqueados e purificados por precipitação em etanol.

Os oligonucleótidos *cfp7* (quadro 1) foram sintetizados com base na sequência nucleotídica da sequência CFP7 (figura 3). Os oligonucleótidos foram manipulados por forma a incluírem o local de enzima de restrição *SmaI* na extremidade 5' e um local de enzima de restrição *BamHI* no terminal 3' para subclonagem orientada.

CFP7

Utilizando a PCR, manipulou-se um local *SmaI*, junto à extremidade 5' do primeiro codão do ORF de 291 pb, que codifica o gene *cfp7*, de tal forma que apenas a região codificadora pudesse ser expressa, e incorporou-se o local *BamHI* logo a seguir ao codão de paragem na extremidade 3'. Clivou-se o fragmento de PCR de 291 pb por meio de *SmaI* e *BamHI*, purificou-se a partir de um gel de agarose e efectuou-se a sua subclonagem nos locals *SmaI* - *BamHI* do vector de expressão pMST24. Utilizou-se o ADN vectorial, que continha o

gene de fusão, para transformar a XL1-Blue de *E. coli* (pRVN01).

Purificação de CFP7 recombinante

Procedeu-se à fusão do ORF, no seu terminal N, com (His)₆-tag (cf. EP-A-0 282 242). O antigénio recombinante foi preparado da seguinte forma: rapidamente, inoculou-se uma única colónia de *E. coli*, que abrigava tanto o plasmídeo pRVN01 como o plasmídeo pRVN02, em caldo de Luria-Bertani que continha ampicilina à razão de 100 µg/mL e tetraciclina à razão de 12,5 µg/mL, e deixou-se crescer a 37°C até se obter um valor de OD_{600nm} = 0,5. Adicionou-se então IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) até uma concentração final de 2 mM (a expressão foi regulada tanto pelo P_{tac} induzível de IPTG forte ou pelo promotor T5) e deixou-se crescer durante mais 2 horas. Recolheu-se as células por centrifugação a 4200 x g, a 4°C, durante 8 minutos. Guardou-se as bactérias aglomeradas a -20°C. Colocou-se o aglomerado novamente em suspensão em tampão BC 40/100 (Tris 20 mM-HCl, pH 7,9, 20% de glicerol, KCl 100 mM, imidazol 40 mM) e rompeu-se as células por tratamento com ultra-sons (5 vezes durante 30 segundos, a intervalos de 30 segundos), a 4°C. Após a centrifugação a 12000 x g durante 30 minutos, a 4°C, utilizou-se o sobrenadante (extracto impuro) para purificação dos antigénios recombinantes.

Purificou-se a proteína de fusão de histidina (His-rCFP7) a partir do extracto impuro por cromatografia de afinidade numa coluna de Ni²⁺-NTA da 'QIAGEN' com um volume de 100 mL. A His-rCFP7 e a His-rCFP9 ligam-se a Ni²⁺. Após lavagens intensivas da coluna com tampão de BC 40/100, efectuou-se a eluição da proteína de fusão com um tampão de BC 1000/100 que continha imidazole 100 mM, Tris 20 mM, pH 7,9, 20% de glicerol e KCl 1 M. Subsequentemente, submeteu-

se os produtos purificados a diálise na presença de Tris 10 mM, pH 8,0. Separou-se então His-rCFP7 e His-rCFP9 dos contaminantes por cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) numa coluna de permuta de aníões (Mono Q, Pharmacia, Suécia) em Tris 10 mM, pH 8,0, com um gradiente linear de NaCl entre 0 e 1 M. Por electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram analisadas aliquotas das fracções. Reuniu-se as fracções que continham His-rCFP7 purificado.

Quadro 1. Sequência dos oligonucleótidos^a de *cfp7*.

Orientação e oligonucleótido	Sequências (5' → 3')	Posição ^b (nucleótido)
Sentido codificador		
pvR3	GCAACACCCGGGATGTCGCAAATCATG (SEQ ID NO: 43)	91-105 (SEQ ID NO: 1)
Anti-sentido		
pvF4	CTACTAAGCTTGGATCC CTAGCCGCCCATTTGGCGG (SEQ ID NO:45)	381-362 (SEQ ID NO: 1)

^a Os oligonucleótidos *cfp7* foram baseados na sequência nucleotídica apresentada na figura 3 (SEQ ID NO: 1).

Os nucleótidos sublinhados não estão contidos na sequência nucleotídica de *cfp7*.

^b As posições referidas são as da porção não sublinhada dos iniciadores e correspondem à sequência nucleotídica apresentada na figura 3.

EXEMPLO 2

Cartografia do antigénio purificado num sistema 2DE.

Para se caracterizar o antigénio purificado, este foi cartografado num sistema de referência por electroforese bidimensional (2DE). Tal sistema consiste num gel contrastado com prata que contém proteínas ST-CF separadas por focagem isoeléctrica, seguindo-se a separação dimensional por electroforese em gel de poliacrilamida. A reacção de 2DE foi efectuada de acordo com Hochstrasser *et al.* (1988). Aplicou-se 85 µg de ST-CF aos tubos de focagem isoeléctrica nos quais foram incluídos os anfolitos 'BioLyt 4-6' (2 partes) e

'BioLyt 5-7' (3 partes) da BioRad. A primeira dimensão teve lugar em geles em tubos de acrilamida/piperazina-diacrilamida, na presença de ureia, do detergente CHAPS e do agente redutor DTT, a 400 V durante 18 horas e a 800 V durante 2 horas. A segunda dimensão, 10 a 20% de SDS-PAGE, foi realizada a 100 V durante 18 horas e com contrastação de prata. A identificação de CFP7 no gel de referência de 2DE foi feita por comparação do padrão das manchas do抗igénio purificado com ST-CF na presença e na ausência do抗igénio purificado. Com o auxílio de um programa informático de 2DE analítico (Phoretix International, UK) foram identificadas as manchas na figura 6.

Actividade biológica do抗igénio recombinante purificado

Indução do interferão γ no modelo de infecção com TB em murganhos

Infecções primárias. Foram utilizados murganhos (fêmeas) das estirpes C57BL/6j(H-2b), CBA/J(H-2k), DBA.2(H-2d) e A.SW(H-2s) (Bomholtegaard, Ry), com a idade de 8 a 12 semanas, os quais foram infectados por via intravenosa, através da veia caudal lateral, com um inóculo de *M. tuberculosis* à razão de 5×10^4 suspenso em PBS num volume de 0,1 mL. Decorridos 14 dias após a infecção, os animais foram sacrificados e os esplenócitos foram isoladas e testados para efectuar o reconhecimento de抗igénios recombinantes.

Resposta de memória. Foram utilizados murganhos (fêmeas) da estirpe C57BL/6j(H-2b) (Bomholtegaard, Ry), com a idade de 8 a 12 semanas, os quais foram infectados por via intravenosa, através da veia caudal lateral, com um inóculo de *M. tuberculosis* à razão de 5×10^4 suspenso em PBS num volume de 0,1 mL. Decorrido 1 mês após a infecção, os

murganhos foram tratados com isoniazida (Merck and Co., Rahway, NJ) e rifabutina (Farmatalia Carlo Erba, Milano, Itália) na água potável, durante dois meses. Deixou-se os murganhos em repouso durante um período de 4 a 6 meses, antes de serem utilizados em experiências. Para o estudo da memória de imunidade, os animais foram infectados com um inóculo de bactérias à razão de 1×10^6 , i.v., e depois sacrificados ao 4º dia após a infecção. Isolou-se os esplenócitos e testou-se para o reconhecimento do抗igénio recombinante. A estimulação com rCFP7 teve como resultado um IFN- γ não superior a 1/3 da resposta observada com células produtoras de IFN- γ em ST-CF. O抗igénio não estimulou a libertação de IFN- γ em murganhos não especializados. Além disso, não foi tóxico para as culturas celulares.

Quadro 7. Resposta das células T numa infecção primária de TB

Nome	c57BL/6J (H2 ^b)	DBA.2 (H2 ^d)	CBA/J (H2 ^k)	A.SW (H2 ^s)
rCFP7	+	+	-	-
Libertação de IFN- γ de murganho durante a recordação da memória de imunidade a <i>M. tuberculosis</i>				
-: sem resposta; +: 1/3 de ST-CF; ++: 2/3 de ST-CF; +++: nível de ST-CF.				

Quadro 8. Resposta das células T em animais com memória de imunidade

Nome	Resposta de memória
rCFP7	+
Libertação de IFN- γ de murganho decorridos 14 dias após a infecção primária com <i>M. tuberculosis</i> .	
-: sem resposta; +: 1/3 de ST-CF; ++: 2/3 de ST-CF; +++: nível de ST-CF.	

Indução de interferão γ em pacientes humanos com TB e indivíduos vacinados com BCG

Dadores humanos: obteve-se PBMC provenientes de dadores saudáveis vacinados com BCG, sem exposição conhecida a

pacientes com TB, e provenientes de pacientes com infecção por *Mycobacterium tuberculosis* comprovada por cultura ou observação ao microscópio. As amostras de sangue foram recolhidas dos pacientes com TB ao fim de 1 a 4 meses após o diagnóstico.

Preparações de linfócitos e cultura celulares: isolou-se PBMC recentes por centrifugação em gradiente de sangue heparinizado, num dispositivo 'Lymphoprep' (Nycomed, Oslo, Noruega). Colocou-se as células novamente em suspensão em meio completo: RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N.I.) enriquecido com estreptomicina à razão de 40 µg/mL, penicilina à razão de 40 U/mL e glutamina à razão de 0,04 mM/mL (todos da Gibco Laboratories, Paisley, Escócia) e 10% de soro ABO humano normal (SHN) proveniente do banco de sangue local. Determinou-se o número e a viabilidade das células por contrastação com azul-de-tripano. As culturas foram estabelecidas com $2,5 \times 10^5$ PBMC em 200 µL, em placas de microtitulação (Nunc, Roskilde, Denmark), e estimuladas sem antigénio, ST-CF, PPD (2,5 µg/mL); rCFP7, numa concentração final de 5 µg/mL. Utilizou-se fito-hemaglutinina à razão de 1 µg/mL (PHA, Difco laboratories, Detroit, MI) como contraprova positiva. Ao fim de 5 dias de cultura, recolheu-se os sobrenadantes para a detecção de citoquinas, reuniu-se e guardou-se a -80°C até à sua utilização.

Análise da citoquina: mediu-se o interferão γ (INF-γ) por um ensaio ELISA convencional, utilizando um par comercialmente disponível de mAb da Endogen, de acordo com as instruções de utilização. Utilizou-se com padrão o IFN-γ recombinante (Gibco Laboratories). O nível de detecção da análise foi de 50 pg/mL. A variação entre os alvéolos duplicados não excedeu 10% da média. As respostas de 9 dadores individuais estão apresentadas no quadro 9.

Tal como é possível observar no quadro 9, são obtidos níveis elevados de libertação de IFN- γ após a estimulação com diversos抗igenos recombinantes. Aparentemente, o rCFP7 é reconhecido com mais intensidade por dadores saudáveis vacinados com BCG.

Quadro 9. Valores médios dos resultados da estimulação, com抗igenos recombinantes, de células sanguíneas humanas de 7 pacientes vacinados com BCG e 7 pacientes com TB. São apresentados os valores de DEPOIS para cada抗igeno. O filtrado da cultura ST-CF e *M. avium* são apresentados para fins comparativos.

Contraprovas, Saudáveis, Vacinados com BCG, sem exposição conhecida a TB

dador	sem ag	PHA	PPD	STCF	CFP7
1	6	9564	6774	3966	7034
2	48	12486	6603	8067	3146
3	190	11929	10000	8299	8015
4	10	21029	4106	3537	1323
5	1	18750	14209	13027	17725
Pacientes com TB, 1 a 4 meses após o diagnóstico					
	sem ag	PHA	PPD	STCF	CFP7
6	9	8973	5096	6145	852
7	1	12413	6281	3393	168
8	4	11915	7671	7375	104
9	32	22130	16417	17213	8450

EXEMPLO 3

Os抗igenos recombinantes foram testados individualmente como vacinas de subunidade em murganhos. Imunizou-se cinco grupos de murganhos (fêmeas) C57B1/6j, com a idade de 6 a 8 semanas (Bomholtegård, Denmark), por via subcutânea,

na base da cauda, com vacinas que tinham a constituição seguinte:

Grupo 1: 10 µg de CFP7

Grupo 2: 50 µg de ST-CF

Grupo 3: grupo de contraprova com adjuvante

Grupo 4: BCG, $2,5 \times 10^5$ /mL, 0,2 mL

Grupo 5: grupo de contraprova, não tratado

A vacina de subunidade foi administrada com DDA enquanto adjuvante. Os animais foram vacinados com um volume de 0,2 mL. Decorridas duas semanas após a primeira injecção e três semanas após a segunda injecção, administrou-se injecções de reforço ao grupo 1 a 9 numa zona superior das costas. Ao fim de uma semana após a última injecção, exsanguinou-se os murganhos e isolou-se as suas células sanguíneas. Monitorizou-se a resposta imunitária induzida através da libertação de IFN-γ no sobrenadante da cultura, quando estimulada *in vitro* com a proteína homóloga.

Decorridas 6 semanas após a última imunização, estimulou-se os murganhos com aerossol com 5×10^6 de *Mycobacterium tuberculosis* viáveis/mL. Ao fim de 6 semanas após a infecção, sacrificou-se os murganhos e determinou-se o número de bactérias viáveis no pulmão e no baço dos murganhos infectados por cultura, em placas 7H11, de diluições triplas sequenciais de homogeneizados de órgãos. Efectuou-se a contagem das colónias ao fim de 2 a 3 semanas de incubação. A eficácia protectora foi expressa como sendo a diferença entre os valores de \log_{10} da média geométrica das contagens obtidas a partir de cinco murganhos do grupo relevante e a média geométrica das contagens obtida a partir de cinco murganhos do grupo de contraprova relevante.

Os resultados das experiências estão apresentados no quadro seguinte.

Imunogenicidade e eficácia protectora em murganhos de ST-CF e vacina de subunidade

Vacina de subunidade	Imunogenicidade	Eficácia protectora
ST-CF	+++	+++
CFP7	++	-

+++ imunogenicidade forte/elevada protecção (nível da BCG)

++ imunogenicidade média/protecção média

- Sem reconhecimento/sem protecção

Em conclusão, foi identificada uma proteína indutora de elevados níveis de protecção. O CFP7 não induziu protecção no modelo com murganhos.

EXEMPLO 4

Distribuição de cfp7 por espécies

Presença de cfp7 em diferentes espécies de micobactérias

Para se determinar a distribuição do gene *cfp7* em espécies pertencentes ao complexo de *M. tuberculosis* e noutras micobactérias, utilizou-se PCR e/ou hibridação à Southern. As estirpes bacterianas utilizadas estão enumeradas no quadro 10. Preparou-se ADN genómico a partir de células micobacterianas, conforme descrito antes (Andersen et al. 1992).

Foram utilizadas análises por PCR para se determinar a distribuição do gene *cfp7* em espécies pertencentes ao complexo de *tuberculosis* e noutras micobactérias. As estirpes bacterianas utilizadas estão enumeradas no quadro 10. Efectuou-se a PCR em ADN genómico, preparado a partir de células micobacterianas, conforme descrito antes (Andersen et al. 1992).

Os iniciadores oligonucleótidos utilizados foram sintetizados automaticamente num sintetizador de ADN (Applied

Biosystems, Forster City, Ca, ABI-391, PCR-mode), desbloqueados e purificados por precipitação em etanol. Os iniciadores utilizados para as análises estão indicados no quadro 11.

A amplificação por PCR foi efectuada num reactor térmico (Rapid cycler, Idaho Technology, Idaho) por mistura de 20 ng de ADN cromossómico com a mistura principal (que continha 0,5 µM de cada um dos iniciadores oligonucleótidos, 0,25 µM de BSA (Stratagene), tampão de baixo teor salino (Tris 20 mM-HCl, pH 8,8, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, MgSO_4 2 mM e 0,1% de 'Triton X-100') (Stratagene), 0,25 mM de cada desoxinucleósido-trifosfato e 0,5 U de polimerase de ADN 'Taq Plus Long' (Stratagene)). O volume final foi de 10 pL (todas as concentrações indicadas são concentrações no volume final). A pré-desnaturação foi efectuada a 94°C durante 30 segundos. Foram executados 30 ciclos de: desnaturação a 94°C durante 30 segundos, emparelhamento a 55°C durante 30 segundos e alongamento a 72°C durante 1 minuto.

Foram utilizadas as seguintes combinações de iniciador (o comprimento dos produtos amplificados estão indicados entre parênteses):

cfp7: pVF1 e PVR1 (274 bp), pVF1 e PVR2 (197 bp), pVF3 e PVR1 (302 bp), pVF3 e PVR2 (125 bp).

Quadro 10

Estirpes micobacterianas utilizadas no presente exemplo

Espécie e estirpe(s)		Fonte
1. <i>M. tuberculosis</i>	H37R vATCC ^a (ATCC 27294)	
2.	H37R aATCC (ATCC 25177)	
3.	Erdman	Obtido de A. Lazlo, Ottawa, Canadá
4. Sub-estirpe de <i>M. bovis</i> BCG: Danish 1331		SSI ^b
5.	Chinês	SSI ^c
6.	Canadiano	SSI ^c
7.	Glaxo	SSI ^c
8.	Russia	SSI ^c
9.	Pasteur	SSI ^c
10.	Japão	WHO ^e
11. <i>M. bovis</i> MNC 27		SSI ^c
12. <i>M. africanum</i>		Isolado a partir de um paciente dinamarquês
13. <i>M. leprae</i> (derivado de tatu)		Obtido a partir de J.M. Colston, Londres, UK
14. <i>M. avium</i> (ATCC 15769)		ATCC
15. <i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)		ATCC
16. <i>M. marinum</i> (ATCC 927)		ATCC
17. <i>M. scrofulaceum</i> (ATCC 19275)		ATCC
18. <i>M. intercellulare</i> (ATCC 15985)		ATCC
19. <i>M. fortuitum</i> (ATCC 6841)		ATCC
20. <i>M. xenopi</i>		Isolado a partir de um paciente dinamarquês
21. <i>M. flavescens</i>		Isolado a partir de um paciente dinamarquês dinamarquês

(continuação)

22. <i>M. szulgai</i>		Isolado a partir de um paciente dinamarquês
23. <i>M. terrae</i>		SSI ^c
24. <i>E. coli</i>		SSI ^d
25. <i>S. aureus</i>		SSI ^d

^a Colecção Americana de Culturas Tipo (American Type Culture Collection), E.U.A..
^b Statens Serum Institut, Copenhaga, Dinamarca.
^c A nossa colecção. Departamento de micobacteriologia, Statens Serum Institut, Copenhaga, Dinamarca.
^d Departamento de Microbiologia Clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca
^e OMS International Laboratory for Biological Standards, Statens Serum Institut, Copenhaga, Dinamarca.

Quadro 11.

Sequência do oligonucleótido *cfp7*

Orientação e oligonucleótido	Sequências (5' → 3') ^a	Posição ^b (nucleótidos)
Sentido codificador	pvR1 <u>GTACGAGAATT</u> CATGTCGCAAATCATG (SEQ ID NO: 35)	91 - 105 (SEQ ID NO:1)
	pvR2 <u>GTACGAGAATT</u> CGAGCTTGGGTGCCG (SEQ ID NO:36)	168-181 (SEQ ID NO:1)
Anti-sentido	pvF1 <u>CGTTAGGGATCCT</u> CATGCCATGGTGTGG (SEQ ID NO:38)	340 - 323 (SEQ ID NO:1)
	<u>CGTTAGGGATCCGGTCC</u> ACTGTGCC pvF3 (SEQ ID NO: 39)	268 - 255 (SEQ ID NO:1)

^a Os nucleótidos sublinhados não estão contidos na sequência nucleotídica de *cfp7*.^b As posições referidas são as das porções não sublinhadas dos iniciadores e correspondem à sequência nucleotídica apresentada na SEQ ID NO:1 de *cfp7*.

A hibridação à Southern foi realizada tal como foi descrito antes (Oettinger e Andersen, 1994), com as seguintes modificações: fez-se digerir 2 µg de ADN genómico com *Pvu*II, submeteu-se a electroforese em gel de agarose a 0,8% e transferiu-se para uma membrana de 'nylon' (Hybond N-plus; Amersham International plc, Little Chalfont, Reino Unido) com

um dispositivo de transferência por vácuo (Milliblot, TM-v; Millipore Corp., Bedford, MA). Os fragmentos do gene *cfp7* foram amplificados por PCR a partir do plasmídeo pRVN01, utilizando os iniciadores apresentados no quadro 11. As sondas foram marcadas de uma forma não radioactiva com um estojo de quimioluminescência intensificada (ECL; Amersham International plc, Little Chalfont, Reino Unido). As operações de hibridação e detecção foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os resultados estão resumidos no quadro 12.

Quadro 12. Análise interespécies dos genes *cfp7*, *cfp9* e *mpt51* por PCR e/ou hibridação à Southern e da proteína MPT51 por hibridação à Western.

	PCR <i>cfp7</i>	Hibridação à Southern <i>cfp7</i>
Espécie e estirpe		
1. <i>M. tub.</i> H37Rv	+	+
2. <i>M. tub.</i> H37Ra	+	N.D.
3. <i>M. tub.</i> Erdmann	+	+
4. <i>M. bovis</i>	+	
5. <i>M. bovis</i> BCG Danish 1331	+	+
6. <i>M. bovis</i> BCG Japão	+	+
7. <i>M. bovis</i> BCG Chinês	+	+
8. <i>M. bovis</i> BCG Canadiano	+	+
9. <i>M. bovis</i> BCG Glaxo	+	+
10. <i>M. bovis</i> BCG Russia	+	+
11. <i>M. bovis</i> BCG Pasteur	+	+
12. <i>M. africanum</i>	+	+
13. <i>M. leprae</i> -	-	-
14. <i>M. avium</i>	+	+
15. <i>M. kansasii</i>	+	+

(continuação)

16. <i>M. marinum</i>	-	+
17. <i>M. scrofulaceum</i>	-	-
18. <i>M. intercellulare</i>	+	+
19. <i>M. fortuitum</i>		
20. <i>M. flavescens</i>	+	+
21. <i>M. xenopi</i>	-	N.D.
22. <i>M. szulgai</i>	(+)	-
23. <i>M. terrae</i>	-	N.D.
+, reacção positiva; -, sem reacção, N.D. não determinado.		

Encontrou-se *cfp7* no complexo de *M. tuberculosis*, incluindo a BCG e as micobactérias ambientais *M. avium*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. intracellular* e *M. flavescens*.

LISTAGEM DE REFERÊNCIAS

- Andersen, P. e Heron, I., 1993, J. Immunol. Methods 161: 29-39.
- Andersen, A. B. et al., 1992, Infect. Immun. 60: 2317-2323.
- Andersen P., 1994, Infect. Immun. 62: 2536-44.
- Andersen P. et al., 1995, J. Immunol. 154: 3359-72
- Barkholt, V. e Jensen, A. L., 1989, Anal. Biochem. 177: 318-322.
- Borodovsky, M., e J. McIninch. 1993, Computers Chem. 17:123-133.
- van Dyke M. W. et al., 1992. Gene, págs. 99-104.
- Gosselin et al., 1992, J. Immunol. 149: 3477-3481.
- Harboe, M. et al., 1996, Infect. Immun. 64: 16-22.
- von Heijne, G., 1984, J. Mol. Biol. 173: 243-251.
- Hochstrasser, D.F. et al., 1988, Anal.Biochem. 173: 424-435
- Köhler, G. e Milstein, C., 1975, Nature 256: 495-497.
- Li, H. et al., 1993, Infect. Immun. 61: 1730-1734.
- Lindblad E.B. et al., 1997, Infect. Immun. 65: 623-629.
- Mahairas, G. G. et al., 1996, J. Bacteriol 178: 1274-1282.
- Maniatis T. et al., 1989, "Molecular cloning: a laboratory manual", 2º ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.I.
- Nagai, S. et al., 1991, Infect. Immun. 59: 372-382.
- Oettinger, T. e Eersen, Å. B., 1994, Infect. Immun. 62: 2058-2064.
- Ohara, N. et al., 1995, Sce. J. immunol. 41: 233-442.
- Pal P. G. e Horwitz M. A., 1992, Infect. Immun. 60: 4781-92.
- Pearson, W. R. e Lipman D. J., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448.
- Ploug, M. et al., 1989, Anal. Biochem. 181: 33-39.
- Porath, J. et al., 1985, FEBS Lett. 185: 306-310.
- Roberts, A.D. et al., 1995, Immunol. 85: 502-508.
- Sørensen, A.L. et al., 1995, Infect. Immun. 63: 1710-1717.
- Theisen, M. et al., 1995, Clinical e Diagnostic Laboratory Immunology, 2: 30-34.

- Valdés-Stauber, N. e Scherer, S., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 3809-3814.
- Valdés-Stauber, N. e Scherer, S., 1996, Appl. Environ. Microbiol. 62: 1283-1286.
- Williams, N., 1996, Science 272: 27.
- Young, R. A. et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2583-2587.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÕES GERAIS:

(i) REQUERENTE:

(A) NOME: Statens Serum Institut

(B) RUA: Artillerivej 5

(C) CIDADE: Copenhaga

(E) PAÍS: Dinamarca

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 2300 S

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: "Fragmentos de ácidos nucleicos e fragmentos polipeptídicos obtidos a partir de *M. tuberculosis*"

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 173

(iv) FORMA DE LEITURA INFORMÁTICA:

(A) TIPO DE MEIO: disquete

(B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM

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

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versão #1.30 (EPO)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 381 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Mycobacterium tuberculosis*

(B) ESTIRPE: H37Rv

(ix) ASPECTO:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 91..381

(ix) ASPECTO:

(A) NOME/CHAVE: -35_sinal

(B) LOCALIZAÇÃO: 14..19

(ix) ASPECTO:

(A) NOME/CHAVE: -10 sinal

(B) LOCALIZAÇÃO: 47.50

(ix) ASPECTO:

(A) NOME/CHAVE: RBS

(B) LOCALIZAÇÃO: 78..84

(ix) ASPECTO:

(A) NOME/CHAVE: péptido mat

(B) LOCALIZAÇÃO: 91..381

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

GGCCCGCCGT ACCTATGTGG CGCGCGATGC TGCSSACCGG TCGACCTATA CCGGGTTCTG	60
ATCGAACCTT GCTGACCGAG AGGACTTGTG ATG TCG CAA ATC ATG TAC AAC TAC	114
Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr	
1 5	

CCG GCG ATG TTG CGT CAC GCC GGG GAT ATG GUC GGA TAT GCC GGC ACG 162
 Pro Ala Met Ieu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr
 10 15 20

CTG CRG AGC TTG GGT GGC GAG ATC GGC CTG CRG CRG GCC GCG TTG CAG 210
 Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Lys Gln
 35 30 35 40

AGT GCG TGG CGC GGC GAT ACC GGG ATC ACG TAT CAG GCG TGG CAG GCA
 Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala
 45 50 55

CAG TGG AAC CGG GCC ATG GAA GAT TTG GTG CGG GCC TAT CAT GCG ATG 306
 Gln Trp Asn Glu Ala Met Glu Asp Ile Val Arg Ala Tyr His Ala Met
 60 65 70

TCC AGC ACC CNT GAA GCC AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCC CGC GAC ACC 354
 Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr
 75 80 85

GCC GAA GCC GCC AAA TGG CCC CGC TAG 381
 Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
 90 95

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 96 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly
1 5 10 15

Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile
20 25 30

Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly
35 40 45

Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp
50 55 60

Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr
65 70 75 80

Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
85 90 95

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor, não sendo parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Patentes de invenção citadas na descrição

- EP 0706571 A [0006] • US 4599231 A [0075]
- EP 0432203 A [0006] • US 4599230 A [0075]
- WO 97709428 A [0008] • US 4596792 A [0075]
- WO 9709429 A [0008] • US 4578770 A [0075]
- US 4554101 A [0030] • US 3791932 A [0084]
- WO 9418227 A [0034] • US 4174384 A [0084]
- US 4603102 A [0043] • US 3949064 A [0084]
- US 4608251 A [0075] • WO 9501441 A [0104]
- US 4601903 A [0075] • EP 0282242 A [0116]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- NIELSEN P E et al. Science, 1991, vol. 254, 1497-1500 [0029]
- ANDERSEN et al. J. Immunol., vol. 161, 29-39 [0063]
- ANDERSEN, P.; HERON, I. J. Immunol. Methods, 1993, vol. 161, 29-39 [0138]
- ANDERSEN, A. B. et al. Infect. Immun., 1992, vol. 60, 2317-2323 [0138]
- ANDERSEN P. Infect. Immun., 1994, vol. 62, 2536-44 [0138]

- ANDERSEN P. et al. J. Immunol., 1995, vol. 154, 3359-72 [0138]
 - BARKHOLT, V.; JENSEN, A. L. Anal. Biochem., 1989, vol. 177, 318-322 [0138]
 - BORODOVSKY, M.; J. MCININCH. Computers Chem., 1993, vol. 17, 123-133 [0138]
 - VAN DYKE M. W. et al. Gene, 1992, 99-104 [0138]
 - GOSSELIN et al. J. Immunol., 1992, vol. 149, 3477-3481 [0138]
 - HARBOE, M. et al. Infect. Immun., 1996, vol. 64, 16-22 [0138]
 - VON HEIJNE, G. J. Mol. Biol., 1984, vol. 173, 243-251 [0138]
 - HOCHSTRASSER, D.F. et al. Anal.Biochem., 1988, vol. 173, 424-435 [0138]
 - KÖHLER, G. ; MILSTEIN, C. Nature, 1975, vol. 256, 495-497 [0138]
 - LI, H. et al. Infect. Immun., 1993, vol. 61, 1730-1734 [0138]
 - LINDBLAD E.B. et al. Infect. Immun., 1997, vol. 65, 623-629 [0138]
 - MAHAIRAS, G. G. et al. J. Bacteriol., 1996, vol. 178, 1274-1282 [0138]
 - Molecular cloning: a laboratory manual. MANIATIS T. et al. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, 1989 [0138]
 - NAGAI, S. et al. Infect. Immun., 1991, vol. 59, 372-382 [0138]
 - OETTINGER, T. ; ANDERSEN, Å. B. Infect. Immun., 1994, vol. 62, 2058-2064 [0138]
 - OHARA, N. et al. Scand. J. immunol., 1995, vol. 41, 233-442 [0138]

- PAL P. G.; HORWITZ M. A. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, 4781-92 [0138]
- PEARSON, W. R. ; LIPMAN D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0138]
- PLOUG, M. et al. *Anal. Biochem.*, 1989, vol. 181, 33-39 [0138]
- PORATH, J. et al. *FEBS Lett.*, 1985, vol. 185, 306-310 [0138]
- ROBERTS, A.D. et al. *Immunol.*, 1995, vol. 85, 502-508 [0138]
- SØRENSEN, A.L. et al. *Infect. Immun.*, 1995, vol. 63, 1710-1717 [0138]
- THEISEN, M. et al. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1995, vol. 2, 30-34 [0138]
- VALDÉS-STAUBER, N.; SCHERER, S. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, 3809-3814 [0138]
- VALDÉS-STAUBER, N.; SCHERER, S. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, 1283-1286 [0138]
- WILLIAMS, N. *Science*, 1996, vol. 272, 27 [0138]
- YOUNG, R. A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, vol. 82, 2583-2587 [0138]

REIVINDICAÇÕES

1. Preparação de um fragmento polipeptídico que
 - a) comprehende uma sequência de aminoácidos, tal como ilustrada em SEQ ID NO: 2,
 - b) comprehende uma sub-sequência do fragmento polipeptídico definido em a) que tem um comprimento pelo menos de 12 resíduos de aminoácidos, sendo esta subsequência imunologicamente equivalente ao polipeptídeo definido em a) no que se refere à capacidade de desencadear uma resposta imunitária protectora contra infecções com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou no que se refere à capacidade de desencadear uma resposta imunitária significativa, indicadora de sensibilização anterior ou em curso com抗énios obtidos a partir de micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou
 - c) comprehende uma sequência de aminoácidos com uma identidade de sequência pelo menos de 80% em relação ao polipeptídeo definido em a) ou à sequência definida em b), sendo e ao mesmo tempo imunologicamente equivalente ao polipeptídeo definido em a) no que se refere à capacidade de provocar uma resposta imunitária protectora contra as infecções com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou no que se refere à capacidade de desencadear uma resposta imunitária significativa, indicadora de sensibilização anterior ou em curso com抗énios obtidos a partir de micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*,
- em que a referida preparação contém no máximo 5% em peso de outro material polipeptídico com o qual o fragmento polipeptídico está originalmente associado, desde que, no caso de ser constituído pela sequência de aminoácidos 1 a

96 da SEQ ID NO: 2, então o fragmento polipeptídico esteja isento de qualquer outro antigénio de bactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*.

2. Preparação de acordo com a reivindicação 1, em que o referido fragmento polipeptídico compreende um epítopo para uma célula T auxiliadora.
3. Preparação de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, a qual
 - 1) induz uma libertação de IFN-γ a partir de linfócitos T com memória amplificada, recolhidos de um murganho ao fim de 2 semanas após a infecção primária ou ao fim de 4 dias após depois de o murganho ter sido novamente infectado com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*, em que a indução é efectuada por adição do polipeptídeo a uma suspensão com cerca de 200.000 esplenócitos por mL, da qual resulta uma concentração de 1 a 4 µg de polipeptídeo por mL de suspensão, sendo a libertação de IFN-γ avaliável por determinação do IFN-γ no sobrenadante colhido ao fim de 2 dias após a adição do polipeptídeo à suspensão, e/ou
 - 2) induz uma libertação de IFN-γ, que está pelo menos 300 pg/mL acima do nível de referência, que é de cerca de 1.000.000 de CMSP (células mononucleares de sangue periférico) humanas por cada mL, isolado a partir de pacientes com TB na primeira fase de infecção ou de dadores saudáveis vacinados com BCG ou de indivíduos saudáveis que estiveram em contacto com pacientes com TB, em que a indução é efectuada por adição do polipeptídeo a uma suspensão com cerca de 1.000.000 células de CMSP por mL, da qual resulta uma concentração de 1 a 4 µg de polipeptídeo por cada mL de suspensão, sendo a libertação

de IFN- γ avaliável por determinação do IFN- γ no sobrenadante colhido ao fim de 2 dias após a adição do polipeptídeo à suspensão, e/ou

3) induz uma libertação de IFN- γ a partir de CMSP de bovino, provenientes de animais previamente sensibilizados com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*, em que a referida libertação é pelo menos o dobro da libertação observada a partir de CMSP de bovino provenientes de animais que não foram previamente sensibilizados com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*.

4. Preparação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o fragmento polipeptídico está isento de qualquer outro抗igénio de bactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*.
5. Preparação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o fragmento polipeptídico está isento de qualquer sequência de sinal.
6. Preparação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a identidade da sequência em relação ao polipeptídeo apresentado em SEQ ID NO: 2 ou às subsequências do referido polipeptídeo, pelo menos com 12 resíduos de aminoácidos, é pelo menos de 85%, pelo menos de 90%, pelo menos de 91%, pelo menos de 92%, pelo menos de 93%, pelo menos de 94%, pelo menos de 95%, pelo menos de 96%, pelo menos de 97%, pelo menos de 98%, pelo menos de 99% e pelo menos de 99,5%.
7. Preparação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o fragmento polipeptídico é lipidado

para assim permitir um efeito auto-adjuvante do polipeptídeo.

8. Polipeptídeo de fusão que compreende pelo menos um fragmento polipeptídico tal como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores e pelo menos um parceiro de fusão.
9. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 8, em que o parceiro de fusão é seleccionado entre o conjunto constituído por um fragmento polipeptídico tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e qualquer outro fragmento polipeptídico obtido a partir de uma bactéria de complexo de *tuberculosis*.
10. Preparação de um fragmento polipeptídico de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9, utilizável como produto farmacêutico, em que a referida preparação contém 5% em peso, no máximo, de outro material polipeptídico com o qual o fragmento polipeptídico está originalmente associado.
11. Utilização de uma preparação de um fragmento polipeptídico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 para a preparação de uma composição farmacêutica para o diagnóstico de tuberculose provocada por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* ou *Mycobacterium bovis* ou para a vacinação contra o mesmo, em que a referida preparação contém 5% em peso, no máximo, de outro material polipeptídico com o qual o fragmento polipeptídico está originalmente associado.

12. Fragmento de ácido nucleico isolado, o qual comprehende uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptído tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 ou comprehende uma sequência de ácido nucleico que lhe é complementar.
13. Fragmento de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 12, o qual é um fragmento de ADN.
14. Vacina que comprehende um fragmento de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, em que a vacina realiza a expressão *in vivo* do antigénio num animal, incluindo um ser humano, a quem se administrou a vacina, sendo a quantidade de antigénio expresso eficaz para conferir uma resistência substancialmente mais elevada a infecções com micobactérias do complexo de *tuberculosis* num animal, incluindo um ser humano.
15. Fragmento de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 12 ou 13, utilizável como produto farmacêutico.
16. Utilização de um fragmento de ácido nucleico de acordo com uma das reivindicações 12 ou 13 para a preparação de uma composição farmacêutica para o diagnóstico de tuberculose provocada por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* ou *Mycobacterium bovis* ou para vacinação contra a mesma.
17. Composição imunológica, que comprehende um fragmento polipeptídico tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

18. Composição imunológica de acordo com a reivindicação 17, que compreende ainda um transportador, um veículo ou um adjuvante aceitável sob os pontos de vista imunológico e farmacêutico.
19. Composição imunológica de acordo com a reivindicação 18, em que o transportador é seleccionado entre o conjunto constituído um polímero, ao qual o(s) polipeptido(s) está/estão ligados por interacção hidrofóbica não covalente, tal como um plástico, v.g., poliestireno, ou um polímero ao qual o(s) polipeptido(s) está/estão ligados de um modo covalente, tal como um polissacárido ou um polipeptido, v.g., albumina do soro de bovino, ovalbumina ou hemocianina de *diodora apertura*, o veículo é seleccionado entre o conjunto constituído por um diluente e um agente de suspensão e o adjuvante é seleccionado entre o conjunto constituído por brometo de dimetildioctadecilamónio (DDA) Quil A, poli I:C, adjuvante incompleto de Freund, IFN- γ , IL-2, IL-12, lípido A monofosforilado (MPL) e dipéptido muramílico (MDP).
20. Composição imunológica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, a qual compreende pelo menos dois fragmentos polipeptídicos diferentes, sendo cada um dos fragmentos polipeptídicos diferente um fragmento polipeptídico tal como definido nas reivindicações 1 a 9.
21. Composição imunológica de acordo com a reivindicação 20, a qual compreende 3 a 20 fragmentos polipeptídicos diferentes, sendo cada um dos fragmentos polipeptídicos diferentes tal definido nas reivindicações 1 a 9.

22. Composição imunológica de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 19, sob a forma de uma vacina.
23. Composição imunológica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 21, sob a forma de reagente para teste dérmico.
24. Vacina para imunizar um animal, incluindo um ser humano, contra a tuberculose provocada pelas micobactérias do complexo de *tuberculosis*, a qual compreende um microrganismo não patogénico enquanto componente eficaz, em que se incorporou pelo menos uma cópia de um fragmento de ADN, que contém uma sequência de ADN codificadora de um fragmento polipeptídico tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, no genoma do microrganismo, de tal forma que permita ao microrganismo expressar e facultativamente segregar o polipeptídeo.
25. Vacina de acordo com a reivindicação 24, em que o microrganismo é uma bactéria.
26. Vacina de acordo com a reivindicação 25, em que a bactéria é seleccionada entre o conjunto constituído pelos géneros *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Escherichia*.
27. Vacina de acordo com a reivindicação 26, em que o microrganismo é *Mycobacterium bovis* BCG, tal como *Mycobacterium bovis* BCG da estirpe Danish 1331.
28. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 27, em que se incorpora pelo menos 2 cópias de um fragmento de ADN, que codifica um polipeptídeo de acordo

com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, no genoma do microrganismo.

29. Vacina de acordo com a reivindicação 28, em que o número de cópias é pelo menos de 5.

30. Vector de expressão replicável, que comprehende um fragmento de ácido nucleico de acordo com uma das reivindicações 12 ou 13.

31. Vector de acordo com a reivindicação 30, o qual é seleccionado entre o conjunto constituído por um vírus, um bacteriófago, um plasmídeo, um cosmídeo e um microcromossoma.

32. Célula transformada que abriga pelo menos um vector de acordo com uma das reivindicações 30 ou 31.

33. Célula transformada de acordo com a reivindicação 32, a qual que é uma bactéria pertencente ao complexo de *tuberculosis*, tal como uma célula de *M. tuberculosis bovis* BCG.

34. Célula transformada de acordo com uma das reivindicações 32 ou 33, a qual expressa um fragmento polipeptídico tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

35. Método para a preparação de um fragmento polipeptídico tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, o qual consiste em

inserir um fragmento de ácido nucleico de acordo com uma das reivindicações 12 ou 13 num vector que é capaz de se replicar numa célula hospedeira, introduzir o vector

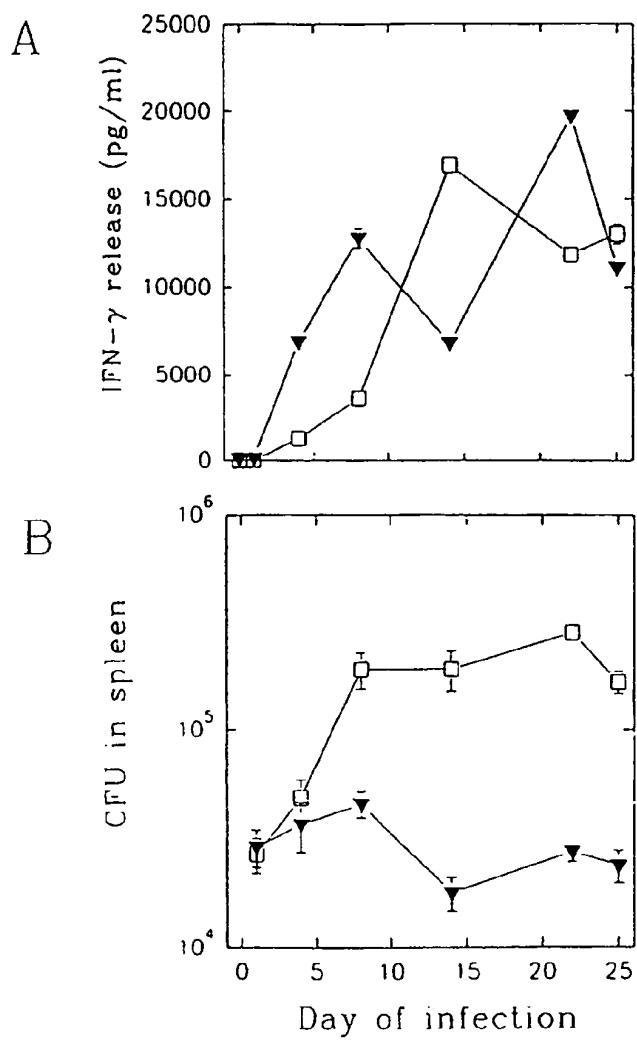
recombinante resultante na célula hospedeira, criar a célula hospedeira em meio de cultura, sob condições suficientes para efectuar a expressão do polipeptido, e recuperar o polipeptido a partir da célula hospedeira ou do meio de cultura ou
isolar o polipeptido a partir de um filtrado de cultura de curto prazo, tal como definido na reivindicação 1, ou isolar o polipeptido a partir da micobactéria integral do complexo de *tuberculosis*, ou de seus lisados ou suas fracções, v.g., fracções que contenham paredes celulares, ou
sintetizar o polipeptido por síntese peptídica em fase sólida ou líquida.

36. Método para a preparação de uma composição imunológica de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 21, o qual consiste em
preparar, sintetizar ou isolar um fragmento polipeptídico, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, e solubilizar ou dispersar o polipeptido num meio para vacina e
adicionar facultativamente outros抗igénios de *M. tuberculosis* e/ou um transportador, um veículo e/ou um adjuvante ou
criar em cultura uma célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 34, transferir as células para um meio para vacina e adicionar facultativamente um transportador, um veículo e/ou um adjuvante.
37. Método *in vitro* para o diagnóstico de sensibilização em curso ou anterior, num animal ou ser humano, com bactérias do complexo de *tuberculosis*, em que tal método consiste em fazer contactar uma amostra sanguínea do

animal com o fragmento polipeptídico tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a ocorrência de uma libertação significativa pelo menos de uma citoquina para a fase extracelular, a partir de células mononucleares na amostra de sangue, é indicativa da sensibilização do animal.

38. Composição para o diagnóstico de tuberculose num animal, incluindo um ser humano, a qual compreende um fragmento polipeptídico, tal como definido nas reivindicações 1 a 9, ou um fragmento de ácido nucleico de acordo com uma das reivindicações 12 ou 13, facultativamente em combinação com um meio de detecção.
39. Anticorpo monoclonal ou policlonal que reage de forma específica com um fragmento polipeptídico num imunoensaio ou um fragmento de ligação específico do referido anticorpo, em que o referido fragmento polipeptídico é seleccionado entre:
 - a) uma sequência de aminoácidos, tal como ilustrada na SEQ ID NO: 2,
 - b) uma sub-sequência do fragmento polipeptídico definido em a), que tem um comprimento pelo menos de 12 resíduos de aminoácidos, sendo esta subsequência imunologicamente equivalente ao polipeptídeo definido em a) no que se refere à capacidade de provocar uma resposta imunitária protectora contra as infecções com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou no que se refere à capacidade para desencadear uma resposta imunitária significativa em termos de diagnóstico que seja indicadora de sensibilização, anterior ou em curso, com抗ígenos obtidos a partir de micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou

c) uma sequência de aminoácidos com uma identidade de sequência pelo menos de 80% em relação ao polipeptido definido em a) ou à sequência definida em b), e que ao mesmo tempo é imunologicamente equivalente ao polipeptido definido em a) no que se refere à capacidade de provocar uma resposta imunitária protectora contra infecções com micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis* ou no que se refere à capacidade para desencadear uma resposta imunitária significativa em termos de diagnóstico que seja indicadora de sensibilização, anterior ou em curso, com抗ígenos obtidos a partir de micobactérias pertencentes ao complexo de *tuberculosis*.



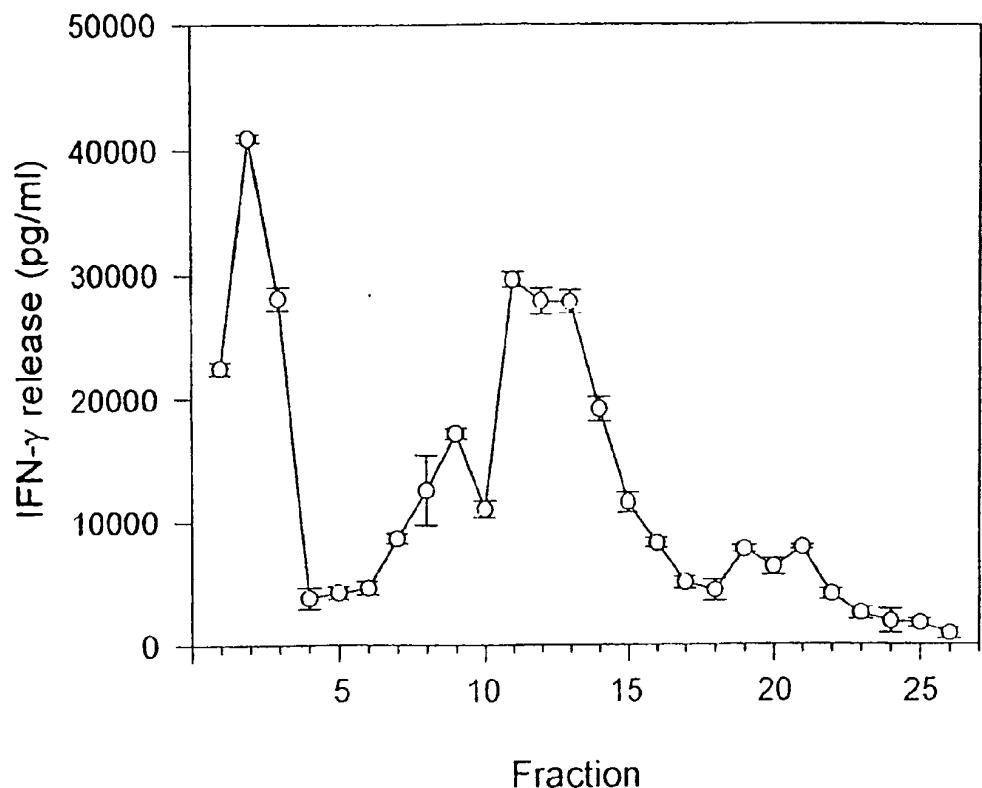
IFN- γ release - Liberação de IFN- γ

CFU in spleen - CFU no baço

Day of infection - dia da infecção

FIG. 1

2/3



IFN- γ release - Liberação de IFN- γ

Fraction - fracção

FIG. 2

1	GGCCGCCGGT ACCTATGTGG CGCCCGATGC TCGGGNCGCG TCGAC <u>TATA</u> CGGGTTCTG -35 region	60 -10 region
61	ATCGAAC CCT GCTGACC GAG AGGACTTG TG ATG TCG CAA ATC ATG TAC AAC TAC CCC GCG Shine Delgarno M S Q I M Y N Y P A	120
121	ATG TTG GGT CAC GCC GGG GAT ATG GCC GGA TAT GCC GGC ACG CTG CAG AGC TTG GGT GCC M L G H A G D M A G Y A G T L Q S L G A	180
181	GAG ATC GCC GTG GAG CAG CCC GCG TTG CAG AGT GCG TGG CAG CGC GAT ACC GGG ATC ACG E I A V E Q A A L Q S A W Q G D T G I T	240
241	TAT CAG GCG TGG CAG GCA CAG TGG AAC CAG GCC ATG GAA GAT TTG GTG CGG GCC TAT CAT Y Q A W Q A Q W N Q A M E D L V R Y H A	300
301	GCG ATG TCC AGC ACC CAT GAA GCC AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCC CGC GAC ACC GCC GAA Y M S S T H E A N T M A M M A R D T A E	360
361	GCC GCC AAA TGG GGC GGC TAG A A K W G G *	381

FIG. 3