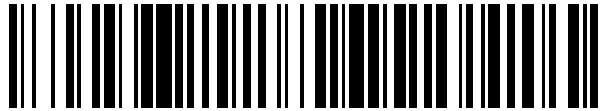


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 470**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2005 E 05729257 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1735623**

54 Título: **Ensayo de diagnóstico de infección por Mycobacterium tuberculosis**

30 Prioridad:

19.03.2004 GB 0406271

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.01.2014

73 Titular/es:

**LALVANI, AJIT (100.0%)
39 Lonsdale Road
Oxford, OX2 7ES, GB**

72 Inventor/es:

LALVANI, AJIT

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 440 470 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo de diagnóstico de infección por *Mycobacterium tuberculosis*

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para aumentar la sensibilidad de un ensayo de diagnóstico para infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un ser humano.

10 **Antecedentes de la invención**

El diagnóstico preciso de infección por tuberculosis es esencial para el tratamiento, prevención y control de esta enfermedad resurgente. Como a menudo es difícil cultivar *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) de pacientes con TB activa, e imposible cultivarla de personas sanas infectadas de forma latente, sería muy útil un ensayo de diagnóstico de base inmune que indique la presencia o ausencia de infección por MTB para el diagnóstico de TB activa y exploración de infección latente por MTB.

El único ensayo ampliamente usado es el ensayo cutáneo de tuberculina (TST) de un siglo de antigüedad o el ensayo de Mantoux que se basa en la detección de una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) contra una administración intradérmica de un Derivado de Proteína Purificada de la micobacteria. Este ensayo tiene muchos inconvenientes entre estos el principal es su mala especificidad resultante de la amplia reactividad cruzada antigénica del derivado de proteína purificada (PPD), una mezcla en bruto de más de doscientas proteínas de MTB ampliamente compartidas entre MTB, el bacilo de *Calmette-Guerin* (BCG) de *M. bovis* y la mayoría de las micobacterias del entorno. Por tanto, son habituales resultados falsos positivos en personas con exposición a micobacterias del entorno y vacunación previa con BCG. Esto presenta un problema significativo porque la mayoría de la población mundial está vacunada con BCG y el efecto confuso de BCG persiste durante hasta 15 años después de la vacunación.

La genómica comparativa ha identificado varias regiones genéticas en MTB y *M. bovis* que se delecionan en BCG de *M. bovis*. Se han identificado varias regiones de diferencia, denominadas RD1 - RD16, entre MTB o *M. bovis* y BCG. Todas representan partes del genoma de *M. bovis* delecionadas durante cultivo prolongado *in vitro*. RD1 se delecionó antes de 1921, cuando se diseminó por primera vez BCG de forma internacional para su uso como vacuna. RD1 por tanto está ausente de todas las cepas de vacuna de BCG, así como la mayoría de las micobacterias del entorno, pero aún está presente en el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo todos los aislados clínicos de MTB y *M. bovis*. Existen nueve fases de lectura abierta (ORF) en la región génica RD1. La diana antigénica secretora temprana-6 (ESAT-6) y la proteína de filtrado de cultivo 10 (CFP10) están codificadas en RD1 y se han investigado intensivamente en modelos animales y seres humanos durante los últimos años pasados. ESAT-6 y CFP10 son fuertes dianas de la respuesta inmune celular en modelos animales, pueden usarse pacientes de tuberculosis y contactos y similares en nuevos ensayos sanguíneos basados en células T específicos que no reaccionan de forma cruzada con BCG.

Las respuestas inmunes celulares contra los productos génicos de RD1, RD2 y RD14 se han investigado recientemente en ganado bovino infectado con *M. bovis* y vacunado con BCG. Ocho antígenos parecen ser potentes antígenos de células T, Rv1983, Rv1986, Rv3872, Rv3873, Rv3878, Rv3879c, Rv1979c, y Rv1769) (Cockle et al., 2002, Infect. Immun. 70:6996-7003).

Sin embargo, no es posible predecir en base a los antígenos que son antígenos de células T en ganado bovino cuáles serán los antígenos de células T en seres humanos. Así como otras diferencias en el procesamiento de antígenos, la presentación y el reconocimiento, el ganado bovino tiene diferentes moléculas MHC que los seres humanos, y por tanto se espera que reconozcan diferentes antígenos.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han identificado Rv3879c como antígeno principal de células T en seres humanos, respondiendo un 45% de los pacientes con tuberculosis a péptidos del producto génico de Rv3879. Solamente uno de 38 (2,6%) donantes vacunados con BCG respondió a péptidos de Rv3879c. La alta especificidad de los péptidos Rv3879c, junto con su moderada sensibilidad en pacientes con tuberculosis, identifica a estos péptidos como candidatos para su inclusión en nuevos ensayos basados en células T para infección por MTB.

De forma crucial, los inventores identificaron 3 individuos (de los 49 pacientes de TB confirmados por cultivo) que respondieron a péptidos Rv3879c y que no respondieron a ninguno de los 35 péptidos solapantes de 15 monómeros que abarcan la longitud de ESAT-6 y CFP10 (que se sabe que son antígenos MTB inmunodominantes de utilidad diagnóstica). Este resultado muestra que péptidos Rv3879c pueden usarse para aumentar la sensibilidad de diagnóstico que usen péptidos ESAT-6 y CFP10. Este aumento en la sensibilidad (que fue del 6% en el presente estudio de 49 pacientes con TB) es clínicamente muy importante. Una sensibilidad muy elevada permite a los doctores descartar la posibilidad de tuberculosis cuando un ensayo de diagnóstico es negativo. En particular, los

ensayos de diagnóstico de base inmune (incluyendo el ensayo cutáneo in vivo) pueden dar resultados falsos negativos en individuos inmunosuprimidos a causa de su limitada sensibilidad. Una mayor sensibilidad de diagnóstico permitirá a los doctores detectar de forma precisa infección por TB incluso en estos pacientes inmunosuprimidos vulnerables que están en mayor riesgo de tuberculosis severa y diseminada.

5 Por consiguiente, la invención proporciona un método para aumentar la sensibilidad de un ensayo de diagnóstico para diagnosticar infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un ser humano, donde dicho ensayo de diagnóstico comprende poner en contacto células T de dicho ser humano con un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* que no es Rv3879c y determinar si alguna de dichas células T reconoce dicho antígeno, comprendiendo adicionalmente dicho método:

(i) poner en contacto células T de dicho ser humano con uno o más de

15 (a) un péptido que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 o al menos un 80% de homología con la SEC ID N° 1;

(b) una combinación de péptidos que tienen o comprenden cada uno la secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1; o

20 (c) una combinación de péptidos que tiene cada uno al menos un 80% de homología con una secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N° 1; y

(ii) determinar si alguna de dichas células T reconoce dicho péptido, donde el método se realiza *in vitro*, y donde está presente una célula presentadora de antígeno (APC).

25 Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la proporción de pacientes con TB confirmada por cultivo (n=49) y vacunados con BCG sanos no expuestos (n=38) que responden en IFN- γ -ELISPOT contra combinaciones de péptidos de los cuatro productos génicos de la región RD. Se ensayaron las PBMC de cada participante usando el ensayo IFN- γ -ELISPOT con combinaciones de péptidos entre 5 y 7 péptidos que representan diferentes antígenos de RD1 (Rv3873, Rv3878, Rv3879c) y RD2 (Rv1989c).

35 A: Porcentaje de pacientes con TB confirmada por cultivo y vacunados con BCG no expuestos que respondían a cada combinación de péptidos en IFN- γ -ELISPOT.

B: Porcentaje de pacientes con TB confirmada por cultivo y vacunados con BCG no expuestos que respondieron a una o más combinaciones de péptidos de cada uno de los productos génicos RD1 y RD2. La columna más a la derecha muestra el porcentaje de donantes que respondieron a una o más de cualquiera de las 11 combinaciones de péptidos de los 4 antígenos. Las columnas rellenas muestran las tasas de respuesta en pacientes con TB, y las columnas sombreadas muestran las tasas de respuesta en donantes vacunados con BCG no expuestos.

45 La Figura 2 muestra magnitud de las respuestas en IFN- γ -ELISPOT a antígenos de la región RD en 49 pacientes con TB confirmada por cultivo (A) y 38 vacunados con BCG sanos no expuestos (B). Las frecuencias de células formadoras de manchas (SFC) que secretan IFN- γ específico de péptido se sumaron para cada una de las combinaciones de péptidos constituyentes para cada antígeno, se enumeraron por ensayo ELISPOT *ex vivo* en pacientes con TB (A), y donantes vacunados con BCG sanos no expuestos (B). Las barras horizontales representan la respuesta media para cada antígeno. Los puntos en la línea basal representan individuos sin respuesta a un antígeno dado (es decir, menos de 5 SFC por encima del control negativo para cada uno de los péptidos constituyentes de cada combinación del antígeno dado). La línea horizontal discontinua representa el punto de corte predefinido (5 SFC por $2,5 \times 10^5$ PBMC, que se traduce en un umbral de detección de 20 células T específicas de péptido por millón de PBMC).

55 La Figura 3 ilustra la localización y homología del motivo de la familia de proteínas PPE como se describe en (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuLIST/mast/P210.1.html>), dentro de la secuencia parcial de aminoácidos de Rv3873 (restos aminoácidos 100-160). Los restos aminoácidos se muestran en código de una letra. Los restos subrayados indican la secuencia peptídica dada. Los restos idénticos se indican con una cruz.

Descripción detallada de la invención

60 La invención se refiere al diagnóstico de infección por tuberculosis en un ser humano en base a la determinación de si las células T del ser humano reconocen un epítipo de Rv3879c (SEC ID N° 1). El método también comprende determinar si las células T del ser humano reconocen uno o más antígenos adicionales de células T de *Mycobacterium tuberculosis*, tales como antígenos codificados por la región RD1 o RD2 (preferiblemente ESAT-6 y/o CFP10). En una realización, el método comprende determinar si la célula T reconoce uno o más de los péptidos representados por las SEC ID N° 2 a 18.

5 El ser humano que se ensaya típicamente tiene una infección activa o latente por micobacterias, o ha tenido dicha infección recientemente. El ser humano puede dar un resultado positivo o negativo de ensayo en un ensayo de Mantoux. El ser humano puede estar en riesgo de una infección micobacteriana, típicamente por razones socioeconómicas o puede tener una predisposición genética o adquirida a infección por micobacterias.

10 El ser humano puede tener un contacto conocido o sospechoso que se ha expuesto a o puede haberse expuesto a *Mycobacterium tuberculosis*. Típicamente, la exposición es a tuberculosis pulmonar, tal como tuberculosis pulmonar "abierta" que es positiva a frotis A.F.B. (bacilo acidorresistente) de esputo. Por tanto, el método puede usarse para rastrear los contactos sanos de individuos con dichas infecciones de tuberculosis. El método también puede usarse para realizar estudios en la población para medir la cantidad de individuos en una población que tiene una infección por *Mycobacterium tuberculosis*. El contacto puede ser alguien cuya exposición es en el hogar, el lugar de trabajo (tal como un trabajador sanitario) o exposición en prisión (tal como un prisionero). La exposición puede haber resultado de residir en un país con alta prevalencia de TB, y haberse realizado un ensayo de diagnóstico después de emigrar a un país con una baja prevalencia de TB. Por tanto, el contacto puede ser un inmigrante.

20 El ser humano que se ensaya (que tiene una exposición conocida o sospechosa) puede estar sano o puede tener una afección crónica que le sitúe en un mayor riesgo de desarrollar TB activa y/o que pueda provocar una infección por TB más difícil de diagnosticar. Ejemplos incluyen individuos infectados por VIH, individuos que toman inmunosupresores (por ejemplo, corticosteroides, azatioprina y agentes anti-TNF- α , tales como infliximab, y terapia contra el cáncer), pacientes de hemodiálisis, receptores de trasplantes de órganos, diabéticos y niños muy pequeños (con edades por debajo de 5 años de edad, particularmente por debajo de 2 años de edad).

25 Las células T que reconocen el péptido en el método son generalmente células T que se han pre-sensibilizado *in vivo* contra un antígeno de una *M. tuberculosis*. Estas células T sensibilizadas al antígeno están generalmente presentes en la sangre periférica de un hospedador que se ha expuesto a la *M. tuberculosis* a una frecuencia de 1 en 10^6 a 1 en 10^3 células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células T pueden ser células T CD4 y/o CD8.

30 En el método, las células T se ponen en contacto con los péptidos *in vitro*, y la determinación de si las células T reconocen el péptido se hace *in vitro*.

35 La determinación de si las células T reconocen el péptido se hace generalmente detectando un cambio en el estado de las células T en presencia del péptido o determinando si las células T se unen al péptido (por ejemplo, usando un tetrámero MHC combinado con el sistema de análisis FACS), es decir, el método de la invención no depende necesariamente de la detección de una respuesta funcional de la célula T.

40 En el caso en que se detecte un cambio en el estado de las células T, esto generalmente está causado por una actividad funcional específica de antígeno de las células T después de que el receptor de células T se una al péptido. Generalmente, cuando se une el receptor de células T, el péptido se une a una molécula MHC clase I o II, que está típicamente presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC).

45 El cambio en el estado de la célula T puede ser el inicio de o puede aumentar la secreción de una sustancia de la célula T, tal como una citoquina, especialmente IFN- γ , IL-2 o TNF- α . La determinación de la secreción de IFN- γ es particularmente preferida. Puede usarse detección de citoquinas intracelulares por FACS. La sustancia puede detectarse típicamente dejando que se una a un agente de unión específico y después midiendo la presencia del complejo de agente de unión específica/sustancia. La detección de la sustancia puede realizarse usando un sistema basado en ELISA. El agente de unión específico es típicamente un anticuerpo, tal como anticuerpos policlonales o monoclonales. Están disponibles en el mercado anticuerpos contra citoquinas, o pueden prepararse usando técnicas convencionales.

50 Típicamente, el agente de unión específica se inmoviliza en un soporte sólido. Después de dejar que la sustancia se una al soporte sólido, puede lavarse opcionalmente para retirar el material que no se ha unido específicamente al agente. El complejo de agente/sustancia puede detectarse usando un segundo agente de unión que se unirá al complejo. Típicamente, el segundo agente se une a la sustancia en un sitio que es diferente del sitio que se une al primer agente. El segundo agentes es preferiblemente un anticuerpo y se marca directa o indirectamente con un marcador detectable.

60 Por tanto, el segundo agente puede detectarse por un tercer agente que típicamente se marca directa o indirectamente con un marcador detectable. Por ejemplo, el segundo agente puede comprender un resto de biotina, que permite la detección por un tercer agente que comprende un resto de estreptavidina y típicamente fosfatasa alcalina como marcador detectable.

65 En una realización, el sistema de detección que se usa es el ensayo *ex-vivo* ELISPOT descrito en el documento WO98/23960. En ese ensayo, IFN- γ secretada de la célula T se une por un primer anticuerpo específico para IFN- γ que se inmoviliza en un soporte sólido. El IFN- γ unido después se detecta usando un segundo anticuerpo específico

para IFN- γ que está marcado con un marcador detectable. Dicho anticuerpo marcado puede obtenerse de MABTECH (Estocolmo, Suecia). Otros marcadores detectables que pueden usarse se analizan a continuación.

5 El cambio en el estado de la célula T que puede medirse puede ser el aumento en la captación de sustancias por la célula T, tal como la captación de timidina. El cambio en el estado puede ser un aumento en el tamaño de las células T, o la proliferación de las células T, o un cambio en los marcadores de superficie celular en la célula T.

10 Generalmente, las células T que se ponen en contacto en el método se recogen del hospedador en una muestra sanguínea, aunque pueden usarse otros tipos de muestras que contienen células T. La muestra puede añadirse directamente al ensayo o puede procesarse primero. Típicamente, el procesamiento puede comprender diluir la muestra, por ejemplo con agua o tampón. Típicamente, la muestra se diluye de 1,5 a 100 veces, por ejemplo de 2 a 50 o de 5 a 10 veces.

15 El procesamiento puede comprender la separación de los componentes de la muestra. Típicamente, las células mononucleares (MC) se separan de las muestras. Las MC comprenderán las células T y las APC. Por tanto, en el método las APC presentes en las MC separadas pueden presentar el péptido a las células T. Las PBMC, las MC y las células T pueden separarse de la muestra usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Lalvani et al (1997) J.Exp. Med. 186, pág. 859-865.

20 Preferiblemente, las células T usadas en el ensayo están en forma de muestras no procesadas o diluidas, o son células T recién aisladas (tales como en forma de MC o PBMC recién aisladas) que se usan directamente *ex vivo*, es decir, no se cultivan antes de usarse en el método. Sin embargo, las células T pueden cultivarse antes de su uso, por ejemplo en presencia de uno o más de los péptidos, y generalmente también citoquinas exógenas promotoras del crecimiento. Durante el cultivo, los péptidos típicamente se presentan en la superficie de las APC, tal como la APC usada en el método. El pre-cultivo de las células T puede conducir a un aumento en la sensibilidad del método. Por tanto, las células T pueden convertirse en líneas celulares, tales como líneas celulares a corto plazo (por ejemplo, como se describe en Ota et al (1990) Nature 346, pág. 183.187).

30 La APC que está típicamente presente en el método puede ser del mismo hospedador que la célula T o de un hospedador diferente. La APC puede ser una APC de origen natural o una APC artificial. La APC es una célula que es capaz de presentar el péptido a una célula T. Es típicamente una célula B, célula dendrítica o macrófago. Típicamente se separa de la misma muestra que la célula T y típicamente se co-purifica con la célula T. Por tanto, la APC puede estar presente en MC o PBMC. La APC es típicamente una célula *ex vivo* recién aislada o una célula cultivada. Puede estar en forma de una línea celular como una línea celular a corto plazo o inmortalizada. La APC puede expresar moléculas MHC clase II vacías en su superficie.

40 Típicamente en el método, las células T derivadas de la muestra pueden colocarse en un ensayo con todos los péptidos (es decir, una combinación de los péptidos) que se pretenden ensayar (el panel relevante) o las células T pueden dividirse y colocarse en ensayos diferentes cada uno de los cuales contiene uno o más de los péptidos.

La invención también proporciona los péptidos tales como dos o más de cualquiera de los péptidos mencionados en este documento (por ejemplo en cualquiera de las combinaciones mencionadas en este documento) para uso simultáneo, separado o secuencial.

45 En una realización, el péptido *per se* se añade directamente a un ensayo que comprende células T y APC. Como se ha analizado anteriormente, las células T y las APC en dicho ensayo podrían estar en forma de MC.

50 En una realización, el péptido se proporciona a la APC en presencia de la célula T. La APC después se proporciona a la célula T, típicamente después de dejar que presente el péptido en su superficie. El péptido puede haberse captado en el interior de la APC y haberse presentado, o simplemente haberse captado en la superficie sin entrar dentro de la APC.

55 La duración para que el péptido entre en contacto con las células T variará dependiendo del método usado para determinar el reconocimiento del péptido. Típicamente se añaden de 10^5 a 10^7 , preferiblemente de 5×10^5 a 10^6 PBMC a cada ensayo. En el caso en que el péptido se añade directamente al ensayo su concentración es de 10^{-1} a 10^3 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente de 0,5 a 50 $\mu\text{g/ml}$ o de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

60 Típicamente, la cantidad de tiempo para que las células T se incuben con el péptido es de 4 a 24 horas (preferiblemente de 6 a 16 horas) para células T efectoras o durante más de 24 horas para células centrales de memoria. Cuando se usan PBMC *ex vivo* se ha descubierto que pueden incubarse $0,3 \times 10^6$ PBMC en 10 $\mu\text{g/ml}$ de péptido durante 12 horas a 37°C.

65 El método puede basarse en un método ELISA, tal como el sistema Quantiferon de sangre completa y sus modificaciones (por ejemplo, como el disponible de Cellestis).

La determinación del reconocimiento del péptido por las células T puede hacerse midiendo la unión del péptido a las

células T. Típicamente las células T que se unen al péptido pueden clasificarse en base a esta unión por ejemplo usando una máquina FACS. Se considerará que existe la presencia de células T que reconocen el péptido si la frecuencia de células clasificadas usando el péptido está por encima de un valor de "control". La frecuencia de células T sensibilizadas al antígeno es generalmente de 1 en 10^6 a 1 en 10^3 , y por lo tanto puede determinarse si las células clasificadas son células T sensibilizadas al antígeno o no.

El péptido capaz de unirse a un receptor de célula T que reconoce un péptido que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 o cualquier otro péptido a ensayar (es decir, análogos del péptido) puede identificarse por cualquier método adecuado. La unión del péptido a dichos receptores de células T puede ensayarse por técnicas convencionales. Por ejemplo, los receptores de células T pueden aislarse de células T que han demostrado reconocer el péptido que tiene una secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 (por ejemplo, usando el método de la invención). La demostración de la unión del péptido a los receptores de células T después puede demostrarse determinando si los receptores de células T inhiben la unión del péptido a una sustancia que se une al péptido, por ejemplo, un anticuerpo contra el péptido. Típicamente, el péptido se une en una molécula MHC en dicha inhibición de ensayo de unión.

Típicamente, el análogo inhibe la unión del péptido a un receptor de célula T. en este caso, la cantidad de péptido que puede unirse al receptor de célula T en presencia del análogo está disminuida. Esto es porque el análogo es capaz de unirse al receptor de célula T y por lo tanto compete con el péptido por la unión al receptor de célula T.

Las células para su uso en los experimentos de unión anteriores pueden aislarse de pacientes con infección micobacteriana, por ejemplo, con la ayuda del método de la invención.

El análogo puede tener homología con el péptido original equivalente representado por una de las SEC ID N° o una secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N° 1. Un péptido que es homólogo a otro péptido es típicamente al menos un 70% homólogo al péptido. En la presente invención el péptido es al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%, y más preferiblemente al menos un 95%, 97% o 99% homólogo al mismo, sobre una región de al menos 8, al menos 15, preferiblemente al menos 30, por ejemplo al menos 40, 60 ó 100 o más aminoácidos contiguos. Los métodos para medir la homología de proteínas son bien conocidos en la técnica y los especialistas en la técnica entenderán que en el presente contexto, la homología se calcula en base a la identidad de aminoácidos (a veces mencionada como "homología fuerte"). Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo usado en sus ajustes por defecto) (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, pág. 387-395).

Típicamente, los aminoácidos en el análogo en las posiciones equivalentes a los aminoácidos en el péptido original que contribuyen a la unión con la molécula MHC o son responsables del reconocimiento por el receptor de célula T, son los mismos o están conservados.

Típicamente, el análogo comprende una o más modificaciones, que pueden ser modificaciones post-traduccionales naturales o modificaciones artificiales. La modificación puede proporcionar un resto químico (típicamente por sustitución de un hidrógeno, por ejemplo de un enlace C-H), tal como un grupo amino, acetilo, hidroxilo o alógeno (por ejemplo, flúor) o grupo carbohidrato. Típicamente, la modificación está presente en el extremo N o C terminal.

El péptido puede comprender uno o más aminoácidos no naturales, por ejemplo aminoácidos con una cadena lateral diferente de los aminoácidos naturales. Generalmente, el aminoácido no natural tendrá un extremo N terminal y/o C terminal. El aminoácido no natural puede ser un L-aminoácido.

El péptido típicamente tiene una forma, tamaño, flexibilidad o configuración electrónica que es sustancialmente similar al péptido original. Típicamente es un derivado del péptido original.

En una realización, el péptido es o imita al péptido original unido a una molécula MHC clase II. El análogo puede ser o puede imitar al péptido original unido a 2, 3, 4 o más moléculas MHC clase II asociadas o unidas entre sí. Estas moléculas MHC pueden unirse juntas usando un sistema basado en biotina/estreptavidina, en que típicamente 2, 3 ó 4 moléculas MHC marcadas con biotina se unen a un resto de estreptavidina. Este péptido típicamente inhibe la unión del complejo de péptido/MHC clase II a un receptor de célula T o anticuerpo que es específico para el complejo. El análogo puede ser un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo, tal como un fragmento Fab o (Fab)₂.

El péptido puede estar inmovilizado en un soporte sólido.

El péptido típicamente se diseña por medios informáticos y después se sintetiza usando métodos conocidos en la técnica. Como alternativa, puede seleccionarse de una biblioteca de compuestos. La biblioteca puede ser una biblioteca combinatoria o una biblioteca de presentación, tal como una biblioteca de presentación en fagos. La biblioteca de compuestos puede expresarse en la biblioteca de presentación en forma unida a una molécula MHC clase II, tal como la molécula MHC a la que se une el péptido original. Los péptidos generalmente se seleccionan de la biblioteca en base a su capacidad de imitar las características de unión de los péptidos originales. Por tanto, pueden seleccionarse en base a la capacidad de unirse a un receptor de célula T o anticuerpo que reconoce el

péptido original.

En este documento también se describe un polinucleótido que es capaz de expresar uno o más péptidos para su uso en la invención. Típicamente, el polinucleótido es ADN o ARN, y es mono o bicatenario. El polinucleótido, por lo tanto, típicamente comprende la secuencia que codifica la secuencia de la SEC ID N° 1 o un fragmento de la misma.

En posición 5' y/o 3' a la secuencia que codifica el péptido, el polinucleótido tiene una secuencia codificante o no codificante. La secuencia 5' y/o 3' a la secuencia codificante puede comprender secuencias que ayudan a la expresión, tal como la transcripción y/o traducción, de la secuencia que codifica el péptido. El polinucleótido puede ser capaz de expresar el péptido en una célula procariota o eucariota. De forma adecuada, el polinucleótido es capaz de expresar el péptido en una célula de mamífero, tal como una célula humana, de primate o roedor.

El polinucleótido puede incorporarse en un vector replicable. Dicho vector es capaz de replicarse en una célula adecuada. El vector puede ser un vector de expresión. En dicho vector, el polinucleótido está unido de forma funcional a una secuencia de control que es capaz de posibilitar la expresión del polinucleótido. El vector puede contener un marcador de selección, tal como el gen de resistencia a ampicilina.

El polinucleótido, los péptidos para su uso en la invención o los agentes usados en el método (por ejemplo en la detección de sustancias secretadas por células T) pueden portar un marcador detectable. Se prefieren marcadores detectables que permiten la detección de la sustancia secretada por inspección visual, opcionalmente con la ayuda de un medio de aumento óptico. Dicho sistema típicamente se basa en un marcador enzimático que causa cambio de color en un sustrato, por ejemplo fosfatasa alcalina que causa un cambio de color en un sustrato. Dichos sustratos están disponibles en el mercado, por ejemplo en BioRad. Otros marcadores adecuados incluyen otras enzimas tales como peroxidasa, o marcadores proteicos, tales como biotina; o radioisótopos, tales como ³²P o ³⁵S. Los marcadores anteriores pueden detectarse usando técnicas conocidas.

Los polinucleótidos capaces de expresar péptidos para su uso en la invención o los péptidos para su uso en la invención pueden estar en forma sustancialmente purificada. Pueden estar en forma sustancialmente aislada, en cuyo caso generalmente comprenderán al menos un 90%, por ejemplo al menos un 95, 97 ó 99% del polinucleótido, péptido o anticuerpo en la preparación. Los péptidos sustancialmente aislados generalmente comprenden al menos un 90%, tal como por ejemplo al menos un 95, 97 ó 99% de la masa en seco de la preparación. El polinucleótido o péptido típicamente está sustancialmente libre de otros componentes celulares o sustancialmente libre de otros componentes celulares micobacterianos. El polinucleótido o péptido puede usarse en dicha forma sustancialmente aislada, purificada o libre en el método.

El péptido para su uso en la invención puede prepararse usando técnicas convencionales de química sintética, tal como mediante el uso de un sintetizador automatizado.

El péptido típicamente se prepara a partir de un polipéptido más largo, por ejemplo, una proteína de fusión, comprendiendo dicho polipéptido típicamente la secuencia del péptido. El péptido puede obtenerse del polipéptido por, por ejemplo, hidrólisis del polipéptido, tal como usando una proteasa; o por rotura física del polipéptido. El polipéptido típicamente tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 y puede haberse expresado de forma recombinante.

El péptido también puede prepararse en un proceso que comprende la expresión de un polinucleótido, tal como por expresión del polinucleótido descrito en este documento. El polipéptido expresado puede procesarse adicionalmente para producir el péptido para su uso en la invención. Por tanto, el péptido puede prepararse en un proceso que comprende cultivar una célula transformada o transfectada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en condiciones para posibilitar la expresión del péptido o un polipéptido a partir del cual puede prepararse el péptido. El polinucleótido puede prepararse usando técnicas convencionales, tal como mediante el uso de un sintetizador.

La invención se ilustra mediante los siguientes Ejemplos:

Ejemplo 1

Participantes en el estudio

Todos los participantes se reclutaron de forma prospectiva en Londres y Oxford durante un periodo de 14 meses desde junio de 2002 hasta julio de 2003. La aprobación ética para el estudio la concedieron los comités éticos de investigación de Harrow y Oxford Central. Los diagnósticos de los 49 pacientes con TB se confirmaron de forma bacteriológica con cultivos positivos para MTB de una o más muestras clínicas. Los pacientes estaban sin tratar o habían recibido menos de 2 semanas de terapia en el momento de la venopunción para el ensayo ELISPOT. Los participantes de control fueron personal sano de laboratorio vacuna con BCG de regiones con una baja prevalencia de TB y sin exposición conocida a MTB. Todos tenían un ensayo de resultado negativo reciente por IFN- γ -ELISPOT

usando 38 péptidos solapantes de 15 monómeros que abarcan la longitud de ESAT-6 y CFP10, como se ha descrito previamente (Lalvani et al. 1997, J. Exp. Med. 186:859-865).

5 Los datos epidemiológicos respecto al lugar de nacimiento, cualquier periodo de residencia en regiones de mayor prevalencia y ausencia de contacto con TB se recogieron de estos voluntarios en el momento de la venopunción. No se reclutaron trabajadores sanitarios debido al riesgo laboral de exposición a TB.

Péptidos

10 Se diseñaron y adquirieron (Research Genetics, Huntsville, AL, EEUU) sesenta y siete péptidos sintéticos que abarcan regiones seleccionadas de cuatro fases de lectura abierta (ORF). Los péptidos se seleccionaron entre aquellos usados en (Cockle et al. 2002 Infect. Immunol. 70: 6996-7003). Los péptidos Rv3879c son péptidos de 15 monómeros que solapan en 10 aminoácidos que representan 95 de los 729 aminoácidos de la secuencia primaria de aminoácidos de Rv3879c. Esta selección de péptidos representa solamente el 13% de la secuencia completa de Rv3879c.

15 En el caso de las cuatro moléculas excepto Rv3873, estas secuencias estaban en el extremo amino terminal, y las regiones exactas representadas por los péptidos para cada molécula se muestran en la tabla 2. Cada péptido tenía 15 restos de longitud y solapaba con el péptido adyacente en 10 aminoácidos (a.a.). Este enfoque ha demostrado previamente ser eficaz para detectar respuestas de células T CD8 restringidas a HLA clase I así como CD4 restringidas a HLA clase II (Pathan et al. 2000, Eur. J. Immunol. 30:2713-2721). Los 67 péptidos se organizaron en 20 11 combinaciones que contenían entre cinco y siete péptidos y la Tabla 2 muestra las combinaciones en relación a los antígenos que representan. Para todos los péptidos, se confirmó la identidad por espectrometría de masas y la pureza fue mayor del 70%.

25

Ensayos ELISPOT de IFN- γ ex vivo

Se realizaron ensayos ELISPOT como se ha descrito previamente (Lalvani et al. 1997, J. Exp. Med. 186: 859-865 Lalvani et al. 2001, Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 163: 824-828). Se sembraron placas de IFN- γ -ELISPOT (Mabtech AB, Estocolmo, Suecia) con $2,5 \times 10^5$ PBMC por pocillo: los pocillos duplicados contenían nada de antígeno (control negativo), fitohemaglutinina (PHA, control positivo, ICN Biomedical OH, EEUU) a 5 μ g/ml, estreptoquinasa/estreptodornasa (SKSD, Varidase, Cyanamid, Hampshire, RU) a 100u/ml, derivado de proteína purificada (PPD, Statens Serum Institut, Dinamarca) a 20 μ g/ml, y una de las 11 combinaciones de péptidos, de modo que la concentración final de cada péptido fuera de 10 μ g/ml. Después de incubación durante una noche a 35 37°C, CO₂ al 5%, las placas se revelaron con anticuerpo detector preconjugado y sustrato cromogénico, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato - cloruro de p-nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT plus, Moss Inc, Pasadena, MD, EEUU). Para los donantes vacunados con BCG no expuestos que respondieron a alguna de las combinaciones, se volvieron a ensayar las PBMC frente a los 67 péptidos individualmente en pocillos individuales de ELISPOT a una concentración final de 10 μ g/ml.

40

Los ensayos se valoraron mediante un contador ELISPOT automatizado (AID-GmbH, Strassberg, Alemania). Para los pocillos que contenían combinaciones de péptidos, las respuestas se valoraron como positivas si el pocillo de ensayo contenía al menos cinco células formadoras de manchas (SFC) de IFN- γ más que los pocillos de control negativo y esta cantidad también tenía que ser al menos dos veces la frecuencia hallada en los pocillos de control negativo. Estos puntos de corte predefinidos se traducen en un umbral de detección de 20 células T específicas de péptido por millón de PBMC. La persona que realizó los ensayos desconocía los identificadores personales de los participantes.

45

Bioinformática

50

La secuencia de ADN de H37Rv de MTB se visualizó usando la base de datos TubercuList (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Se realizaron búsquedas con la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) para homologías de secuencia proteica en genomas micobacterianos disponibles usando TubercuList, el servidor de Sanger Centre (Cambridge, RU) para la secuencia genómica incompleta de BCG de *M. bovis* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/) y el servidor BLAST del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

55

Ejemplo 2

60 Características demográficas de los participantes en el estudio

Las características demográficas de los 49 pacientes con TB confirmada por cultivo se muestran en la Tabla 1. Había 42 pacientes con TAMBIÉN pulmonar, de los cuales 23 eran positivos en Fortis de esputo. Los 7 pacientes con TAMBIÉN extra-pulmonar, comprendían pacientes con TB pleural (n=3); linfadenitis (n=1), TB miliar (n=2) y TB del tracto urinario (n=1). Los pacientes provenían de una amplia gama de etnias. Las características demográficas

65

de los donantes de BCG se muestran en la Tabla 1. Todos los donantes habían nacido en regiones de baja prevalencia de TB (Europa o Australia). Ninguno tenía historial conocido de contacto con TB y ninguno había residido durante más de 3 meses en regiones de alta prevalencia.

5 Ejemplo 3

Respuestas de ELISPOT de IFN- γ contra péptidos de Rv3873, Rv3878, Rv3879c y Rv1989c en pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo

- 10 Las respuestas de ELISPOT de IFN- γ de las PBMC de los 49 pacientes con TB contra las 11 combinaciones de péptidos de los cuatro antígenos se resumen en la Fig. 1A. Los porcentajes de pacientes respondedores variaron entre el 25,5% y el 53,1% para los diferentes antígenos (Fig. 1B). La proporción de pacientes que respondían a los péptidos de cada uno de los antígenos Rv3873, Rv3879c, Rv3878 y Rv1989c fue del 53,1% (95% CI 39-67%), 44,7% (95% CI 31-57%), 34,7% (95% CI 22-48%) y 25,5% (95% CI 13-39%), respectivamente (Fig. 1B).
- 15 Combinando estas respuestas, 30 de los 49 pacientes con tuberculosis respondieron a combinaciones de péptidos de uno o más antígenos, dando una sensibilidad de diagnóstico del 61,2% (95% intervalo de confianza [CI] del 46,2%-74,8%) para todos los péptidos usados juntos. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Cockle *et al.*, que descubrieron que podrían usarse juntos péptidos de Rv3873, Rv3878, Rv3879c, Rv1989c para detectar casi todo el ganado vacuno infectado.
- 20 Las frecuencias de células T secretoras de IFN- γ específicas para los péptidos Rv3873, Rv3878, Rv3879c, Rv1989c para todos los pacientes respondedores fueron (respuesta media y rangos intercuartiles [IQR]): 115 [52 a 310], 112 [72 a 128], 82 [28 a 116], y 76 [45 a 296] por millón de PBMC, respectivamente (Fig. 2A).
- 25 De forma importante, 3 de los 49 pacientes con TB que respondieron a péptidos Rv3879c no lograron responder a ninguno de los 35 péptidos de 15 monómeros que representan las secuencias completas de ESAT-6 y CFP10.

Ejemplo 4

Comparación de las proporciones de pacientes que responden a cada antígeno de acuerdo con el tipo clínico de TB

- Los pacientes con TB se estratificaron por el tipo clínico de TB, es decir TB pulmonar (n=42) frente a extra-pulmonar (n=7). Entonces se comparó la proporción de pacientes de cada grupo que respondieron a péptidos de cada proteína diferente. Aunque no hubo diferencia significativa entre la proporción de pacientes pulmonares y extra-pulmonares que respondieron a Rv3873, Rv3878 y Rv1989c, significativamente más pacientes extra-pulmonares (6/7, 86%) que pacientes pulmonares (14/42, 33%) respondieron a Rv3879c, (p=0,014).

Ejemplo 5

Respuestas de ELISPOT de IFN- γ en donantes sanos vacunados con BCG

- Las combinaciones de péptidos Rv3873 provocaron respuestas en 3/38 (7,9%) de los donantes no expuestos vacunados con BCG; Rv3878 y Rv3879c provocaron cada uno una respuesta en un donante (2,6%); y Rv1989c no provocó respuestas. Dos donantes, los donantes 20 y 31, respondieron cada uno a un péptido diferente de la combinación 2 de Rv3873, y uno, el donante 25, respondió a combinaciones de Rv3873, Rv3878 y Rv3879c (Tabla 2 y Fig. 1). Los donantes 20 y 31 respondieron a los péptidos 119-133 (LTATNFFGINTIPIA) y 139-153 (YFIRMWNQAALAMEV), respectivamente, ambos de la combinación 2 de Rv3873. El donante 25 respondió al péptido 174-188 (LDPGASQSTTNPIFG) de Rv3873, los péptidos 16-30 (AAKLAGLVFPQPPAP) y 61-75 (ESLVSDGLPGVKAAL) de Rv3878 y 26-40 (DTFYDRAQEYSQVLQ) de Rv3879c. Combinando todas estas respuestas, 3 de 38 (7,9%) donantes sanos vacunados con BCG respondieron a uno o más antígenos, mientras que el 81,6% respondió a PPD.

- Las frecuencias de SFC de IFN- γ específicas de péptido observadas en donantes no expuestos vacunados con BCG fueron muy inferiores que en los pacientes con TB (Fig. 2B). Las frecuencias medias de células T específicas de péptido (y el intervalo intercuartil) fueron: 28 (24 a 56), 72 (72) y 20 (20) por millón de PBMC para Rv3873, Rv3878 y Rv3879c respectivamente (Fig. 2A).

Búsquedas BLAST de secuencias peptídicas con reactividad cruzada

- 60 Se realizaron búsquedas BLAST para secuencias proteicas altamente homólogas a los seis péptidos de 15 monómeros que dieron una respuesta en donantes vacunados con BCG. El péptido 119-133 (LTATNFFGINTIPIA), obtuvo la mayor homología con un 93% de identidad con otras proteínas micobacterianas (14 de 15 aminoácidos idénticos). Este péptido es de la combinación 2 de Rv3873, un miembro de la familia PPE de proteínas, y está codificado dentro de un motivo de 52 a.a. de longitud que está altamente conservado en toda la familia PPE (Fig. 3).
- 65

Por consiguiente, presenta altos niveles de homología con muchas proteínas PPE de MTB, *M. bovis* y *M. leprae* (Tabla 3) que están codificadas en las regiones delecionada y no delecionada de de MTB, *M. bovis* y otras micobacterias. El péptido 139-153 (YFIRMWNQAALAMEV), que también está codificado dentro del motivo conservado de 52 a.a. de Rv3873 (Fig. 3), también mostró homología con secuencias de muchas proteínas PPE (Tabla 3) aunque el nivel de identidad fue considerablemente inferior en el 47% (7 de 15 restos idénticos). En contraste, el péptido 174-188 (LDPGASQSTTNPIFG) de Rv3873, que está fuera de la región del motivo conservado, no tuvo homología significativa con miembros de la familia PPE. Los dos péptidos con reactividad cruzada de Rv3878 y el único péptido con reactividad cruzada de Rv3879c, no tuvieron homología significativa de secuencia con ninguna otra proteína micobacteriana.

Discusión

Hemos evaluado respuestas inmunes celulares humanas contra mezclas de péptido de cuatro proteínas de MTB codificadas en las regiones de diferencia RD1 y RD2. Este es el primer informe de este tipo para Rv3879c y Rv1989c; para Rv3873 y Rv3878 recientemente se describieron respuestas inmunes celulares también por Okkels et al (2003, Infect. Immun. 71: 6116-23). Se reconocieron péptidos de cada proteína por células T de >25% de los pacientes con TB en ensayos IFN- γ -ELISPOT. Las combinaciones de péptidos de dos productos génicos codificados por RD1 se reconocieron en aproximadamente la mitad de los pacientes con TB ensayados: Rv3879c (45%) y el miembro de la familia PPE Rv3873 (53%). Este estudio por tanto identifica a estas dos proteínas como antígenos de células T principales de MTB en seres humanos infectados. Las respuestas de IFN- γ -ELISPOT a los péptidos fueron inusuales en donantes vacunados con BCG, dando una especificidad del 97,4% o más para todos los antígenos excepto Rv3873 que, debido a péptidos con reactividad cruzada procedentes de secuencias conservadas, obtuvo una especificidad inferior del 92,1%. La alta especificidad de los péptidos Rv3879c (97,4%), junto con el hecho de que se reconocen en IFN- γ -ELISPOT por casi la mitad de los pacientes con TB, identifica a esta molécula como un antígeno de células T útil para su inclusión en nuevos ensayos de diagnóstico basados en células T de infección por MTB.

La CMI contra los antígenos en este estudio se ha evaluado previamente en ganado vacuno (Cockle *et al.* 2002). A pesar de estar codificados en RD1, los péptidos derivados de Rv3873 y Rv3879c provocaron respuestas de IFN- γ en un ensayo ELISA de sangre completa en el 17% y el 33% del ganado vacuno vacunado con BCG respectivamente. Sin embargo, las respuestas fueron solamente dudosamente positivas, y la cantidad de ganado vacuno vacunado fue baja (n=6). En nuestra serie más grande de seres humanos vacunados con BCG, hemos demostrado que el nivel de reactividad cruzada de estos antígenos con BCG es bastante inferior que en ganado vacuno. Además, 3 de las 5 respuestas observadas fueron dudosamente positivas (Fig. 2B).

Se han detectado respuestas de células T contra péptidos que abarcan la longitud de ESAT-6/CFP10 en el 70-80% de los pacientes con TB usando ELISA de IFN- γ y en aproximadamente el 90% de los pacientes con TB usando el ensayo IFN- γ -ELISPOT. Hemos demostrado que también aparecen respuestas de células T contra péptidos Rv3879c en seres humanos infectados por MTB, y también que algunos pacientes con TB confirmada por cultivo que no lograron responder contra péptidos ESAT-6 y CFP10 sí respondieron contra péptidos Rv3879c. Por tanto, pueden usarse péptidos Rv3879c para potenciar adicionalmente la sensibilidad de los ensayos basados en células T usando ESAT-6/CFP10, sin comprometer la especificidad.

TABLA 1. Características demográficas de pacientes con TB y donantes no expuestos vacunados con BCG

	Pacientes con tuberculosis (n=49) (%)	Donantes de BCG (n=38) (%)
Edad media en años (intervalo)	34,0 \pm 13,4(17-78)	33,3 \pm 6,7(20-50)
Sexo (hombre/mujer)	31/18(63/37)	22/16(58/42)
Etnia		
India sub-continental	24(49)	1
Africana	18(37)	0
Oriental	4(8)	0
Blanca	3(6)	37

TABLA 2. Antígenos y combinaciones de péptidos evaluados y cantidad de donantes que respondieron a cada combinación de péptidos por ensayo IFN- γ -ELISPOT

Región de diferencia	Designación	Tamaño (aminoácidos)	Función putativa ^c	Combinaciones de péptidos (nº de péptidos constituyentes)	Región de la molécula representada por las combinaciones de péptidos (posición de aa)	Nº de pacientes con TB respondedores n=49	Nº de donantes no expuestos vacunados con BCG respondedores n=38
RD1	Rv3873	368	Miembro de la familia PPE de M. TB	Combinación 1 (6) Combinación 2 (6) Combinación 3 (6)	89-128 129-158 159-188	8 25 18	0 2 1

Rv3878	280	Proteína rica en alanina desconocida	Combinación 1	1-45	16	1
			Combinación 2	36-80	14	1
Rv3879c	729	Proteína rica en alanina y prolina desconocida	Combinación 1	1-40	12 ^a	1
			Combinación 2	31-70	18 ^a	0
			Combinación 3	61-95	9 ^b	0
RD2	Rv1989c	Desconocida	Combinación 1	1-40	10 ^b	0
			Combinación 2	31-70	7 ^b	0
			Combinación 3	61-100	8 ^b	0

^an=48

^bn=47

^cFunción putativa sugerida por Cole et al. 1998, Nature 393:537-544

TABLA 3. Homología entre los péptidos 119-133 y 139-153 de Rv3873 con secuencias de otras proteínas micobacterianas

(i) Péptido 119-133

Designación ^a	Función putativa familia	PPE	de	Secuencia de aminoácidos ^b
Rv3873	tuberculosis			M. LTATNFFGINTIPIA
Rv3021c,3018c,0280,1387	familia <i>tuberculosis</i>	PPE	de	M. <u>L</u> VATNFFGINTIPIA
Rv0256c	familia <i>tuberculosis</i>	PPE	de	M. <u>L</u> MATNFFGINTIPIA
Rv0453	familia <i>tuberculosis</i>	PPE	de	M. <u>M</u> VATNFFGINTIPIA

(ii) Péptido 139-153

Designación ^a	Función putativa familia	PPE	de	Secuencia de aminoácidos ^b
Rv3873	tuberculosis			M. YFIRMWNQAALAMEV
Rv2768c,1039c	familia <i>tuberculosis</i>	PPE	de	M. <u>H</u> Y <u>G</u> E <u>M</u> W <u>A</u> Q <u>D</u> A <u>L</u> A <u>M</u> Y <u>G</u>
Rv0286	familia <i>tuberculosis</i>	PPE	de	M. <u>D</u> Y <u>V</u> R <u>M</u> W <u>L</u> Q <u>A</u> A <u>V</u> M <u>G</u> L
Rv1807	familia <i>tuberculosis</i>	PPE	de	M. <u>Q</u> Y <u>A</u> E <u>M</u> W <u>S</u> Q <u>D</u> A <u>M</u> A <u>M</u> Y <u>G</u>

La búsqueda de homología se realizó usando el programa BLAST.

^aDesignación de proteínas de *M. tuberculosis* descrita (18). Las secuencias de todas las proteínas relacionadas descritas también están presentes en el genoma de BCG de *M. bovis* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/). Los restos no idénticos están subrayados.

^bLos restos aminoácidos se muestra en código de una letra.

5 Ejemplo 7

Trabajo adicional

Se reclutaron 929 contactos en el hogar de niños (<16 años) con pacientes de TB pulmonar positiva a frotis de esputo en Estambul, Turquía (prevalencia de TB de 41/100.000). Todos los niños experimentaron ensayo de Mantoux, una evaluación clínica, radiografías torácicas y se les tomó una muestra de sangre de 10 ml para el ensayo ELISPOT de IFN- γ basado en RD1 y RD2 usando antígeno recombinante completo y purificado de ESAT-6 y CFP10; y péptidos (de 15 monómeros solapantes en 10) de ESAT-6, CFP10, Rv3873, Rv3878, Rv3879c y Rv1989c (véase la Tabla 2 para la región exacta de la molécula que se representó en el ensayo ELISPOT de IFN- γ). También se recogieron datos demográficos incluyendo la edad, sexo y estado BCG. (Con combinaciones de péptidos de Rv3873, Rv3878, Rv3879c y Rv1989c.)

La Tabla 4 muestra la proporción de contactos en el hogar de niños que respondieron a antígenos y péptidos de ESAT-6/CFP10, y las combinaciones. La Tabla 4a muestra que el 46,6% (95% CI 43,5% - 49,7%) de todos los contactos respondió a antígenos de ESAT-6/CFP10, o péptidos derivados de los antígenos, en comparación con el 53,2% (95% CI 50,1% - 56,3%) que respondió a alguna de las combinaciones. Omitiendo las respuestas a la combinación 2 de Rv3873, que se sabe que tiene reactividad cruzada con BCG (Liu et al (2004) Infect Immun. 72 p2574-81) (véase la Tabla 3 y las Figuras 1 y 3), la tasa de respuesta está disminuida hasta el 43,1% (95% CI

40,0%-46,2%). Las tasas de respuesta están adicionalmente reducidas cuando se retiran las respuestas a combinaciones derivadas de RD2, reduciendo de este modo la proporción de respondedores hasta el 31,9% (95% CI 29,0% - 34,8%). La Tabla 4b ilustra el modo en que se dividieron las respuestas entre los diferentes antígenos.

5 Cabe señalar que 150 (excluyendo las respuestas a la combinación 2 de Rv3873) de los 494 contactos que respondieron a las combinaciones, fueron negativos a ESAT-6 y CFP10, es decir, fueron solamente positivos a una combinación. A partir de la Tabla 5a se puede observar cuales de estos pacientes eran respondedores. La Tabla 5b ilustra las respuestas de pacientes que respondieron solamente a péptidos de uno de los nuevos antígenos. Rv1989c tiene la mayor cantidad de respuestas dentro de este grupo con 63 pacientes respondedores en exclusiva.

10 Los hallazgos de Liu et al. indicaron que Rv3873, Rv3878, Rv3879c y Rv1989c, excluyendo la combinación 2 de Rv3873 que contenía los motivos PPE altamente conservados, eran altamente específicos en la población en que se ensayaron. Esto incluye Rv1989c aunque se obtiene de RD2 que está presente en algunas cepas de BCG. Por lo tanto es una suposición válida que también sean altamente específicos en esta población, debido a nuestros conocimientos del estado BCG de la población.

15 Esta población tenía una tasa estimada de vacunación con BCG del 78,5%, y la cepa de BCG usada en Turquía es Pasteur 1173-P2. Podemos estar seguros de que esta cepa de BCG no contiene RD2, y por tanto las respuestas a péptidos Rv1989c son muy probablemente específicas de *M. tb* y es improbable que se deban a reactividad cruzada dentro de los individuos vacunas con BCG.

20 Aunque en esta población particular es válido estudiar y usar respuestas derivadas de Rv1989c, éste no es el caso para todas las poblaciones ya que RD2 está presente en algunas cepas de BCG que están actualmente en uso. Para asegurar que el ensayo pueda usarse de forma universal, es prudente retirar las combinaciones derivadas de Rv1989c, el antígeno derivado de RD2. Esto deja a 77 paciente que solamente respondieron a las nuevas combinaciones, excluyendo la combinación 2 de Rv3873 y las combinaciones 1, 2 y 3 de Rv1989c.

25 Unos 6 meses después de la exposición, se volvieron a tomar muestras de sangre de los pacientes y se realizó un ELISPOT de IFN- γ repetido. De esos 77 contactos que inicialmente sólo respondieron a una combinación, como se ha descrito anteriormente, el 49% dio una respuesta positiva a ESAT-6 o CFP10, con un 43% dando aún una respuesta negativa y sin datos disponibles para un 9%, como puede observarse en la Tabla 6. Dado que se cree que el ELISPOT de IFN- γ basado en ESAT-6/CFP10 es el nuevo referente para detectar LTBI, el hecho de que el 49% de contactos recién expuestos fueran inicialmente negativos en ELISPOT de IFN- γ basado en ESAT-6/CFP10 pero positivos en ELISPOT de IFN- γ basado en combinaciones sugiere que las respuestas a las combinaciones puede ser un indicador altamente sensible de infección temprana por *M. tb*.

Conclusiones

40 Estos resultados muestran que las combinaciones, cuando se usan en el ensayo ELISPOT de IFN- γ :
 a) detectan infección latente por *M. tb*;
 b) aumentan significativamente la sensibilidad del ELISPOT de IFN- γ basado en ESAT-6/CFP-10 para la detección de infección latente por TB (150/433 ~ 34%);
 c) posibilitan una detección más temprana de infección asintomática por *M. tb* en contactos recién expuestos (77 de 510 contactos (15%) que dieron una respuesta a ESAT-6/CFP10 o las combinaciones excluyendo la combinación 2 de Rv3873 y las combinaciones 1 a 3 de Rv1989c, respondieron solamente a las combinaciones con un 49% de los 77 llegando a ser positivos a ESAT-6/CFP10 6 meses después de la exposición a *M. tb*).

Tabla 4a

Porcentaje de contactos con respuestas en IFN-γ-ELISPOT a las Combinaciones (n=929)	
ESAT6/CFP10 (ant./pep.)	46,6
Combinaciones	53,2
Combinaciones excluyendo la combinación 2 de Rv3873	43,1
Combinaciones excluyendo la combinación 2 de Rv3873 y las combinaciones 1 a 3 de 1989c	31,9
ESAT 6/CFP10 (ant./pep.) y combinaciones excluyendo la combinación 2 de Rv3873	62,8

Tabla 4b

Respuestas de ELISPOT de IFN-γ a cada antígeno (n=929) (mostradas como la cantidad de pacientes respondedores)	
Rv3873 (Combinaciones 1 a 3)	370
Rv3878 (Combinaciones 1 y 2)	184
Rv3879c (Combinaciones 1 a 3)	224
Rv1989c (Combinaciones 1 a 3)	263

Tabla 5a

Frecuencia de respuestas de ELISPOT de IFN-γ para cada antígeno de aquellos que solamente respondieron a las combinaciones (excluyendo la combinación 2 de Rv3873) (n=150)	
Rv3873 (Combinaciones 1 y 3)	52
Rv3878 (Combinaciones 1 y 2)	35
Rv3879c (Combinaciones 1 a 3)	53
Rv1989c (Combinaciones 1 a 3)	107

Tabla 5b

Contactos que solamente respondieron a las combinaciones y solamente una región dentro de las combinaciones	
Rv3873 (Combinaciones 1 y 3)	9
Rv3878 (Combinaciones 1 y 2)	2
Rv3879c (Combinaciones 1 a 3)	8
Rv1989c (Combinaciones 1 a 3)	63

Tabla 6

Porcentaje de respuestas en el seguimiento a los 6 meses contra ESAT y CFP10 en el IFN-γ-ELISPOT para aquellos contactos que solamente respondieron a las combinaciones excluyendo la combinación 2 de Rv3873 y las combinaciones 1 a 3 de Rv1989c a tiempo cero(n=77)	
Respuesta negativa	43
Respuesta positiva	49
Sin datos	9

5 SEC ID N° 1 - Rv3879c

MSITRPTGSYARQMLDPGGWVEADEDTFYDRAQEYSQVLQRVTDVLDTCRQQKGHVFEGG
 LWSGGAANAANGALGANINQLMTLQDYLATVITWHRHIAGLIEQAKSDIGNNVDGAQREI
 DILENDPSLDADERHTAINSLVTAHGANVSLVAETAERVLESENWPKNALEDLLQOK
 SPPFPDVPILVVPSPGIFGTPGTFITPGTPIPTPGTPIPTPGAPVTIPIPIPTPTPVTPVT
 PGKPVTPVTPVKPGTPGEPITPTPTTPPVAPATPATPATPTVTPAPAPHPQPAPAPAPSPG
 PQPVTPATPGPSGFPATPGTPGGEPAFHVKFAALAEQPGVPGQHAGGGTQSGPAHADESAA
 SVTPAAASGVPGARAAAAPSGLTAVGAGARSSVGTAAAAGAGSHAATGRAPVATSDKAAA
 PSTRAASARTAPPARPPSTDHIDKDRSESADDGTPVSMIPVSAARAARDAATAAASARQ
 RGRGDALRLARRJAAALNASDNNAGDYGFPTTAVTTDGSIVVANSYGLAYIPDGMELPN
 KVYLASADHAIPVDEIARCATYPVLA VQAWAAFHDMTLRAVIGTAEQLASSDPGVAKIVL
 EPDDIPESGKMTGRSRLEVVDPSAAAQLADTTDQRLLDLPPAPVDVNPGRHMLWFE
 LMKPMTSTATGRBAHLRAFRAAAHSQEIALHQAHTATDAAVQRVAVADWLYWQYVVTGL
 LDRALAAAC

10 SEC ID N° 2 a 18 - péptidos Rv3879c mencionados en la Tabla 2

- COMBINACIÓN 1
- 2 MSITR PTGSY ARQML
- 3 PTGSY ARQML DPGGW
- 4 ARQML DPGGW VEADE
- 5 DPGGW VEADE DTFYD
- 6 VEADE DTFYD RAQEY
- 7 DTFYD RAQEY SQVLQ
-
- COMBINACIÓN 2
- 8 RAQEY SQVLQ RVTDV
- 9 SQVLQ RVTDV LDCR
- 10 RVTDV LDCR QKKGH
- 11 LDCR QKKGH VFEGG
- 12 QKKGH VFEGG LWSGG
- 13 VFEGG LWSGG AANAA
-
- COMBINACIÓN 3

ES 2 440 470 T3

14 LWSGG AANAA NGALG
15 AANAA NGALG ANINQ
16 NGALG ANINQ LMTLQ
17 ANINQ LMTLQ DYLAT
5 18 LMTLQ DYLAT VITWH

ESAT-6

MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQCKWDA
TATELNNAIQNLARTISEAGQAMASTEGNVTGMFA

10 CFP10

MAEMKTDAAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQAAVVRFQE
AANKQKQELDEISTNIRQAGVQYSRADEEQQALSSQMGF

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la sensibilidad de un ensayo de diagnóstico para diagnosticar infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un ser humano, donde dicho ensayo de diagnóstico comprende poner en contacto células T de dicho ser humano con un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* que no es Rv3879c y determinar si alguna de dichas células T reconoce dicho antígeno; comprendiendo adicionalmente dicho método
- (i) poner en contacto células T de dicho ser humano con uno o más de
- (a) un péptido que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 o al menos un 80% de homología con la SEC ID N° 1;
- (b) una combinación de péptidos que tiene o comprende cada uno la secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1; o
- (c) una combinación de péptidos que tiene cada uno al menos un 80% de homología con una secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID N° 1; y
- (ii) determinar si alguna de dichas células T reconoce dicho péptido,
- donde el método se realiza *in vitro*, y donde está presente una célula presentadora de antígeno (APC).
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa (i) comprende adicionalmente poner en contacto dichas células T con uno o más antígenos de células T adicionales de *Mycobacterium tuberculosis* o con uno o más análogos de dicho antígeno o antígenos que son capaces de unirse a un receptor de células T que reconoce dicho antígeno o antígenos.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho uno o más antígeno de células T adicionales incluyen antígenos codificados por la región RD-1 o RD-2, siendo dichos antígenos preferiblemente ESAT-6 y/o CFP10; o fragmentos de los que son de al menos 8 aminoácidos de longitud.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, donde dicho uno o más antígenos de células T adicionales que no son Rv3879c se seleccionan entre Rv3873, Rv3878 o Rv1989c; o fragmentos de los mismos que son de al menos 8 aminoácidos de longitud.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la etapa (i) comprende poner en contacto dicha muestra de células T con dos o más péptidos diferentes, teniendo cada uno la secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1, y/o donde se ponen en contacto péptidos de, o análogos de, al menos cinco antígenos diferentes con las células T.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde uno o más de los péptidos
- (i) están representados por las SEC ID N° 2 a 18, o
- (ii) que se unen a una célula T que reconoce (i), se ponen en contacto con las células T, y/o
- donde el reconocimiento de dicho péptido por dichas células T se determina detectando la secreción de una citoquina desde las células T.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, donde la citoquina es IFN- γ .
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, donde dicha citoquina se detecta permitiendo que dicha citoquina se una a un anticuerpo inmovilizado específico para dicha citoquina y detectando la presencia del complejo anticuerpo/citoquina.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas células T son células *ex vivo* recién aisladas.

Figura 1

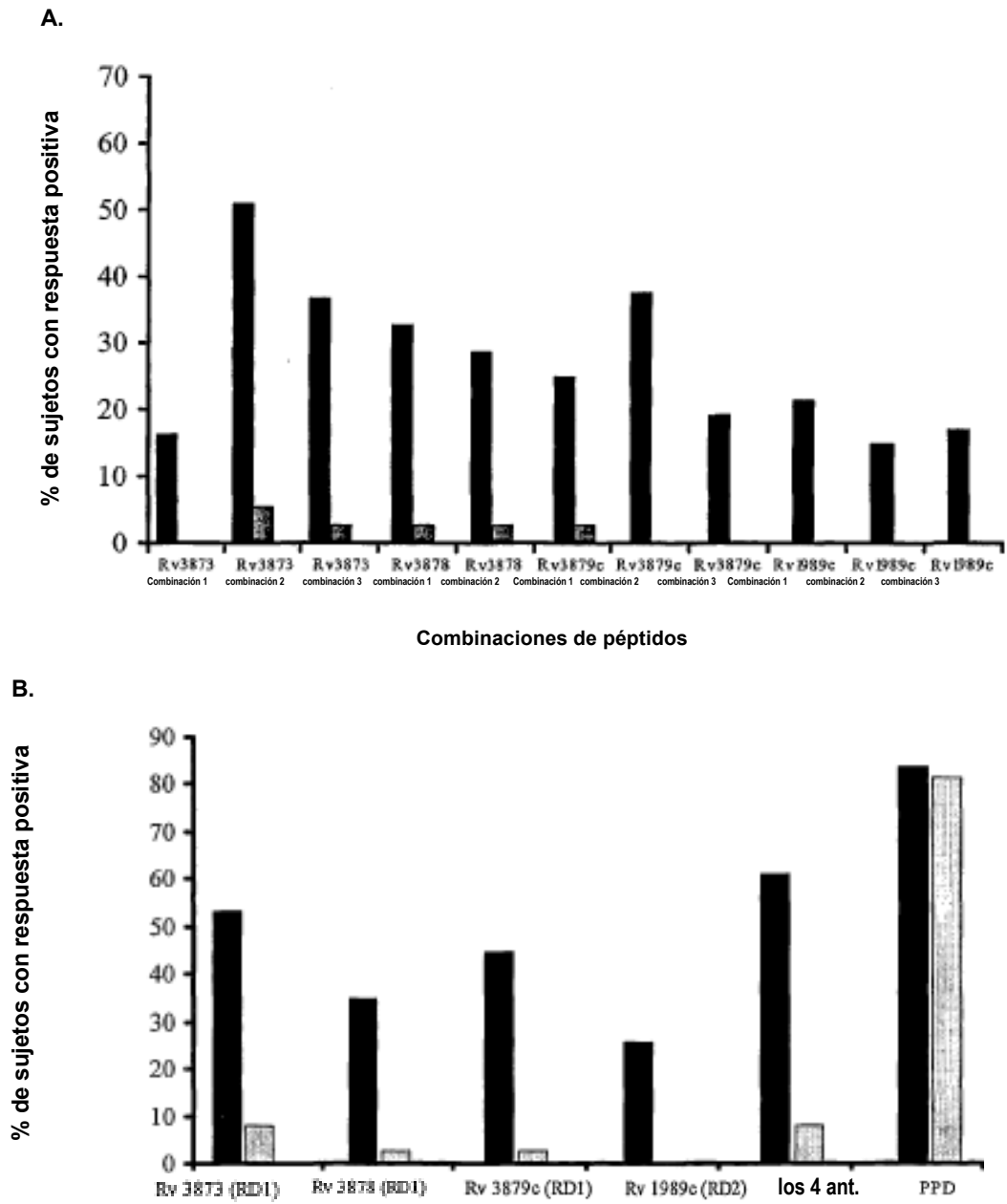
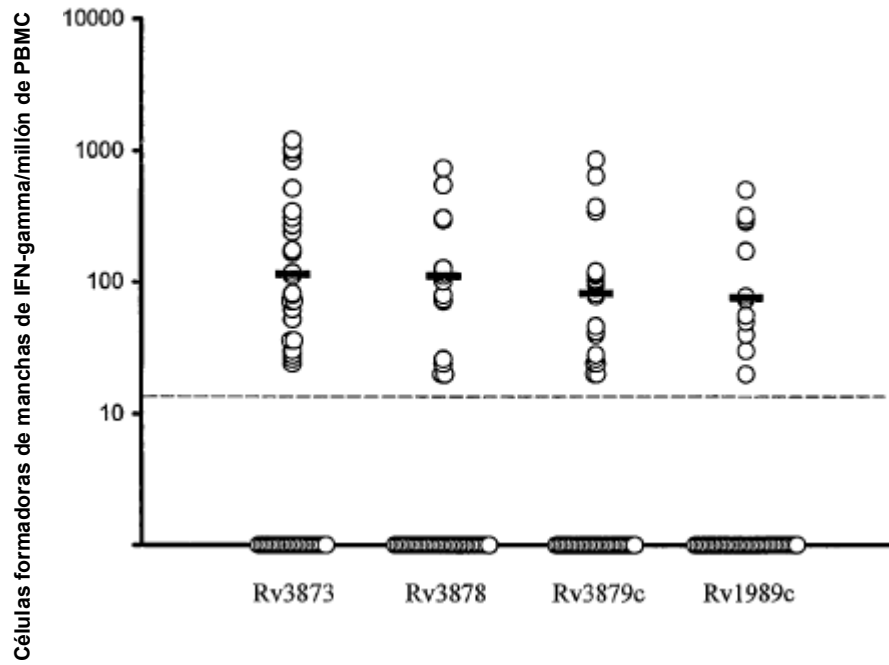


Figura 2

A.



B.

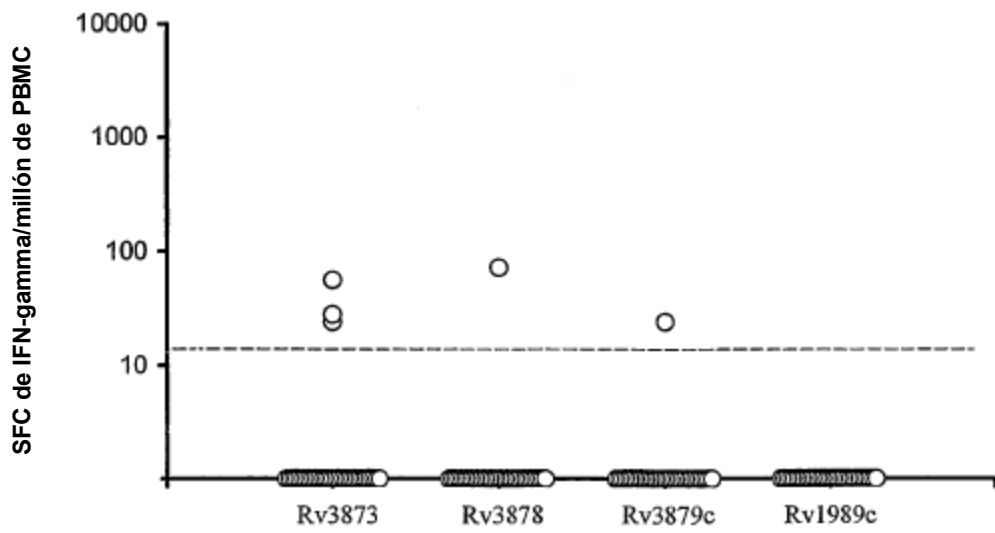


Figura 3.

Péptido 110-133 **Péptido 139-153**
100 MATP**SLPEIAAN**HITQAVLTATN**FFGINTIPIAL**TEMDY**FIRMWNQAALAMEVY**Q**AETAV** 160 Rv3873
+ + + +++ + +++++ ++ ++ ++ + ++ + + + + +
-AMVPP-PVVAANRAQHMSLVATNFFGQNTPAIAATEAQYE-EMWAQDAAAMYGY----- PPE Motif