

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 454**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2010 PCT/EP2010/054721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO10115989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2010 E 10716313 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2417456**

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

30 Prioridad:

09.04.2009 GB 0906215

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

20.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LALVANI, AJIT

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 594 454 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 diagnóstico de Mycobacterium tuberculosis

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método de diagnóstico de infección por Mycobacterium tuberculosis (*M. tb*) en un humano. También se describen composiciones peptídicas y un kit que se pueden usar para llevar a cabo el método de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

10 El diagnóstico preciso de la infección tuberculosa es esencial para el tratamiento, prevención y control de esta enfermedad en resurgimiento. Ya que Mycobacterium tuberculosis (*M. tb*) es a menudo difícil de identificar en los pacientes con tuberculosis activa, e imposible de identificar directamente en las personas sanas infectadas de forma latente, una prueba de diagnóstico de base inmunológica que indica la presencia o ausencia de infección por *M. tb* es útil para la evaluación diagnóstica de tuberculosis activa y el diagnóstico y detección de la infección por *M. tb*.

15 La primera medida de la respuesta inmune celular que puede ser explotada como un marcador de infección por *M. tb*, desarrollada al final del siglo 19, fue la prueba de la tuberculina (TST), que mide una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado a un derivado proteico purificado de tuberculina (PPD). Esta prueba tiene muchos inconvenientes que incluyen la poca especificidad debida a la reactividad cruzada del PPD, una mezcla sin purificar de más de doscientas proteínas de *M. tb* ampliamente compartidas entre *M. tb* y el bacilo *M. bovis* de Calmette-Guerin (BCG) y la mayoría de micobacterias ambientales. De ahí que los resultados falsos positivos son comunes en las personas con exposición ambiental a la micobacteria y la vacunación previa con BCG. Esto presenta un problema importante porque la mayoría de la población mundial está vacunada con BCG y el efecto de confusión de la BCG persiste durante hasta 15 años después de la vacunación.

25 La genómica comparativa ha identificado varias regiones genéticas en *M. tb* y *M. bovis* que se eliminan en *M. bovis* BCG. Varias regiones de diferencia, designadas como RD1 a RD16, entre *M. tb* o *M. bovis* y BCG, han sido identificadas. Todas representan partes del genoma de *M. bovis* eliminadas durante In cultivo prolongado *in vitro*. RD1 fue eliminada antes de 1921, cuando la BCG se difundió primero a nivel internacional para su uso como vacuna. RD1 está por lo tanto ausente de todas las cepas de vacuna de BCG, así como la mayoría de micobacterias ambientales, pero todavía está presente en el complejo de *M. tb*, incluyendo todos los aislados clínicos de *M. tb* y *M. bovis*. Existen nueve marcos de lectura abierta (ORF) en la región del gen RD1. El objetivo antigénico secretor temprano de 6 kDa (ESAT-6) y la proteína filtrado de cultivo de 10 kDa (CFP10) se codifican en RD1 y se han investigado intensamente en modelos animales y humanos en los últimos años. ESAT-6 y CFP-10 son los objetivos más fuertes de la respuesta inmune celular en ratones infectados por *M. tb*, el ganado y los pacientes con tuberculosis y contactos. Por lo tanto, ahora se utilizan como los antígenos clave en los ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA) que explotan el hecho de que las células T secretoras de interferón gamma específicas para ESAT-6 y CFP-10 se detectan comúnmente en personas infectadas con *M. tb* pero casi nunca detectadas en personas vacunadas con BCG.

35 El desarrollo y la validación de tales ensayos de liberación de interferón gamma basados en células T (IGRA) en la última década es el primer avance importante en el diagnóstico de infección tuberculosa desde el desarrollo de la prueba cutánea de la tuberculina hace 100 años. Aunque la sensibilidad de diagnóstico de IGRA disponible en el mercado es mayor que la TST, su uso clínico en la vida real exige una mayor sensibilidad para permitir la rápida exclusión de tuberculosis activa y un diagnóstico confiable de tuberculosis latente en las personas con mayor riesgo de avance hasta tuberculosis y que están en riesgo de falsos resultados negativos por el ensayo IGRA, es decir, las personas inmunodeprimidas en virtud de la infección por VIH, enfermedades crónicas concomitantes (por ejemplo, una insuficiencia renal en fase terminal, diabetes, enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunológico), medicamentos (por ejemplo, corticosteroides, agentes anti-TNF-alfa) o edad temprana (menores de 5 años y especialmente menores de 2 años de edad). Un enfoque es aumentar la sensibilidad de diagnóstico mediante la incorporación de antígenos adicionales que son objetivos fuertes de las respuestas de las células T en personas infectadas por *M. tb* pero no en las personas vacunadas con BCG.

50 El gen Rv3615c está situado fuera del locus RD1 y codifica una proteína de 103 aminoácidos de función desconocida. Sin embargo, la proteína Rv3615c ha sido identificada como un componente crítico de la ruta de secreción llamado sistema Snm (secreción en micobacterias) (MacGurn y colaboradores. Molecular Microbiology 2005 57: 1653) involucrado en la secreción de los factores de virulencia ESAT-6 y CFP-10. Esta proteína no está en el locus RD1 (que está ausente en todas las cepas de la vacuna BCG) y por lo tanto no se espera que sea específica para la infección por *M. tuberculosis* en personas vacunadas con BCG. Tampoco se espera que este antígeno sea un objetivo fuerte de respuestas de células T debido a los antígenos más fuertes de células T en humanos infectados con *M. tb* son todos antígenos secretados y no hay datos disponibles que indiquen que Rv3615c es secretada por *M. tb*. Además, no hay evidencia que indique que Rv3615c es un objetivo de células T en humanos infectados con *M. tb*.

La tuberculosis bovina, causada por *Mycobacterium bovis* (*M. Bovis*), una micobacteria patógena estrechamente relacionada con *M. tb*, es un problema importante en los rebaños de ganado en el Reino Unido y trae como resultado una gran carga económica. Todo el ganado que se presume que tiene infección por *M. bovis* con base de los resultados de las pruebas cutáneas positivas en respuesta a la tuberculina bovina [PPD-B] son sacrificados porque no pueden ser utilizados para la producción de leche o carne y, en caso de desarrollar TB activa, transmiten el contagio al resto del ganado en la manada. Debido a la gran carga económica causada por la tuberculosis bovina, los investigadores veterinarios están investigando activamente las respuestas inmunes de células T en el ganado infectado con *M. bovis* para el desarrollo de vacunas eficaces para el ganado y diagnósticos del ganado para mejorar la prevención y la detección temprana de la tuberculosis bovina. Con estos objetivos, un grupo de investigación de la Veterinary Laboratories Agency en el Reino Unido investigó la respuesta inmune celular para un intervalo de proteínas de *M. bovis* que son altamente expresadas a nivel del ARNm durante el cultivo *in vitro*. Como parte de un cribado de más de 100 antígenos, se encontraron 14 genes que son expresados fuertemente a nivel del ARNm (Sidders y colaboradores. *Infection and Immunity* 2008 Vol 76 (9); 3.932-3.939). En el cribado, estas proteínas para las respuestas de células T en el ganado con presumible infección por *M. bovis*, encontraron que 4 eran antígenos de células T, ya que fueron reconocidas por células T secretoras de IFN gamma del ganado. Los 4 antígenos de *M. bovis* eran Mb2107c, Mb3299, Mb3776c y Mb3645c, y produjeron respuestas de IFN gamma en 2, 3, 5 y 11 reses respectivamente de las 30 del hato (con presumible infección por *M. bovis*) analizadas (Sidders y colaboradores. *Infection and Immunity*. 2008. vol 76 (9); 3.932-3.939). Los genes correspondientes en *M. tb* son: Rv2081c, Rv3271c, Rv3750c y Rv3615c, respectivamente. El cribado se hizo utilizando péptidos de 20 mer que representan las secuencias de estos 4 productos génicos en 30 reses que se presume que están naturalmente infectadas con *M. bovis* (sobre la base de que tenían resultados positivos de las pruebas cutáneas en respuesta a la tuberculina bovina [PPD-B]) de rebaños que se sabe que tienen tuberculosis bovina (Sidders y colaboradores. *Infection and Immunity*. 2008. Vol 76 (9); 3.932-3.939). El ganado de control contaba con 10 reses infectadas obtenidas de los rebaños en cuatro parroquias de pruebas anuales sin antecedentes de aparición de tuberculosis bovina en los últimos 4 años (prueba cutánea de PPD-B negativa) y 20 reses vacunadas con la cepa danesa BCG aproximadamente 6 meses antes del muestreo. Aunque se detectaron respuestas de IFN-g para Mb3645c (Rv3615c) medidas por ELISA de sangre entera en 11/30 (37%) del ganado presumiblemente infectado con *M. bovis*, no se detectaron respuestas a este antígeno, ni en ganado sin tratamiento (0/10) o vacunado con BCG (0/20). Las respuestas a Mb3645c (Rv3615c) fueron identificados en 4/7 vacas infectadas con *M. bovis* que no tenían respuestas de células T con interferón-gamma a ESAT-6 y CFP-10. Por lo tanto, Mb3645c (Rv3615c) parece ser reconocido por las células T de más ganado que los otros 3 antígenos, pero esta diferencia (11/30 versus 5/30) no fue estadísticamente significativa ($P = 0,14$, prueba exacta de Fisher).

No es posible predecir con base en el antígeno si un antígeno de células T en el ganado también será un antígeno de células T en humanos. Hay una serie de diferencias significativas en el procesamiento, presentación y reconocimiento de antígenos entre el ganado y los seres humanos. Además, el ganado tienen moléculas de MHC sustancialmente diferentes de los humanos, y por lo tanto se espera que reconozcan diferentes antígenos. Además, el ganado es genéticamente más homogéneo que las poblaciones humanas consanguíneas de las cuales que son étnicamente diversas y genéticamente heterogéneas. En consecuencia, el experto en la materia no tendría ninguna razón para considerar que un antígeno de ganado pudiera ser un antígeno de células T en otras especies.

El documento WO 02/074903 describe un método de selección de las secuencias nucleotídicas purificadas o polinucleótidos que codifican las proteínas o parte de las proteínas. Uno de los péptidos descritos es la SEQ ID NO 20.

El documento WO 2008/028489 divulga un método para medir la reactividad inmune mediada por células basado en la producción de IP-10.

Buddle y colaboradores, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108 (2005) páginas 45-51 divulga un método de control de la inmunogenicidad de una vacuna contra *M. tb* que implica medir una respuesta de células T a ESAT-6.

Raghavan y colaboradores, *Nature*, vol 454, agosto de 2008, páginas 717-722 divulga que Rv3616c-Rv3614c juega un papel en la virulencia de *M. tb*.

El documento WO 2009/024822 divulga métodos para el diagnóstico de la tuberculosis que comprenden la determinación de la presencia o ausencia de una respuesta inmune a un grupo de antígenos.

Al igual que el mejoramiento de los métodos de diagnóstico de *M. tb*, sería útil proporcionar vacunas adicionales para *M. tb*. Aunque los mecanismos inmunes de protección contra la tuberculosis siguen permaneciendo hasta ahora sin definir, La inmunidad mediada por células es esencial para la protección. Todos los candidatos a vacuna para la tuberculosis actualmente en ensayos clínicos (por ejemplo, ESAT-6, MVA-85A, la molécula de fusión ESAT-6-Ag85B, BCG recombinante que sobreexpresa 85A/Mtb10.4, Ad35 que expresa 85A/85B/Mtb10.4) se basan en antígenos de *M. tuberculosis* que provocan una fuerte inmunidad de células T durante la infección natural. Un reto importante en el desarrollo de la vacuna es identificar antígenos inmunodominantes que provocan una fuerte respuesta polifuncional de IFN-gamma e IFN-gamma/IL-2 a partir de células T efectoras y de memoria tanto de subgrupos de células T CD4 y CD8. Estos antígenos de la vacuna también deben ser altamente reconocidos en los individuos infectados a través de la población humana que es inmunogénica y efectiva en poblaciones genéticamente heterogéneas consanguíneas.

Resumen de la invención

La presente invención identifica Rv3615c como uno de los 3 antígenos de células T más potentes de *M. tuberculosis* en los seres humanos. Se estudió una cohorte de 47 pacientes con tuberculosis activa, de los cuales 25 fueron confirmados en cultivo y 22 eran de tuberculosis altamente probable, 23 sujetos infectados de forma latente (infección latente de TB = LTBI) y 31 controles sanos vacunados con BCG sin exposición conocida a la tuberculosis (Tablas 1 y 2). El rango medio de edad de los pacientes con tuberculosis era de 35 años (rango 18 a 79) de los cuales 20 eran mujeres. 37/43 pacientes tenían una cicatriz por BCG. El rango medio de edad de los controles era de 33 años (rango de 21 a 80) de los cuales 20 eran mujeres.

En forma notable, una proporción muy elevada de pacientes con tuberculosis tenían células T que secretan IFN-g en circulación específicas para Rv3615c. 34/47 (72%) de los pacientes con tuberculosis respondió a los péptidos de Rv3615c. La potencia de Rv3615c era similar a ESAT-6 y CFP-10: 34/47 (72%) de los pacientes con tuberculosis respondió a ESAT-6 y 35/47 (74%) respondió a CFP-10 (Tabla 2). La potencia de ESAT-6 y CFP-10 observada en nuestra cohorte es similar al trabajo publicado [Arend y colaboradores, Journal Infectious Diseases, 2000, 181: 1.850; Chapman y colaboradores, AIDS, 2002, 16: 2285]. De forma crucial, solamente 2/31 (6%) donantes vacunados con BCG respondieron a los péptidos de Rv3615c. Estos resultados indican que Rv3615c tiene sensibilidad diagnóstica similar y especificidad para ESAT-6 y CFP-10, haciéndolo uno de los tres antígenos de *M. tb* más inmunodominantes en los seres humanos infectados con TB.

También se estudiaron 23 personas infectadas con tuberculosis latente. 14/23 sujetos con LTBI respondieron a los péptidos Rv3615c en comparación con 12/23 y 15/23 para ESAT-6 y CFP-10, respectivamente (Tabla 2). De manera significativa, los inventores identificaron 2/7 (29%) individuos que respondieron a los péptidos Rv3615c pero no a cualquiera de los 35 péptidos que solapan 15 mer que abarcan la longitud de ESAT-6 y CFP-10 (que se sabe que son antígenos inmunodominantes de *M. tb* de utilidad diagnóstica). Este resultado muestra que los péptidos Rv3615c se pueden utilizar para aumentar la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico que utilizan péptidos ESAT-6 y CFP-10 para el diagnóstico de LTBI, sin comprometer la especificidad (Tabla 3).

Los 47 casos de TB y 23 sujetos con LTBI eran de poblaciones étnicamente diversas (que comprenden caucásicos, blancos, asiáticos del sur y los africanos negros); por lo tanto, los resultados indican que Rv3615c puede detectar respuestas de humanos infectados con *M. tb* de orígenes genéticamente heterogéneos, algo que no podría haberse predicho a partir de los resultados de Sidders y colaboradores en el ganado.

Este aumento en la sensibilidad es clínicamente muy importante. Una muy alta sensibilidad permite a los médicos descartar la posibilidad de tuberculosis cuando una prueba de diagnóstico es negativa. En particular, las pruebas de diagnóstico de base inmunológica (incluyendo la prueba cutánea *in vivo*) pueden dar resultados falsos negativos en los individuos inmunodeprimidos debido a su limitada sensibilidad. Una mayor sensibilidad diagnóstica permitirá a los médicos detectar con precisión la infección tuberculosa, incluso en estos pacientes inmunodeprimidos vulnerables que corren el mayor riesgo de tuberculosis grave y diseminada. 4% se considera un incremento valioso y clínicamente importante [Dosanjh y colaboradores, Annals Internal Medicine, 2008, 148: 325].

A diferencia de los hallazgos de Sidders y colaboradores en el ganado, donde la prevalencia de las respuestas de células T al interferón gamma para Rv3615c era sólo del 37% (11 de las 30 vacas infectadas experimentalmente), la prevalencia de las respuestas a nuestros péptidos de 15 mer derivados de Rv3615c en los seres humanos con tuberculosis (es decir, pacientes con tuberculosis) fue dramáticamente diferente a 72% (34/47 pacientes con tuberculosis) ($P < 0,01$, prueba de Chi cuadrado), equivalente a la sensibilidad diagnóstica de ESAT-6 (72%) y CFP-10 (74%) demostrada en este y otros estudios clínicos de los pacientes con tuberculosis. Este notable hallazgo identifica a Rv3615c como uno de los 3 antígenos de las células T más inmunodominantes en seres humanos infectados con *M. tb* y no podría haber sido predicha a partir de los hallazgos de Sidders y colaboradores en el ganado.

La Tabla 3 muestra cómo la inclusión de péptidos Rv3615c junto con péptidos ESAT-6 y CFP-10 aumenta la sensibilidad de diagnóstico o TB activa y LTBI sin comprometer la especificidad.

En conclusión, el uso de Rv3615c para el diagnóstico o la detección de la infección tuberculosa activa o latente es una nueva herramienta potente de diagnóstico para uso en ensayos basados en células T. La herramienta de diagnóstico Rv3615c es al menos tan potente como ESAT-6 y CFP-10 y por lo tanto podría sustituir ya sea a ESAT-6 o a CFP-10, lo que sería especialmente importante si ESAT-6 fuera a ser utilizado como vacuna. La vacuna prometedoras basada en ESAT-6 que comprende la molécula de fusión ESAT-6-Ag85B podría entonces ser desplegada una vez se confirme la eficacia protectora en ensayos clínicos con humanos. Esta estrategia podría sacar provecho de la inmunogenicidad y eficacia protectora preclínica de ESAT-6 para prevenir la tuberculosis a través de la vacunación a nivel mundial sin comprometer el paradigma de diagnóstico nuevo potente basado en células T que está mejorando el control de la tuberculosis mediante el tratamiento preventivo específico de la infección tuberculosa latente.

Además, cuando se utiliza en combinación con ESAT-6 y CFP-10, las respuestas de IFN-gamma a Rv3615c

ES 2 594 454 T3

proporcionan una mejor sensibilidad diagnóstica sin reducir la especificidad en las poblaciones vacunadas con BCG.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico de infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un humano, o para determinar que un humano ha sido expuesto a *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende:

- 5 (i) poner en contacto las células T de dicho ser humano con una o más de
- (a) un péptido que tiene las secuencias enumeradas como la SEQ ID NO: 20
- (b) un péptido que tiene o comprende la secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos del péptido enumerado como la SEQ ID NO: 20; o
- 10 un péptido que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 70% con una secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20, en donde el péptido es capaz de unirse a un receptor de células T que reconoce un péptido como se define en (a) o (b) y poner en contacto las células T de dicho ser humano con las células T con al menos un antígeno de células T de *Mycobacterium tuberculosis*, en donde al menos un antígeno es ESAT-6 o fragmentos del mismo que son de al menos 8 aminoácidos de longitud o CFP10 o fragmentos del mismo que son de al menos 8 aminoácidos de longitud, pero no tanto ESAT-6 como CFP10; y
- 15 (ii) determinar si cualquiera de dichas células T reconoce a dicho péptido, en donde las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo *in vitro*.

El método de la presente invención proporciona una sensibilidad sorprendentemente alta en humanos cuando se utiliza en ausencia de cualquier antígeno que no sea de Rv3615c. Esta alta sensibilidad en humanos no podría haber sido predicha con base en la sensibilidad comparativamente baja del 37% observada en el ganado. Además, el método de la

20 presente invención muestra alta sensibilidad en la infección latente de TB (LTBI), así como TB activa.

	SEQ ID NO 1	Rv3615c/1	MTENLTVQPERLGVL
	SEQ ID NO 2	Rv3616c/2	TVQPERLGLVLAHHD
	SEQ ID NO 3	Rv3615c/3	RLGVLASHHDNAAVD
	SEQ ID NO 4	Rv3615c/4	ASHHDNAAVDASSGV
25	SEQ ID NO 5	Rv3615c/5	NAAVDASSGVEAAAG
	SEQ ID NO 6	Rv3615c/6	ASSGVEAAAGLGESV
	SEQ ID NO 7	Rv3615c/7	EAAAGLGESVAITHG
	SEQ ID NO 8	Rv3615c/8	LGESVAITHGPYCSQ
	SEQ ID NO 9	Rv3615c/9	AITHGPYCSQFNDTL
30	SEQ ID NO 10	Rv3615c/10	PYCSQFNDTLNVYLT
	SEQ ID NO 11	Rv3615c/11	FNDTLNVYLTAHNAL
	SEQ ID NO 12	Rv3615c/12	NVYLTAHNALGSSLH
	SEQ ID NO 13	Rv3615c/13	AHNALGSSLHTAGVD
	SEQ ID NO 14	Rv3615c/14	GSSLHTAGVDLAKSL
35	SEQ ID NO 15	Rv3615c/15	TAGVDLAKSLRIAAK
	SEQ ID NO 16	Rv3615c/16	LAKSLRIAAKIYSEA
	SEQ ID NO 17	Rv3615c/17	RIAAKIYSEADEAWR

SEQ ID NO 18 Rv3615c/18 IYSEADEAWRKAIDG

SEQ ID NO 19 Rv3615c/19 DEAW RKAI DG LFT

SEQ ID No. 20

MTENLTVQPERLGLVLAHSHDAAVDASSGVEAAAGLGESVAITHGPHYCSQFNDTLNLYLTAHNALGSS

5 LHTAGVDLAKSLRIA AKIYSEADEAWRKAIDGLFT

Los múltiples péptidos derivados de Rv3615c fueron ampliamente reconocidos por células T de una gama de pacientes y personas étnica y genéticamente diversa con LTBI, lo que sugiere que estos péptidos pueden ser reconocidos en el contexto de una amplia gama de haplotipos de HLA de clase II, que es esencial para vacunas eficaces que necesitan ser altamente reconocidas en individuos infectados a través de la población humana que es inmunogénica y eficaz en poblaciones genéticamente heterogéneas consanguíneas. Nuestros hallazgos con Rv3615c son una reminiscencia de los múltiples epítotos promiscuos encontrados previamente en ESAT-6 y CFP-10.

La IFN- γ derivada de células T es esencial en la activación de macrófagos y la contención de *M. tuberculosis* dentro del granuloma. El papel crítico de IFN- γ en el control de la tuberculosis ha sido claramente demostrado por la susceptibilidad a las infecciones micobacterianas de ratones con un gen perturbado de IFN- γ y de humanos con defectos en la respuesta o producción de IFN- γ . Como consecuencia de ello, la capacidad para estimular la liberación por las células T de IFN- γ ha sido utilizada como uno de los criterios más importantes para la identificación inicial de antígenos de la vacuna en los programas de descubrimiento de antígenos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que una fuerte respuesta de Th1 inducida por la vacuna (la liberación de IFN- γ o la frecuencia de células T productoras de IFN- γ) no necesariamente garantiza un alto grado de protección. Más recientemente, se ha reconocido que la delineación de las células T en distintas poblaciones funcionales define la calidad de la respuesta, que se considera importante para el diseño de vacunas. Sabemos que ESAT-6 provoca fuertes respuestas polifuncionales de IFN- γ e IFN- γ /IL-2 en ratones y seres humanos e induce protección en ratones. Se ha demostrado que Rv3615c también induce una fuerte respuesta de células T de IFN- γ e IFN- γ /IL-2 polifuncional en LTBI, y es un objetivo tanto de células T CD4 como CD8, donde estas últimas también han sido identificadas como importantes en la protección contra la tuberculosis y se consideran muy importantes en el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis. Por lo tanto, Rv3615c es una fuerte candidata a vacuna.

También se divulga un método de tratamiento profiláctico o terapéutico de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* o enfermedad tuberculosa usando la composición anterior.

También se divulga un método de determinación de la etapa de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un humano que comprende determinar si existe una respuesta diferencial de células T a diferentes antígenos en el ser humano, en donde se miden las respuestas de células T a Rv3615c y uno de ESAT-6 y CFP10, pero no tanto ESAT-6 como CFP10, en donde la etapa de la determinación se lleva a cabo *in vitro*.

Un péptido no celular es una composición que comprende al péptido y, opcionalmente, otros componentes, incluyendo un adyuvante y un excipiente. Un polinucleótido no celular es un polinucleótido que no está contenido dentro de una célula, tal como ADN desnudo, un virus recombinante, un plásmido u otros tipos de vectores.

Los ejemplos de organismos recombinantes modificados genéticamente para expresar el péptido anterior incluyen bacterias y micobacterias. Ejemplos de organismos recombinantes modificados genéticamente para sobrerregular la expresión o el transporte de los péptidos anteriores incluyen micobacterias tales como BCG.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere al diagnóstico de la infección por tuberculosis en un ser humano con base en la determinación de si las células T de los humanos reconocen un epítoto de Rv3615c (SEQ ID No: 20). El método también comprende la determinación de si las células T de los humanos reconocen uno o más antígenos de células T adicionales de *Mycobacterium tuberculosis* que son antígenos codificados por la región RD-1 o RD-2, es decir, ESAT-6 o CFP10. En una realización, el método comprende determinar si la célula T reconoce uno o más de los péptidos representados por las SEQ ID NOs: 1 a 19. En otra realización, la invención se refiere a un método de evaluación o supervisión de la inmunogenicidad o eficacia de una vacuna contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis* o enfermedad tuberculosa mediante la determinación de si las células T CD4 y/o CD8 de un ser humano reconocen un epítoto de Rv3615c (SEQ ID No: 20).

El ser humano que es puesto a prueba por lo general tiene una infección micobacteriana activa o latente, o ha tenido una infección de este tipo recientemente. El ser humano puede ser positivo o negativo en una prueba de Mantoux. El ser humano puede estar en riesgo de una infección micobacteriana, normalmente por razones socioeconómicas o

puede tener una predisposición genética o adquirida a la infección por micobacterias, por ejemplo infección por VIH.

5 El ser humano puede ser uno que ha tenido contacto o que se sospecha que ha sido expuesto o puede haber sido expuesto a *Mycobacterium tuberculosis*. Típicamente la exposición es a la tuberculosis pulmonar, tal como la tuberculosis pulmonar "abierta", que es positivo para frotis de A.F.B. en esputo (bacilo resistente al ácido). Por lo tanto, el método puede ser utilizado para rastrear los contactos sanos de individuos con tales infecciones tuberculosas. El método también puede utilizarse para llevar a cabo estudios de población para medir el número de individuos en una población que tiene infección por *Mycobacterium tuberculosis*. El contacto puede ser alguien cuya exposición es en un lugar como el hogar, el trabajo (como un trabajador de la salud) o la exposición en prisión (tal como un prisionero). La exposición puede ser como resultado de residir en un país con alta prevalencia de TB, y las pruebas de diagnóstico después de la emigración a un país con una baja prevalencia de TB. Por lo tanto, el contacto puede ser un inmigrante.

15 El ser humano que se pone a prueba (que tiene una exposición conocida o que se sospecha de ella) puede ser saludable o puede tener una condición crónica que lo pone en un riesgo mayor de desarrollar TB activa y/o que puede hacer que la infección de TB sea más difícil de diagnosticar. Los ejemplos incluyen individuos infectados por VIH, las personas que toman inmunosupresores (por ejemplo, corticosteroides, azatioprina y agentes anti-TNF- α , tales como infliximab, y terapia para el cáncer), pacientes de hemodiálisis, los receptores de trasplante de órganos, diabéticos y niños muy pequeños (menores de 5 años de edad, particularmente de 2 años de edad).

El ser humano que se pone a prueba puede ser un participante sano en un ensayo clínico de fase 1, fase 2 o fase 3.

20 Las células T que reconocen el péptido en el método son generalmente células T que han sido previamente sensibilizadas *in vivo* al antígeno procedente de *M. tuberculosis*. Estas células T con experiencia antigénica están generalmente presentes en la sangre periférica de un huésped que ha sido expuesto a la *M. tuberculosis* con una frecuencia de 1 en 10^6 hasta 1 en 10^3 células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células T pueden ser células T CD4 y/o CD8.

25 En el método, se pueden poner en contacto las células T con los péptidos *in vitro* o *in vivo*, y la determinación de si las células T reconocen el péptido puede hacerse *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, la divulgación también proporciona un método de diagnóstico que se practica en el cuerpo humano.

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

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

35 El cambio de estado de la célula T puede ser el inicio o el aumento de la secreción de una sustancia de la célula T, tal como una citoquina, especialmente IFN- γ , IL-2 o TNF- α . Se prefiere particularmente la determinación simultánea de la secreción de IFN- γ e IL-2 a nivel de una sola célula y puede permitir el control del antígeno y la carga bacteriana, por ejemplo, en respuesta al tratamiento. La detección solamente de la secreción de IFN- γ puede ser suficiente cuando sólo se requiere un diagnóstico inicial como en los ejemplos más adelante. Se puede utilizar la detección de citoquina intracelular por FACS. La sustancia puede ser detectada típicamente permitiendo que se una a un agente específico de unión y luego midiendo la presencia del complejo del agente/sustancia específico de unión. La detección de la sustancia puede llevarse a cabo usando un sistema con base en ELISA. El agente específico de unión es normalmente un anticuerpo, tal como anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos para citoquinas están disponibles comercialmente, o se pueden preparar usando técnicas estándar.

45 Típicamente, el agente específico de unión se inmoviliza sobre un soporte sólido. Después se deja que se una la sustancia, opcionalmente puede lavarse el soporte sólido para eliminar el material que no está unido específicamente al agente. El complejo agente/sustancia puede detectarse mediante el uso de 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 al cual se une el primer agente. El segundo agente es preferiblemente un anticuerpo y se etiqueta directa o indirectamente mediante una etiqueta detectable.

50 De este modo, el segundo agente puede detectarse mediante un tercer agente que normalmente se etiqueta directa o indirectamente mediante una etiqueta detectable. Por ejemplo, el segundo agente puede comprender una fracción de biotina, permitiendo la detección por un tercer agente que comprende una fracción de estreptavidina y típicamente fosfatasa alcalina como una etiqueta detectable.

En una realización, el sistema de detección que se usa es el ensayo ELISPOT *ex vivo* que se describe en el documento WO 98/23960. En ese ensayo el IFN- γ secretado desde la célula T se une a un primer anticuerpo específico de IFN- γ que está inmovilizado sobre un soporte sólido. El IFN- γ unido se detecta a continuación, utilizando un segundo anticuerpo específico de IFN- γ que está marcado con una etiqueta detectable. Dicho anticuerpo etiquetado puede obtenerse a través de MABTECH (Estocolmo, Suecia). Alternativamente, se pueden utilizar sistemas ELIPOST basados en fluorescencia para permitir la detección simultánea de dos o más citoquinas (por ejemplo, IFN- γ e IL-2) a partir de células T individuales, que luego se pueden enumerar como poblaciones de células T que secretan una o dos citoquinas utilizando lectores ELISpot de fluorescencia que se pueden obtener a través de AID (Strassberg, Alemania). Otros marcadores detectables que pueden utilizarse se discuten a continuación.

El cambio de 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 de 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 la superficie celular sobre la célula T.

En general, las células T que están en contacto en el método se toman del huésped en una muestra de sangre, aunque se pueden usar otros tipos de muestras que contienen células T. La muestra puede añadirse directamente al ensayo o puede procesarse primero. Normalmente el procesamiento puede comprender la dilución de la muestra, por ejemplo con agua o regulador. Típicamente, la muestra se diluye de 1,5 a 100 veces, por ejemplo de 2 a 50 o de 5 a 10 veces.

El procesamiento puede comprender la separación de componentes de la muestra. Típicamente las células mononucleares (MC) se separan de las muestras. Las MC comprenderán las células T y las APC. Por lo tanto, en el método las APC presentes en las MC separadas puede presentar el péptido a las células T. En otra realización sólo las células T, tal como solamente las células T CD4 o CD8, se pueden purificar de la muestra. Las células PBMC, MCS y T pueden separarse de la muestra usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Lavani y colaboradores (1997) J. Exp. Med. 186, páginas 859-865.

Preferiblemente, las células T usadas en el ensayo están en la forma de muestras sin procesar o diluidas, o son células T recién aisladas (tal como en la forma de MC o PBMC recién aisladas) que se utilizan directamente *ex vivo*, es decir, que no se cultivan antes de ser utilizadas 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 en general también citoquinas que promueven el crecimiento exógeno. Durante el cultivo, los péptidos están típicamente presentes en la superficie de las APC, tal como las APC utilizadas en el método. El cultivo previo de las células T puede conducir a un aumento en la sensibilidad del método. De este modo, las células T pueden convertirse en líneas celulares, tal como las líneas celulares de corto plazo (por ejemplo como se describe en Ota y colaboradores, (1990), Nature, 346, páginas 183-187).

La APC, que está presente típicamente en el método puede del mismo huésped que la célula T o desde un huésped 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. Normalmente se separa de la misma muestra que la célula T y típicamente se purifica conjuntamente con la célula T. De este modo, la APC puede estar presente en las MC o las PBMC. La APC es típicamente una célula recientemente aislada *ex vivo* o una célula cultivada. Puede estar en forma de una línea celular, tal como una línea celular inmortalizada o de corto plazo. La APC puede expresar moléculas vacías del MHC de clase II en su superficie.

Típicamente en el método, las células T derivadas de la muestra puede colocarse en un ensayo con todos los péptidos (es decir, una combinación de los péptidos) que se pretende poner a prueba (el panel relevante) o las células T pueden dividirse y colocarse en ensayos separados cada uno de los cuales contiene uno o más de los péptidos. Preferiblemente, las formas *in vitro* o *in vivo* del método.

La divulgación también proporciona los péptidos tal como dos o más de cualquiera de los péptidos mencionados en este documento (por ejemplo, en cualquiera de las combinaciones mencionadas en el presente documento) para uso simultáneo, separado o secuencial (por ejemplo, para uso *in vivo*).

En una realización, se añade el péptido mismo directamente a un ensayo que comprende células T y APC. Como se discutió anteriormente, las células T y APC en dicho ensayo podrían estar en la forma de MC. Cuando se usan péptidos que pueden ser reconocidos por la célula T sin necesidad de presentación por las APC, no se requieren entonces las APC. Los análogos que imitan el péptido original, unidos a una molécula del MHC son un ejemplo de tal péptido.

En una realización, se proporciona el péptido a la APC en ausencia de la célula T. Se proporciona luego la APC a la célula T, normalmente después de que se les permita presentar el péptido en su superficie. El péptido puede haber sido incorporado al interior de la APC y presentado, o simplemente incorporado sobre la superficie sin entrar en el interior de la APC.

El tiempo durante el cual se pone en contacto el péptido con las células T variará dependiendo del método utilizado para determinar el reconocimiento del péptido. Típicamente se añaden 10^5 a 10^7 , preferiblemente 5×10^5 a 10^6 PBMC a cada

ES 2 594 454 T3

ensayo. En el caso en que se añade péptido directamente al ensayo, su concentración es de 10^{-1} a 10^3 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente 0,5 a 50 $\mu\text{g/ml}$ o 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

5 Se utilizaron péptidos de 15 mer que solapan péptidos adyacentes en 10 residuos de aminoácidos en comparación con Sidders y colaboradores que utilizaron péptidos de 20 mer que solapan péptidos adyacentes en 12 residuos de aminoácidos. La ventaja de los péptidos de 15 mer es que así como detectan de manera eficiente las respuestas de células T CD4, también detectan de manera eficiente las respuestas de células T CD8 - más eficientemente que los péptidos más largos, por ejemplo 18 o 20 aminoácidos de longitud.

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

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

15 La determinación del reconocimiento del péptido por las células T afines puede realizarse mediante la detección o la medición de la unión a las células T del péptido presentado en el contexto de moléculas HLA con motivos de unión al péptido congruentes con dicho péptido (por ejemplo, péptido-tetrámeros de HLA). Normalmente las células T que se unen al péptido se pueden enumerar y clasificar con base en esta unión, por ejemplo usando anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia y una máquina de FACS. La presencia de células T que reconocen el péptido se supone que se presentan si la frecuencia de células clasificadas utilizando el péptido está por encima de un valor de "control".
20 La frecuencia de células T con experiencia antigénica es generalmente de 1 en 10^6 a 1 en 10^3 , y por lo tanto se puede determinar si las células clasificadas son células T con experiencia antigénica.

25 La determinación del reconocimiento del péptido por las células T se puede medir *in vivo*. Típicamente, el péptido se administra al huésped y a continuación se puede medir una respuesta que indica el reconocimiento del péptido. En la forma de realización, el péptido se administra por vía intradérmica, típicamente en una forma similar a la prueba de Mantoux. El péptido se puede administrar de forma epidérmica. El péptido se administra típicamente mediante aguja, tal como por inyección, pero se puede administrar por otros métodos tales como balística, por ejemplo las técnicas de balística que se han usado para suministrar ácidos nucleicos. El documento EP-A-0693119 describe técnicas que típicamente pueden usarse para administrar el péptido. Típicamente se administran de 0,001 a 1.000 μg , por ejemplo de 0,01 a 100 μg o de 0,1 a 10 μg de péptido.

30 Alternativamente, se puede administrar un agente que es capaz de proporcionar los péptidos *in vivo*. De este modo, se pueden administrar un polinucleótido capaz de expresar el péptido, por lo general en cualquiera de las formas descritas anteriormente para la administración del péptido. El polinucleótido tiene normalmente cualquiera de las características del polinucleótido proporcionado por la descripción que se discute a continuación. El péptido se expresa a partir del polinucleótido *in vivo* y se mide el reconocimiento del péptido *in vivo*. Típicamente, se administran de 0,001 a 1.000 μg ,
35 por ejemplo de 0,01 a 100 μg o de 0,1 a 10 μg de polinucleótido.

El reconocimiento del péptido *in vivo* normalmente es indicado por la aparición de una respuesta de DTH. Esto se mide generalmente por examen visual del sitio de administración del péptido para determinar la presencia de inflamación, tal como por la presencia de induración, eritema o edema.

40 El péptido capaz de unirse a un receptor de células T que reconoce un péptido que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20 o cualquier otro péptidos a ensayar (es decir, análogos del péptido) puede ser identificado por cualquier método adecuado. La unión del péptido a dichos receptores de células T puede ser probada por técnicas estándar. Por ejemplo, pueden aislarse receptores de células T a partir de células T que han demostrado reconocer el péptido que tiene una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20 (por ejemplo, utilizando el método de la invención). La demostración de la unión del péptido a los receptores de células T puede demostrarse luego por la determinación de si los receptores
45 de células T inhiben la unión del péptido a una sustancia que se une al péptido, por ejemplo, un anticuerpo al péptido. Típicamente, el péptido se une en una molécula de MHC en dicha inhibición del ensayo de unión.

Normalmente, el análogo inhibe la unión del péptido a un receptor de células T. En este caso, se reduce la cantidad de péptido que puede unirse el receptor de células T en presencia del análogo. Esto es debido a que el análogo es capaz de unirse al receptor de células T y por lo tanto compite con un péptido por la unión al receptor de células T.

50 Las células T para uso en los experimentos de unión anteriores pueden aislarse de pacientes con infección por micobacterias, 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 SEQ ID NO: 20 o una secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 20. Un péptido que es homólogo a otro péptido

- es típicamente al menos 70% homólogo al péptido, preferiblemente al menos 80 a 90% y más preferiblemente al menos 95%, 97% o 99% homólogo al mismo, por ejemplo sobre una región de al menos 8, al menos 15, preferiblemente al menos 30, por ejemplo al menos 40, 60 o 100 o más aminoácidos contiguos. Los métodos para medir la homología de proteínas son bien conocidos en la técnica y serán entendidos por los expertos en la técnica donde en el presente documento, la homología se calcula sobre la base de la identidad de aminoácidos (a veces denominada como "homología dura"). Por ejemplo, el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo usada con sus ajustes por defecto) (Devereux y colaboradores (1984) Nucleic Acids Research 12, páginas 387-395).
- Normalmente los aminoácidos en el análogo en las posiciones equivalentes a los aminoácidos en el péptido original que contribuyen a la unión de la molécula del MHC o son responsables del reconocimiento por el receptor de células T, son los mismos o están conservados.
- Normalmente, el análogo comprende una o más modificaciones, que pueden ser modificaciones naturales posteriores a la traducción o modificaciones artificiales. La modificación puede proporcionar una fracción química (normalmente por sustitución de un hidrógeno, por ejemplo de un enlace C-H), tal como un grupo amino, acetilo, hidroxilo o halógeno (por ejemplo, flúor) o un grupo carbohidrato. Típicamente, la modificación está presente en el terminal N o C.
- 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 terminal N y/o un terminal C. El aminoácido no natural puede ser un L-aminoácido.
- El péptido tiene típicamente una forma, tamaño, flexibilidad o configuración electrónica que es sustancialmente similar al péptido original. Es típicamente un derivado del péptido original.
- En una realización, el péptido es o imita al péptido original unido a una molécula del MHC de clase II. El análogo puede ser o puede imitar al péptido original unido a 2, 3, 4 o más moléculas del MHC de clase II asociadas o unidas entre sí. Estas moléculas del MHC pueden estar unidas entre sí mediante un sistema a base de biotina/estreptavidina, en el que normalmente 2, 3 o 4 moléculas del MHC marcadas con biotina se unen a una fracción s de estreptavidina. Este péptido normalmente inhibe la unión del complejo péptido/MHC Clase II a un receptor de la 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 se puede inmovilizar sobre un soporte sólido.
- El péptido se diseña típicamente por medios computacionales y luego se sintetiza usando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede seleccionar de una biblioteca de compuestos. La biblioteca puede ser una biblioteca combinatoria o una biblioteca de despliegue, tal como una biblioteca de despliegue en fagos. La biblioteca de compuestos puede expresarse en la biblioteca de despliegue en la forma unida a una molécula del MHC de clase II, tales como la molécula del MHC que se une al péptido original. Los péptidos se seleccionan generalmente de la biblioteca en función de su capacidad de imitar las características de unión de los péptidos originales. De este modo, pueden ser seleccionados con base en la capacidad para unirse a un receptor de células T o anticuerpo que reconoce el péptido inicial.
- La divulgación también proporciona un kit para llevar a cabo el método que comprende uno o más de los péptidos y un medio para detectar el reconocimiento del péptido por la célula T. Típicamente, se proporcionan los péptidos para uso simultáneo, separado o secuencial. Típicamente, el medio para detectar el reconocimiento permite o ayuda a la detección con base a las técnicas discutidas anteriormente.
- De este modo, el medio puede permitir la detección de una sustancia secretada por las células T después del reconocimiento. El kit puede por lo tanto incluir adicionalmente un agente de unión específico para la sustancia, tal como un anticuerpo. El agente es normalmente específico para IFN- γ . El agente típicamente se inmoviliza sobre un soporte sólido. Esto significa que después de la unión del agente a la sustancia, permanecerá en la proximidad de la célula T que secreta la misma. De este modo se forman los "puntos" de complejo sustancia/agente sobre el soporte, representando cada punto una célula T que secreta la sustancia.
- La cuantificación de los puntos, y normalmente la comparación frente a un control, permite la determinación del reconocimiento del péptido.
- El kit también puede comprender un medio para detectar el complejo sustancia/agente. Un cambio detectable puede producirse en el propio agente después de la unión a la sustancia, tal como un cambio de color. Alternativamente, puede permitirse que se una un segundo agente marcado directa o indirectamente para la detección al complejo sustancia/agente para permitir la determinación de las manchas. Como se discutió anteriormente, el segundo agente puede ser específico para la sustancia, pero se une a un sitio diferente en la sustancia que el primer agente.

El soporte inmovilizado puede ser una placa con pozo, tal como una placa de microtitulación. Por tanto, cada ensayo puede llevarse a cabo en un pozo separado en la placa.

5 El kit puede comprender adicionalmente medio para las células T, agentes de detección o reguladores de lavado para ser utilizados en las etapas de detección. El kit puede comprender adicionalmente reactivos adecuados para la separación de la muestra, tales como la separación de las PBMC o las células T de la muestra. El kit puede estar diseñado para permitir la detección de las células T directamente en la muestra sin requerir ninguna separación de los componentes de la muestra.

10 El kit puede comprender un instrumento que permite la administración del péptido, tal como administración intradérmica o epidérmica. Normalmente dicho instrumento comprende una o más agujas. El instrumento puede permitir el suministro balístico del péptido. El péptido en el kit puede estar en la forma de una composición farmacéutica.

15 El kit también puede comprender controles, tal como controles positivos o negativos. El control positivo puede permitir probar el sistema de detección. De este modo, el control positivo típicamente imita el reconocimiento del péptido en cualquiera de los métodos anteriores. Típicamente, en los kits diseñados para determinar el reconocimiento *in vitro*, el control positivo es una citoquina. En el kit diseñado para detectar reconocimiento *in vivo* del péptido, el control positivo puede ser antígeno al que la mayoría de los individuos debe responder.

El kit también puede comprender un medio para tomar una muestra que contiene células T de los humanos, tal como una muestra de sangre. El kit puede comprender un medio para separar células mononucleares o células T de una muestra del humano.

20 También se divulga una composición que comprende un péptido usado en la invención. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina regulada con fosfato. Típicamente, la composición se formula para administración intradérmica o epidérmica o para aplicación por técnicas de balística. De este modo, el péptido o el polinucleótido pueden estar asociados con una partícula portadora para suministro balístico.

25 La descripción también se refiere a un polinucleótido que es capaz de expresar uno o más péptidos utilizados en la invención. Típicamente, el polinucleótido es ADN o ARN, y es monocatenario o bicatenario. El polinucleótido comprende por lo tanto típicamente la secuencia que codifica la secuencia de la SEQ ID NO: 20 o un fragmento de la misma.

30 El polinucleótido puede comprender además secuencias de codificación o que no son de codificación 5' y/o 3' a la secuencia que codifica el péptido. Las secuencias 5' y/o 3' a la secuencia de codificación pueden comprender secuencias que ayuda a la expresión, tales 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. En una realización, el polinucleótido es capaz de expresar el péptido en una célula de mamífero, tal como una célula humana, de primate o de roedor.

35 El polinucleótido se puede incorporar en un vector replicable. Tal vector es capaz de replicarse en una célula adecuada. El vector puede ser un vector de expresión. En tal vector, el polinucleótido usado en la invención está operativamente enlazado a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión o el polinucleótido. El vector puede contener un marcador seleccionable, tal como el gen de resistencia a ampicilina.

40 El polinucleótido usado en la invención, los péptidos en una composición usada en la invención o los agentes usados en el método (por ejemplo, en la detección de sustancias secretadas por células T) pueden portar una etiqueta detectable. Se prefieren las etiquetas detectables que permiten la detección de la sustancia secretada por inspección visual, opcionalmente con la ayuda de un medio de aumento óptico. Dicho sistema se basa típicamente 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 comercialmente, por ejemplo, a través de BioRad. Otros marcadores adecuados incluyen otras enzimas tales como peroxidasa, o etiquetas de proteínas, tales como biotina; o radioisótopos, tales como ³²P o ³⁵S. Las etiquetas anteriores pueden detectarse usando técnicas conocidas.

50 Los polinucleótidos utilizados en la invención o los péptidos en una composición usada en la invención pueden estar en forma sustancialmente purificada. Pueden estar en forma sustancialmente aislada, en cuyo caso comprenderán generalmente al menos 90%, por ejemplo al menos 95, 97 o 99% del polinucleótido, péptido o anticuerpo en la preparación. Los péptidos aislados sustancialmente comprenden generalmente al menos 90%, tal como por ejemplo al menos 95, 97 o 99% de la masa seca de la preparación. El polinucleótido o el péptido están típicamente sustancialmente libres de otros componentes celulares o sustancialmente libres de otros componentes celulares micobacterianos. El polinucleótido o péptido se pueden utilizar en una forma sustancialmente aislada, purificada o libre en el método o presentarse en dichas formas en el kit.

El péptido para su uso en la invención se puede preparar usando técnicas estándar de química sintética, tales como mediante el uso de un sintetizador automático.

5 El péptido se elabora típicamente a partir de un polipéptido más largo, por ejemplo, una proteína de fusión, cuyo polipéptido típicamente comprende la secuencia del péptido. El péptido puede derivarse del polipéptido, por ejemplo, mediante hidrólisis del polipéptido, tal como mediante el uso de una proteasa; o por rompimiento físico del polipéptido. El polipéptido tiene típicamente la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20 y puede haber sido expresado de manera recombinante.

10 El péptido también se puede elaborar en un procedimiento que comprende la expresión de un polinucleótido, tal como mediante la expresión del polinucleótido usado en la invención. El polipéptido expresado puede procesarse adicionalmente para producir el péptido usado en la invención. De este modo, el péptido puede elaborarse en un proceso que comprende el cultivo de una célula transformada o transfectada con un vector de expresión como se describió anteriormente en condiciones para permitir la expresión del péptido o un polipéptido a partir del cual se puede elaborar el péptido. El polinucleótido usado en la invención puede elaborarse usando técnicas convencionales, tales como mediante el uso de un sintetizador.

15 La invención también proporciona un método de determinación de la etapa de infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un humano que comprende determinar si existe una respuesta diferencial de células T para diferentes antígenos de *M. tb* en el ser humano. Cualquier método adecuado mencionado en este documento puede ser utilizado para medir las respuestas de células T. Las respuestas de células T pueden ser para cualquiera de los péptidos de *M. tb* mencionados en este documento, tales como uno o más de Rv3615c, ESAT-6 o CFP10. El método puede llevarse a cabo para determinar si la infección es reciente o antigua, para determinar si el ser humano está infectado en forma latente o tiene la enfermedad, o para controlar el efecto del tratamiento.

Ejemplos

25 Se evaluaron cuarenta y siete pacientes adultos con enfermedad de tuberculosis activa (confirmada en cultivo, n = 25; clínicamente altamente probable, n = 22) para determinar la presencia de respuestas de células T a las combinaciones de péptidos de 15 mer que se superponen (cada péptido se superponen a su vecino en 10 aminoácidos) abarcando la longitud de los antígenos de *M. tuberculosis* Rv3615c, ESAT-6 y CFP-10 en muestras de sangre venosa tomadas después de consentimiento informado por escrito. La clasificación diagnóstica de los pacientes se basó en las categorías 1 y 2 de la Tabla 1 a continuación (véase Dosanjh y colaboradores, Ann Intern Med, 2008; 148: 325-336) y se numeraron las respuestas de las células T usando un ensayo ELISpot de IFN-gamma *ex vivo*, tal como se describió anteriormente (Dosanjh y colaboradores, Ann Intern Med, 2008; 148: 325-336). Veintinueve de los 47 casos de TB no habían tenido ningún tratamiento en el punto de evaluación y el resto había tenido tratamiento de menos de 2 meses (tratamiento completo = 6 meses).

35 Además, 23 personas sanas con presunta infección latente por TB (LTBI) fueron evaluadas para determinar las respuestas de células T a los péptidos de Rv3615c, ESAT-6 y CFP-10 como anteriormente. La clasificación diagnóstica de estos sujetos se basó en la categoría 4B en la Tabla 1 a continuación. Todos estos individuos tenían una clara historia de exposición a la tuberculosis, eran asintomáticos, tenían pruebas cutáneas de tuberculina positivas (induración cutánea > 10 mm en la prueba de Mantoux) y radiografía normal de tórax. Ninguno de los 23 sujetos con LTBI había comenzado el tratamiento preventivo en el punto de evaluación.

40 Por último, 31 voluntarios sanos asintomáticos vacunados con BCG sin antecedentes conocidos de exposición a la tuberculosis o a la enfermedad fueron evaluados como más arriba, que sirven como controles negativos para determinar la presencia de la infección tuberculosa.

Tabla 1: Clasificación diagnóstica de los sujetos en los presentes ejemplos. Los 47 pacientes con tuberculosis activa eran de las categorías diagnósticas 1 (cultivo confirmado) y 2 (clínicamente altamente probable), los 23 sujetos con LTBI eran de la categoría 4B y los controles negativos sanos vacunados con BCG eran de categoría 4D.

Categoría diagnóstica	Criterios
1: Tuberculosis confirmada por cultivo	Cultivo microbiológico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y hallazgos clínicos y radiológicos sugestivos
2: Tuberculosis altamente probable	Rasgos clínicos y radiológicos altamente sugestivos e improbablemente causados por otra enfermedad y una decisión de tratamiento hecha por un médico y una respuesta a la terapia e histología de apoyo si procede
3: clínicamente indeterminado	Un diagnóstico final de tuberculosis no era ni muy probable ni

		descartable de forma confiable
4:	Tuberculosis activa excluida	Todas las muestras microbiológicas de frotis y de cultivo negativas y un diagnóstico alternativo definido identificado
	Subclasificación	
5	4A: tuberculosis inactiva	Episodio previo o cambios estables en la radiografía de tórax y TST positiva (si se hizo) y sin evidencia clínica de enfermedad activa
	4B: factores de disco ≥ 1 para las exposiciones a tuberculosis. TST positiva.	TST positiva y bacteriológicamente negativa (si se hizo). Sin evidencia clínica de enfermedad activa
10	4C: factores de riesgo ≥ 1 para las exposiciones a tuberculosis, TST negativa	TST negativa (si se hizo)
	4D: No hay factores de riesgo para exposiciones a tuberculosis. TST negativa	Sin histología de exposición a tuberculosis y TST negativa (si se hizo)

15 Tabla 2: Tasas de respuestas de células T positivas para combinaciones de péptidos de ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c medidos mediante ELISpot de IFN-gamma ex vivo en 47 pacientes con TB, 23 personas con infección latente de TB y 31 controles sanos sin antecedentes de exposición o contacto con TB.

	Casos		LTBI		Controles	
	n	%			n	%
ESAT-6	34/47	72	12/23	52	2/31	6
CFP-10	35/47	74	15/23	65	2/31	6
Rv3615c	34/47	72	14/23	61	2/31	6

- 20 • La prevalencia de respuestas de células T a péptidos Rv3615c en casos de TB activa es tan alta como para las respuestas de células T a ESAT-6 y CFP-10, lo que indica que la sensibilidad de diagnóstico de Rv3615c es tan alta como ESAT-6 y CFP10. La sensibilidad diagnóstica de Rv3615c en los casos de TB activa (34/47, 72%) es estadísticamente significativamente más alta que su sensibilidad en el ganado con tuberculosis activa como lo describen Sidders y otros (11/30, 37%), $P < 0,01$. Esta es la primera demostración de una sensibilidad diagnóstica para Rv3615c en TB activa en mamíferos, ya que Sidders y colaboradores sólo estudiaron ganado con pruebas cutáneas positivas, es decir, el ganado no tenía diagnóstico patológico o microbiológico de tuberculosis activa.
- 25 • La prevalencia de respuestas de células T a Rv3615c en sujetos con LTBI es aproximadamente tan alta como aquella de ESAT-6 y CFP-10, lo que indica que la sensibilidad de diagnóstico de Rv3615c en LTBI es tan alta como ESAT-6 y CFP-10.
- La prevalencia de respuestas a Rv3615c en controles no expuestos es tan baja como aquella de ESAT-6 y CFP-10, lo que indica que la especificidad de diagnóstico de Rv3615c es tan alta como ESAT-6 y CFP-10.
- 30 • Los 47 casos de TB y 23 sujetos con LTBI eran de poblaciones étnicamente diversas (que comprenden blancos caucásicos, asiáticos del sur y africanos negros); por lo tanto, los resultados indican que Rv3615c puede detectar respuestas de seres humanos infectados con *M. tb* procedentes de entornos genéticamente heterogéneos, algunos de los cuales no podrían haber sido predichos a partir de los resultados de Sidders y colaboradores en el ganado.

35 Tabla 3: Tasas de respuestas de células T positivas para combinaciones de péptidos de ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c medidos mediante ELISpot de IFN-gamma en 47 pacientes con TB, 23 personas con infección latente de TB y 31 controles sanos sin antecedentes de exposición o contacto con TB.

ES 2 594 454 T3

	Casos		LTBI		Controles	
	n	%	n	%	N	%
ESAT-6/CFP-10	42/47	89	16/23	70	2/31	6
ESAT-6/CFP-10/Rv3615c	44/47	94	18/23	78	2/31	6
ESAT-f/Rv3615c	41/47	87	16/23	70	2/31	6
CFP-10/Rv3615c	44/47	94	16/23	70	2/31	6

- Rv3615c puede servir como un sustituto de ESAT-6 o CFP-10; cuando se utiliza conjuntamente con cualquiera de estos antígenos, proporciona sensibilidad diagnóstica al menos tan alta como la combinación convencional de ESAT-6 / CFP-10.
- Cuando se añade a la combinación de ESAT-6/CFP-10, Rv3615c aumenta la sensibilidad de diagnóstico de la tuberculosis activa (en 5% en esta serie de 47 pacientes) y LTBI (en 8%) sin reducir la especificidad de diagnóstico, aunque el tamaño de las muestras aquí es demasiado pequeño para probar de manera significativa la significación estadística.

Tabla 4: Proporción de casos de tuberculosis activa y sujetos con LTBI que respondieron a la combinación de péptidos Rv3615c que responden a cada uno de los péptidos individuales, usando el ensayo ELISpot ex vivo de IFN-gamma. Los denominadores son los números que responden a la combinación de péptidos que se probaron contra cada uno de los péptidos constituyentes individuales de la combinación. Los numeradores son el número de sujetos que responden a los péptidos de 15 mer constituyentes individuales.

	Casos		LTBI	
	n	%	n	%
Rv3615c				
p1	1/15	7	0/5	0
p2	5/15	33	0/5	0
p3	3/15	20	2/5	40
p4	2/15	1	1/5	20
p5	2/15	13	1/5	20
p6	1/15	7	0/5	0
p7	1/15	7	0/5	0
p8	1/15	7	0/5	0
p9	0/15	0	2/5	40
p10	6/15	40	2/5	40
p11	4/15	27	0/5	0
p12	6/14	43	2/5	40
p13	3/14	21	0/4	0
p14	11/14	79	2/4	50
p15	10/14	71	2/4	50

ES 2 594 454 T3

p16	9/13	69	4/4	100
p17	5/13	38	2/2	50
p18	1/13	8	1/4	25
p19	2/13	15	1/4	25

La Figura 1 muestra la proporción de casos de TB activa y sujetos con LTBI que respondieron a la combinación de péptidos Rv3615c que responden a cada uno de los péptidos individuales. La Figura 1 es una representación gráfica de los datos de la Tabla 4.

- 5 • Esta es el primer mapeo de la localización de epítomos de células T en Rv3615c en seres humanos infectados con M. tb, y se define aquí para ambos casos de TB activa y sujetos con LTBI.
- El mapeo indica 2 regiones que contienen epítomos de células T ampliamente reconocidos de utilidad diagnóstica: una región hacia el terminal carboxilo (péptidos 9 -19; residuos de aminoácidos 46 - 95) y una segunda región hacia la terminal amino (péptidos 2-5; residuos de aminoácidos 6-36).
- 10 • La primera región de concentración de epítomos de células T ampliamente reconocidos no se observó en el ganado por Sidders y colaboradores.
- Este mapa de epítomos es confiable y relevante para los humanos porque (a) se lleva a cabo en seres humanos, (b) se basó en aproximadamente 20 sujetos (por lo tanto, mucho más confiable y definitivo que los datos de Sidders y colaboradores que se basaron en sólo 3 vacas y (c) es de una población humana genéticamente heterogéneas consanguínea incluidas las personas de diferentes grupos étnicos distintos (incluyendo blancos caucásicos, asiáticos del sur, negros africanos).
- 15 • Se ilustra la ubicación de los epítomos en TB activa por primera vez en cualquier mamífero (Sidders y colaboradores estudiaron sólo ganado con pruebas cutáneas positivas).
- 20 • Utiliza péptidos de 15 mer superpuestos por 10 aminoácidos y, por tanto, es distinto, y tiene una resolución más alta que los mapas que utilizan péptidos más largos.

La Figura 2A muestra la frecuencia de células formadoras de manchas de IFN-gamma (SFC) que responden a cada uno de los péptidos de 15 mer constitutivos de Rv3615c en 15 casos de TB activa. La Figura 2B muestra la frecuencia de células formadoras de manchas de IFN-gamma (SFC) que responden a cada uno de los péptidos constituyentes de 15 mer de Rv3615c en 5 sujetos con LTBI.

- 25 La Figura 3 muestra un análisis FACS posterior al ensayo de captura de citoquinas (Miltenyi Biotech, Alemania) de las células T CD4 positivas secretoras de IFN-gamma, IL-2 o ambos en respuesta a la estimulación durante 6 horas con péptidos Rv3615c (y, como controles, combinación de péptidos ESAT-6, combinación de péptidos CFP-10, enterotoxina estafilocócica B [SEB, control positivo], sin estímulo [neg, control negativo]). Las células T CD4 que responden a los péptidos Rv3615c (p14 y p16 en este ejemplo) de un sujeto T416 (LTBI) perteneciente a 3 subconjuntos distintos:
- 30 células T que secretan tanto IFN-gamma como IL-2 (población dominante), las células T secretoras de IL-2 solamente (segunda población más grande) y las células T secretoras de IFN-gamma solamente (población más pequeña).

La Figura 4 muestra las proporciones de células T CD4 y CD8 que segregan IFN-gamma en respuesta a péptidos Rv3615c p2, p10, p12, p14 y p16. Los casos de tuberculosis son T134; T137; T116; T266; T413. Los casos con LTBI son T263; T416.

- 35 La Figura 5 muestra la proporción de células T CD4 que secretan solamente IFN-gamma, IL-2 solamente y tanto IFN-gamma como IL-2 en respuesta a los péptidos Rv3615c p2, p10, p12, p14 y p16. Los casos con TB son T134; T137; T116; T266; T413. Los casos con LTBI son T263; T416.

- 40 La Figura 6 muestra la proporción de células T CD8 que secretan solamente IFN-gamma, IL-2 solamente y tanto IFN-gamma como IL-2 en respuesta a los péptidos Rv3615c p2, p10, p12, p14 y p16. Los casos con TB son T134; T137; T116; T266; T413. Los casos con LTBI son T263; T416.

La Figura 7 muestra la disminución de la respuesta con ELISpot ex vivo de IFN-gamma a la combinación de péptidos Rv3615c después de iniciar el tratamiento anti-TB, en paralelo con el descenso de la carga antigénica y la carga

ES 2 594 454 T3

bacteriana. En la Figura 7, N = 1 para T126 no hay datos de rv2654 en 0,25 y 2,5 meses.

Listado de secuencias

<110> Lalvani, Ajit

<120> Ensayo diagnóstico y vacuna

5 <130> BM/JPH/P16163wo

<150> GB0906215.9

<151> 2009-09-04

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1

15 Met Thr Glu Asn Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu
1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

20 <400> 2

Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala Ser His His Asp
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 3

Arg Leu Gly Val Leu Ala Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

ES 2 594 454 T3

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

Ala Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val
1 5 10 15

5 <210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

10 Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala Ala Ala Gly
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

15 <400> 6

Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 7

Glu Ala Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly
1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

25 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 8

Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys Ser Gln
1 5 10 15

<210> 9

ES 2 594 454 T3

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

5 Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

10 <400> 10

Pro Tyr Cys Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11

Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala Leu
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 12

Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala Leu Gly Ser Ser Leu His
1 5 10 15

<210> 13

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 13

Ala His Asn Ala Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp
1 5 10 15

ES 2 594 454 T3

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 14

Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 15

Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu Arg Ile Ala Ala Lys
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 16

Leu Ala Lys Ser Leu Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala
1 5 10 15

<210> 17

20 <211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 17

Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg
1 5 10 15

25

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 594 454 T3

<400> 18

Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys Ala Ile Asp Gly
1 5 10 15

<210> 19

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 19

Asp Glu Ala Trp Arg Lys Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 20

10 <211> 103

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 20

Met Thr Glu Asn Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala
1 5 10 15

Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala
20 25 30

Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys
35 40 45

Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala
50 55 60

Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
65 70 75 80

Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys
85 90 95

Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr
100

15

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico de infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un humano, o para determinar que un humano ha sido expuesto a *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende:
 - (i) poner en contacto las células T de dicho ser humano con una o más de
 - 5 (a) un péptido que tiene las secuencias enumeradas como la SEQ ID NO: 20
 - (b) un péptido que tiene o comprende la secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos del péptido enumerado como la SEQ ID NO: 20; o
 - (c) un péptido que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 70% con una secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20, en donde el péptido es capaz de unirse a un receptor de
 - 10 células T que reconoce un péptido como se define en (a) o (b)
 - y poner en contacto las células T de dicho ser humano con las células T con al menos un antígeno de células T de *Mycobacterium tuberculosis*, en donde al menos un antígeno es ESAT-6 o fragmentos del mismo que son de al menos 8 aminoácidos de longitud o CFP10 o fragmentos del mismo que son de al menos 8 aminoácidos de longitud, pero no tanto ESAT-6 como CFP10; y
 - 15 (ii) determinar si cualquiera de dichas células T reconoce a dicho péptido, en donde las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo *in vitro*.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método aumenta la sensibilidad de una prueba de diagnóstico para diagnosticar una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un humano, en donde dicha prueba de diagnóstico comprende adicionalmente poner en contacto las células T de dicho humano con un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* que no es Rv3615c.
 - 20
3. Un método para evaluar o controlar la inmunogenicidad o eficacia de una vacuna contra una infección por *Mycobacterium tuberculosis* o enfermedad tuberculosa que comprende
 - (i) poner en contacto las células T de un ser humano con una o más de
 - (a) un péptido que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20
 - 25 (b) un péptido que tiene o comprende la secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20; o
 - (c) un péptido que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 70% con una secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20, en donde el péptido es capaz de unirse a un receptor de células T que reconoce un péptido como se define en (a) o (b); y
 - 30 (ii) determinar si cualquiera de dichas células T reconoce a dicho péptido, en donde las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo *in vitro*.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la etapa (i) comprende además poner en contacto dichas células T con uno o más antígenos de células T de *Mycobacterium tuberculosis* o con un análogo(s) de dicho(s) antígeno(s) que es capaz de unirse a un receptor de células T que reconoce dicho(s) antígeno(s).
 - 35
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dichos uno o más antígenos de células T incluyen antígenos codificados por la región RD-1 o RD-2, cuyos antígenos son preferentemente ESAT-6 y/o CFP10; o fragmentos de los mismos que son al menos de 8 aminoácidos de longitud.
 - 40
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa (i) comprende poner en contacto dicha muestra de células T con dos o más péptidos diferentes, teniendo cada uno de los cuales la secuencia de al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO 20.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde los péptidos de, o análogos de, al menos cinco diferentes antígenos se ponen en contacto con las células T.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde uno o más de los péptidos:

(i) se representa por las SEQ ID NOs 1 a 19, o

(ii) se une a un receptor de células T que reconoce (i),

se ponen en contacto con las células T.

5 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el reconocimiento de dicho péptido por dichas células T es determina detectando la secreción de una o más citoquinas de las células T o una quimoquina a partir de monocitos en una muestra que contiene las células T.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha citoquina se detecta permitiendo que dicha citoquina se una a un anticuerpo específico inmovilizado a dicha citoquina y la detección de la presencia del complejo de anticuerpo/citoquina.

10 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células T son células ex vivo recién aisladas.

12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dichas células T han sido cultivadas *in vitro*.

15 13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la infección por *Mycobacterium tuberculosis* es infección por TB latente (LTBI).

14. Un método para determinar la etapa de infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un humano que comprende determinar si hay una respuesta diferencial de células T para diferentes antígenos en el ser humano, en donde se miden las respuestas de células T a Rv3615c y una de ESAT-6 y CFP10, pero no tanto para ESAT-6 como para CFP10, en donde la etapa de determinación se lleva a cabo *in vitro*.

20

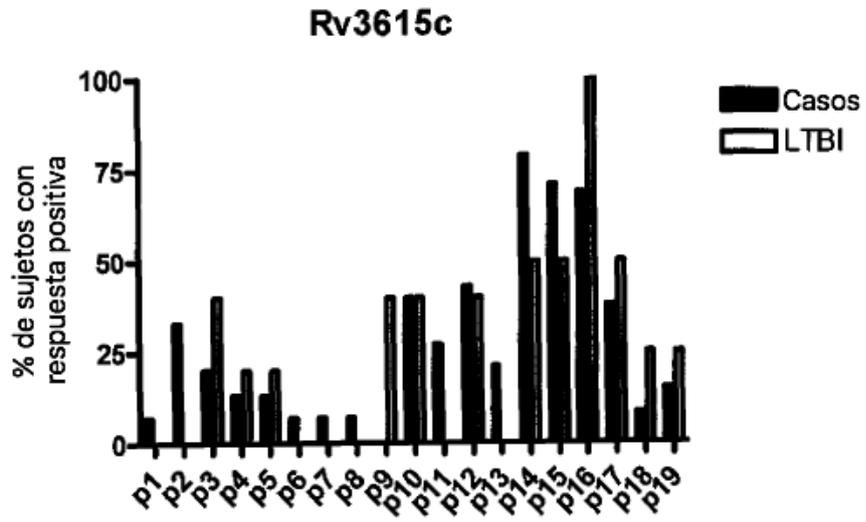


Figura 1

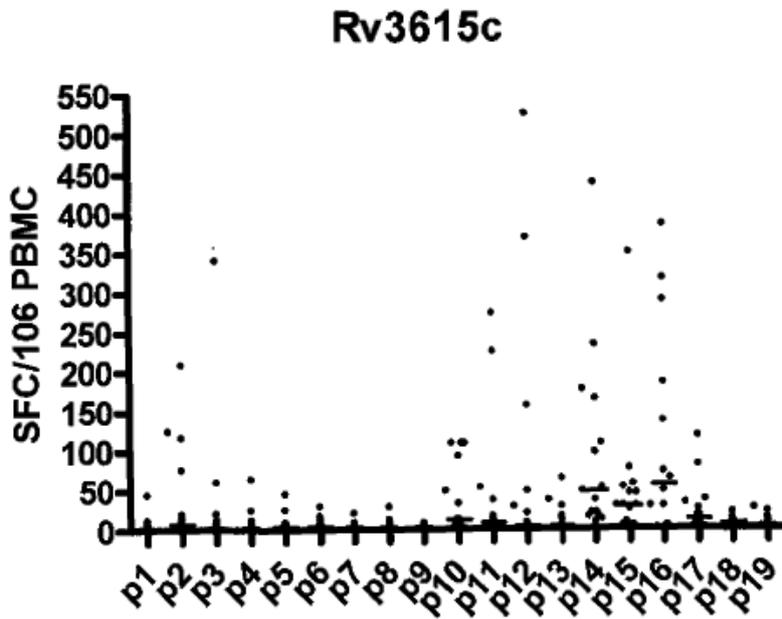


Figura 2A

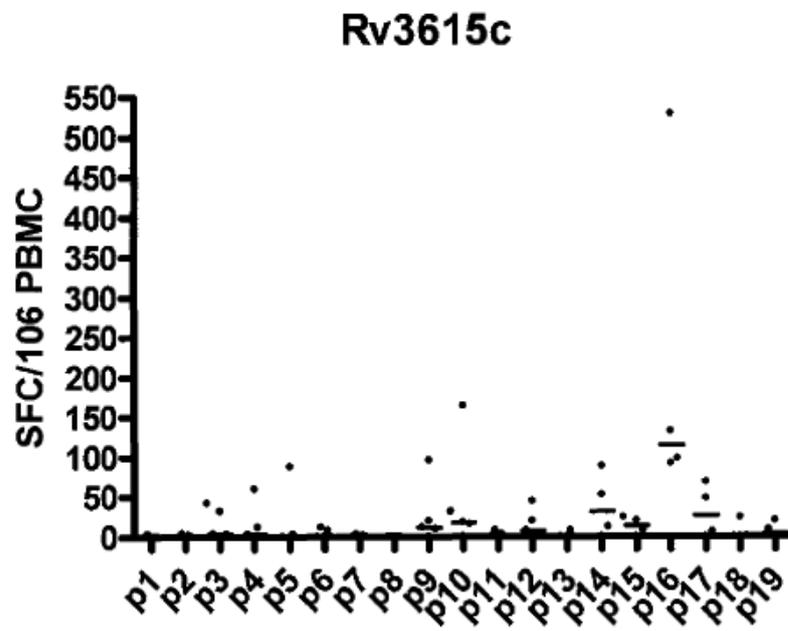


Figura 2B

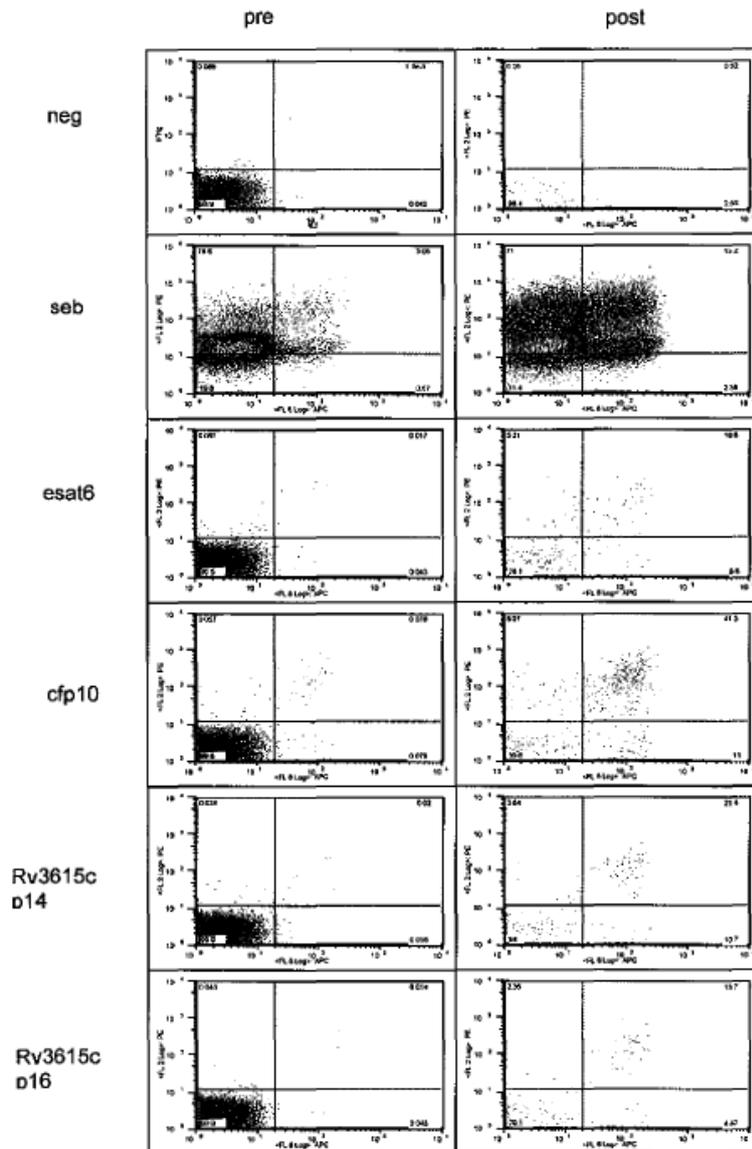


Figura 3

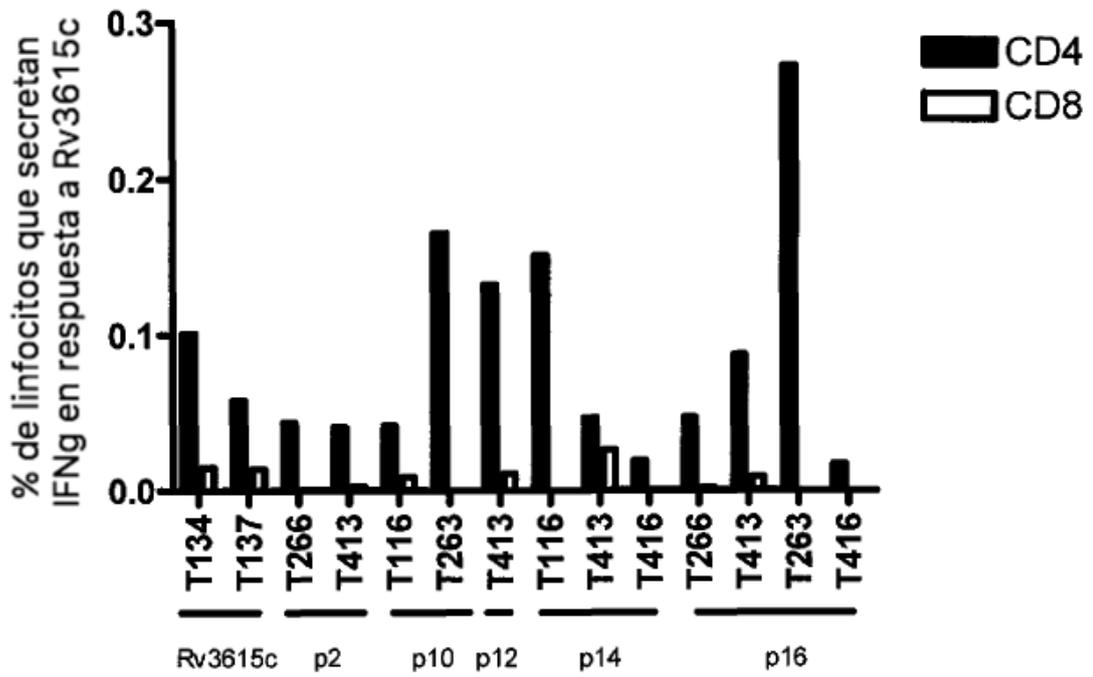


Figura 4

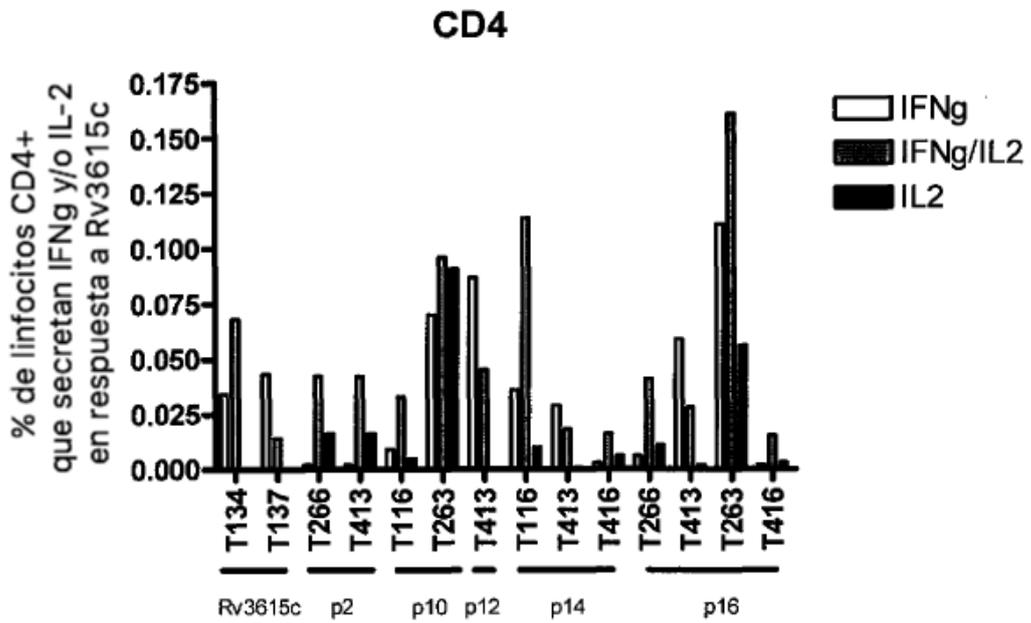


Figura 5

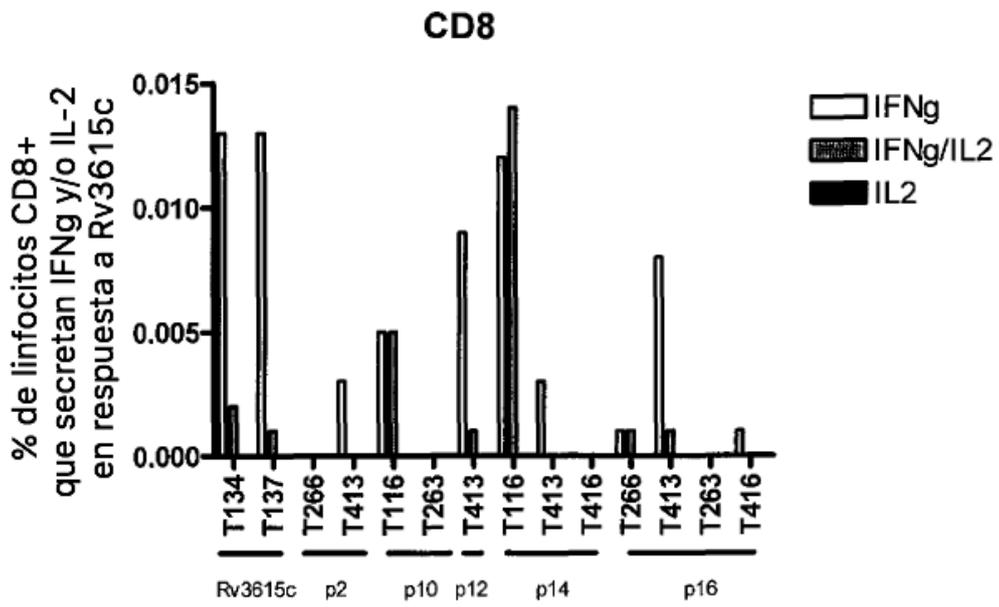


Figura 6

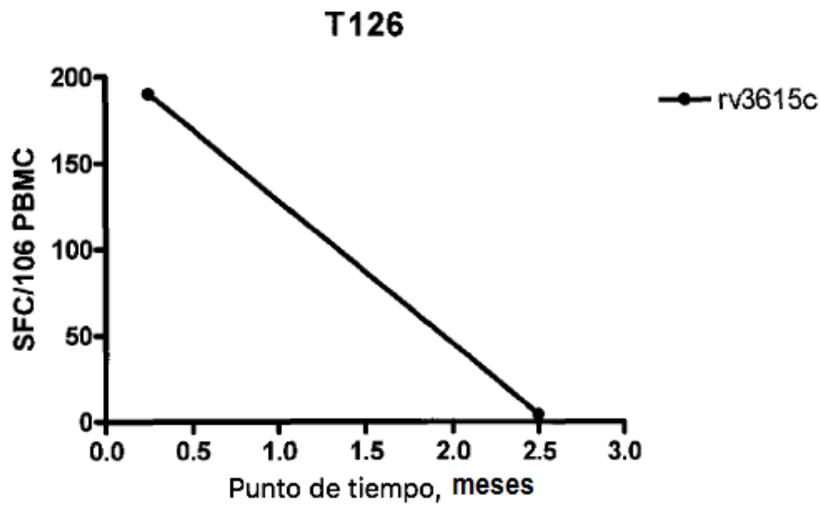


Figura 7