

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 070**

51 Int. Cl.:

A61K 39/04 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2006 E 09172905 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2163255**

54 Título: **Vacunas para tuberculosis que comprenden antígenos expresados durante la fase de infección latente**

30 Prioridad:

23.06.2005 DK 200500924

05.10.2005 DK 200501393

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

19.12.2017

73 Titular/es:

STATENS SERUM INSTITUT (100.0%)

Artillerivej 5

2300 Copenhagen S , DK

72 Inventor/es:

VINGSBO-LUNDBERG, CARINA;

AAGAARD, CLAUS y

ANDERSEN, PETER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 647 070 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

Vacunas para tuberculosis que comprenden antígenos expresados durante la fase de infección latente

Campo de la invención

5 La presente invención da a conocer antígenos inducidos durante la inanición o nuevos polipéptidos de fusión de polipéptidos inmunógenos basados en polipéptidos derivados de *Mycobacterium tuberculosis* inducidos durante la inanición, el uso de uno o más de los polipéptidos de fusión o antígenos inducidos durante la inanición de la invención para la preparación de una vacuna para utilizarse para la administración a una persona/animal y las vacunas como tales.

Antecedentes de la invención

10 La tuberculosis humana causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) es un grave problema de salud mundial, responsable de aproximadamente 3 millones de muertes al año, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. La incidencia a nivel mundial de nuevos casos de tuberculosis (TB) había estado descendiendo durante las décadas de 1960 y 1970 pero durante años recientes esta tendencia ha cambiado marcadamente debido en parte a la llegada del SIDA y la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos de *M. tuberculosis*.

15 La única vacuna actualmente disponible para uso clínico es BCG, una vacuna cuya eficacia permanece siendo un tema de controversia. La BCG induce generalmente un alto nivel de resistencia adquirida en modelos animales de TB y en humanos es protectora contra las formas diseminadas de tuberculosis tales como meningitis y tuberculosis miliar. Cuando se administra a niños jóvenes, es protectora contra la tuberculosis durante varios años pero luego la eficacia se desvanece. Una comparación de varias pruebas controladas reveló que la eficacia de protección de la BCG en adultos varió dramáticamente con un intervalo de eficacia desde la ineficacia hasta 80% de protección. Esto hace que el desarrollo de una vacuna nueva y mejorada contra *M. tuberculosis* sea un tema urgente, al cual la Organización Mundial de la Salud le ha dado una prioridad muy alta.

25 Se han hecho muchos intentos para definir sustancias micobacterianas protectoras y diferentes investigadores han reportado una resistencia incrementada después de la vacunación experimental. La *M. tuberculosis* mantiene, así como también secreta, varias proteínas de relevancia potencial para la generación de una nueva vacuna contra la *M. tuberculosis*. La búsqueda de moléculas candidatas se ha enfocado principalmente en proteínas liberadas de la división de bacterias. A pesar de la caracterización de un gran número de estas proteínas solo se ha demostrado que algunas de éstas inducen una respuesta inmune protectora como vacunas de subunidades en modelos animales, más notablemente ESAT-6 y Ag85B (Brandt y colaboradores 2000). Sin embargo, la demostración de una respuesta inmune, protectora, específica a largo plazo con la potencia de la BCG o la capacidad de refuerzo en una persona que se vacuna con la BCG todavía no se ha logrado. En el mejor de los casos, el refuerzo de la BCG con la BCG no tiene efecto [Colditz, 1994]. El refuerzo de la BCG se ha realizado con Ag85a (Brooks y colaboradores IAI 2001; WO0204018) en una cepa endogámica de ratón conduciendo a alguna protección, aunque en comparación con la BCG sola no fue significativamente mejor. Puesto que la BCG necesita dividir y secretar proteínas a fin de inducir una respuesta inmune protectora, la carencia de un efecto de refuerzo es principalmente debido a ya sea la sensibilización con micobacterias ambientales o una respuesta inmune residual de la vacunación primaria con la BCG. Ambos eventos conducen a una respuesta inmune rápida contra la BCG y por lo tanto una inhibición rápida del crecimiento y la eliminación de la BCG.

40 El curso de una infección con *M. tuberculosis* pasa esencialmente a través de 3 fases. Durante la fase aguda, las bacterias proliferan en los órganos, hasta que se incrementa la respuesta inmune. Los linfocitos CD4 T sensibilizados específicamente median el control de la infección y la molécula mediadora mucho más importante parece ser interferón gamma (IFN-gamma). Las cargas bacterianas comienzan a descender y se establece una fase latente donde la carga bacteriana se mantiene estable a un nivel bajo. En esta fase, la *M. tuberculosis* va de una multiplicación activa a un letargo, no reproduciéndose esencialmente y permaneciendo dentro del granuloma. En algunos casos, la infección va a la fase de reactivación, donde las bacterias letárgicas comienzan la reproducción nuevamente. Se ha sugerido que la transición de *M. tuberculosis* de la infección primaria a la latencia es realizada por cambios en la expresión de genes (Honer zu Bentrup, 2001). También es probable que ocurran cambios en la especificidad hacia antígenos de la respuesta inmune, ya que las bacterias modulan la expresión de genes durante su transición de una reproducción activa al letargo. El carácter completo de la respuesta inmune que controla la infección latente y los factores que conducen a la reactivación se desconocen en su mayor parte. Sin embargo, existe alguna evidencia para un cambio en los tipos de células dominantes responsables. Puesto que las células CD4 T son esenciales y suficientes para controlar la infección durante la fase aguda, los estudios sugieren que las respuestas de las células CD8 T son más importantes en la fase latente.

55 En 1998, Cole y colaboradores publicaron la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* y predijeron la presencia de aproximadamente 4000 marcos de lectura abiertos (Cole y colaboradores 1998) dando a conocer secuencias de nucleótidos y secuencias de proteínas putativas. Sin embargo, es importante destacar que esta información de secuencias no puede utilizarse para predecir si el ADN es traducido o expresado como proteínas in vivo. Se sabe que algunos genes de *M. tuberculosis* son regulados por incremento bajo condiciones que imitan una

latencia. Sin embargo, éstos son un subconjunto limitado de la expresión de genes total durante la infección latente. Además, como una persona experta en el campo apreciará fácilmente, la expresión de un gen no es suficiente para hacerlo un buen candidato para vacuna. La única manera para determinar si una proteína es reconocida por el sistema inmune durante una infección latente con *M. tuberculosis* es producir una proteína dada y someterla a prueba en un ensayo apropiado como se describe en este documento. Una variedad de proteínas son de importancia particular y tienen potencial para ser antígenos tardíos (antígenos reconocidos durante la infección latente) puesto que son expresados principalmente en un tiempo relativamente prolongado después de la infección donde el sistema inmune ha montado la primera defensa adaptable y el ambiente se ha tornado más hostil para las micobacterias. Las condiciones hipóxicas del cultivo in vitro, las cuales imitan las condiciones de baja tensión de oxígeno han sido sugeridas previamente como relevantes en este respecto y se han utilizado para analizar los cambios en la expresión de genes. Se ha descubierto que una variedad de antígenos son inducidos o regulados por incremento marcadamente bajo estas condiciones por ejemplo el antígeno de 16 kDa α -crystallin (Sherman 2001), Rv2660c y Rv2659c (Betts, 2002) (solicitud propia). Otro estímulo ambiental el cual puede ser de interés particular es la inanición diseñada para reflejar qué nutrientes son restringidos en el granuloma (la ubicación de la infección latente) y por lo tanto qué productos expresados por genes regulados por incremento bajo inanición pueden ser de interés particular como objetivos de antígenos durante la etapa latente de la infección.

De más de 200 mil antígenos que se sabe que son expresados durante la infección primaria y que se sometieron a prueba como vacunas, menos de media docena tienen un potencial significativo demostrado. Hasta ahora se ha mostrado que solo un antígeno tiene algún potencial como vacuna terapéutica (Lowrie, 1999). Sin embargo, esta vacuna solo funciona si es administrada como una vacuna de ADN y ha probado ser controversial, con otros grupos que reclaman que la vacunación utilizando este protocolo induce ya sea la protección no específica o empeora aún la enfermedad (Turner, 2000). En contraste, los polipéptidos de fusión descritos en la invención pueden incorporarse en una vacuna que utiliza una tecnología de vacunación bien reconocida, como se demuestra en los ejemplos proporcionados.

Además, puesto que las vacunas contra la TB no dan por resultado una inmunidad esterilizante preferiblemente que el control de la infección a un nivel subclínico (dando por resultado con lo cual el establecimiento subsecuente de una infección latente), una vacuna de múltiples fases que combina componentes con actividad profiláctica y terapéutica se describe en esta invención. Después de la vacunación profiláctica convencional, la evasión de la respuesta inmune primaria y el desarrollo subsecuente de una enfermedad latente se debe probablemente al menos en parte al cambio en el perfil antigénico de las bacterias invasoras. De esta manera, la vacunación con antígenos asociados con la TB latente debe prevenir o reducir el establecimiento de una infección latente y por lo tanto, una vacuna que incorpora antígenos expresados por las bacterias tanto en la primera fase de crecimiento logarítmico como durante la enfermedad latente debe mejorar la inmunidad a largo plazo cuando se utiliza como una vacuna profiláctica. Obviamente, esta vacuna de múltiples fases también será eficiente como una vacuna terapéutica atendiendo con lo cual el problema referente a que la mayoría de la población en el tercer mundo quien recibiría en el futuro una vacuna contra la TB ya estaría infectada de manera latente.

El documento WO 03004520 desvela vacunas de tuberculosis que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido inducido durante la inanición. Se desvelan ciento cuarenta (140) genes de *M. tuberculosis* que están regulados positivamente en condiciones de privación de nutrientes y de oxígeno limitado.

Sumario de la invención

La invención se refiere a una vacuna que comprende el polipéptido de fusión que comprende:

- i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (RV2660), o
- ii) uno o más fragmentos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 que comprende un epítipo de linfocitos T o un epítipo de linfocitos B, o
- iii) polipéptidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % con i) o ii) que comprenden un epítipo de linfocitos T o linfocitos B,

y en la que el polipéptido de fusión se construye a partir de una combinación de uno o más antígenos inducidos durante la inanición con uno o más antígenos de *M. tuberculosis*.

En una realización, la invención se refiere a la vacuna, en la que dicho antígeno o uno o más fragmentos de dicho antígeno se fusionan con uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en ESAT6, Ag85B, TB10.4 y Ag85A, en cualquier combinación y orden de posición.

En realizaciones adicionales, la invención se refiere a la vacuna en la que el polipéptido de fusión comprende 2 polipéptidos inmunógenos diferentes, donde el polipéptido de fusión comprende 3 polipéptidos inmunógenos diferentes o donde el polipéptido de fusión comprende 4 polipéptidos inmunógenos diferentes.

En otras realizaciones más, la invención se refiere a la vacuna que comprende polipéptidos de fusión con combinaciones de ESAT6-Ag85A-X, ESAT6-Ag85B-X, Ag85A-X, Ag85B-X, TB10-Ag85A-X, TB10-Ag85B-X donde X es SEQ ID NO: 12 y donde el orden de las unidades de antígenos puede ser de cualquier combinación.

En una realización adicional, la invención se refiere a la vacuna, que comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionada de las secuencias de aminoácidos que codifican los siguientes polipéptidos de fusión:

- 5 Ag85B-ESAT6-Rv2660c;
- Ag85B-TB 10.4-Rv2660c;
- Ag85B-Rv2660c;
- Ag85A-Rv2660c;
- Ag85A-ESAT6-Rv2660c;
- Ag85A-TB10.4-Rv2660c;
- 10 Rv2660c-Rv2659c;
- Ag85B-ESAT6-Rv2660c-Rv2659c;

en cualquier orden de las unidades polipeptídicas.

En otro aspecto, la invención se refiere a la vacuna para uso profiláctico, uso terapéutico o para usar para reforzar la inmunidad de vacunación de BCG previa.

- 15 En una realización, la vacuna va a administrarse por vía intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o mucosa.

En un aspecto adicional, la invención también se refiere al polipéptido de fusión como se ha definido anteriormente.

Finalmente, un aspecto de la invención es una vacuna que comprende un fragmento de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno inducido durante la inanición o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente.

20 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención da a conocer una vacuna que comprende un polipéptido de fusión que comprende;

- 25 i) la secuencia de aminoácidos de RV2660 (SEQ ID NO: 12), o
- ii) uno o más fragmentos de la secuencia de aminoácidos de RV2660 (SEQ ID NO: 12) que comprende un epítipo de linfocitos T o un epítipo de linfocitos B, o
- iii) polipéptidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % con i) o ii) que comprenden un epítipo de linfocitos T o linfocitos B,

y en la que el polipéptido de fusión se construye a partir de una combinación de uno o más antígenos inducidos durante la inanición con uno o más antígenos de *M. tuberculosis*.

- 30 Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de estos antígenos inducidos durante la inanición (regulados por incremento más de 6.5 veces durante la inanición o unidos genéticamente a un gen inducido durante la inanición) aparecen en el listado de secuencias que sigue:

Antígeno inducido durante la inanición	SEQ ID NO de ADN	SEQ ID NO de aa
Rv2655	1	2
Rv2656	3	4
Rv2657	5	6
Rv2658	7	8
Rv2659c	9	10
Rv2660c	11	12
Rv2661	13	14
Rv2662	15	16
Rv2663	17	18

ES 2 647 070 T3

(continuación)

Antígeno inducido durante la inanición	SEQ ID NO de ADN	SEQ ID NO de aa
Rv0188	19	20
Rv3290c	21	22
Rv3289c	23	24
Rv2034	25	26
Rv2169c	27	28
Rv0116c	29	30
Rv2558	31	32
Rv1152	33	34
Rv3291c	35	36
Rv1284	37	38
Rv1954c	39	40
Rv3810	41	42
Rv2517c	43	44
Rv3288c	45	46
Rv0789c	47	48
Rv1955	49	50
Rv3735	51	52
Rv3675	53	54
Rv2270	55	56
Rv2050	57	58
Rv3287c	59	60
Rv2557	61	62
Rv0122	63	64
Rv2497c	65	66
Rv1250	67	68
Rv1552	69	70
Rv2526	71	72
Rv1809	73	74
Rv0918	75	76
Rv0516c	77	78

ES 2 647 070 T3

(continuación)

Antígeno inducido durante la inanición	SEQ ID NO de ADN	SEQ ID NO de aa
Rv2745c	79	80
Rv1472	81	82
Rv1660	83	84
Rv2302	85	86

5 En el presente contexto, el polipéptido inmunógeno individual basado en polipéptidos derivados de *M. tuberculosis* se denomina una "unidad" del polipéptido de fusión. La fusión puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o aún 10 unidades diferentes.

10 El orden de las unidades del polipéptido de fusión puede ser cualquier combinación. En términos del orden, los polipéptidos de fusión de todos los antígenos anteriores en cualquier combinación están dentro del alcance de la presente invención. Los polipéptidos de fusión de la invención son útiles para la preparación de una composición inmunógena, vacuna o composición farmacéutica, en particular una vacuna reforzadora de la BCG, como será descrito detalladamente a continuación.

Los polipéptidos preferidos que constituyen unidades de los polipéptidos de fusión junto con los polipéptidos inducidos durante la inanición tienen el siguiente número de identidad de Sanger y secuencias de aminoácidos:

<u>Nombre común</u>	<u>Identidad de Sanger</u>
ESAT6	Rv3875
TB10.4	Rv0288
Ag85A	Rv3804c
Ag85B	Rv1886c
ORF2c	Rv3871 (c-terminal)
TB13.0	Rv1036
TB9.56	Rv0285
TB9.8	Rv0287

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos
ESAT6	MTEQQWNFAG IEAAASAIQG NVTSIHSLLD EGKQSLTKLA AAWGGSSEA YQGVQKQWDA TATELNALQ NLARTISEAG QAMASTEENV TGMFA

ES 2 647 070 T3

(continuación)

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos
Ag85A	SRGPLP VEYLQVPSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMPVGGQSS FYSDWYQPAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSVVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS DMWGPKEDEPA WQRNDPLLNV GKLIANTRV WVYCGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNQVDFDP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA
Ag85B	SRPGLPVEY LQVPSPSMGR DIKVQFQSGG NNPAVYLLD GLRAQDDYNG WDINTPAFEW YYQSGLSIVM PVGGQSSFYS DWYSPACGKA GCQTYKWETF LTSELPQWLS ANRAVKPTGS AAIGLSMAGS SAMILAAYHP QQFIYAGSLS ALLDPSQGMG PSLIGLAMGD AGGYKAADMW GPSSDPAWER NDPTQQIPKL VANNTLWVY CGNGTPNELG GANIPAEFLE NFVRSNLKF QDAYNAAGGH NAVFNFPNG THSWEYWGAQ LNAMKGDLS SLGAG
TB10.4	MSQIMYNYPALMLGHAGDMAG YAGTLQSLGA EIAVEQAALQ SAWQGDGTGIT YQAWQAQWNQ AMEDLVRAYH AMSSTHEANT MAMMARDTAE AAKWGG
ORF2c	MIVGAAGGMP PMAPLAPLLP AAADIGLHII VTCQMSQAYK ATMDKFBVGA FGSGAPTMFL SGEKQEFPS EFVKRRPPG QAFLVSPDGK VIQAPYIEPP EEVFAAPPSA G
Rv1036	LIPGRMVLNW EDGLNALVAE GIEAIVFRTL GDQCWLWESL LPDEVRRPE ELARVDALLD DPAFFAPFVP FFDPRRGRPS TPMEVYLQLM FVKFRYRLGY ESLCREVADS IT
Rv0285	MTLRVVPEGL AAASAAVEAL TARLAAHAS AAPVITAVVP PAADPVSLQT AAGFSAQGV HAVVTAEGVE ELGRAGVGVG ESGASYLAGD AAAAATYGVV GG

(continuación)

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos
Rv0287	MSLLDAHIPQ LVSQSAFAA KAGLMRHTIG QAEQAAMSAQ AFHQGESSAA FQAAHARFVA AAAKVNTLLD VAQANLGEAA GTYVAADAAA ASTYTGF

Las combinaciones preferidas de polipéptidos de fusión comprenden los siguientes polipéptidos en varias combinaciones en orden de unidades con uno o más antígenos inducidos durante la inanición. (X): ESAT6-Ag85A-X, ESAT6-Ag85B-X, Ag8A-X, Ag85B-X, TB10-Ag85A-X, TB10-Ag85B-X donde X es cualquiera de los antígenos inducidos durante la inanición y donde el orden de las unidades de antígenos puede ser cualquier combinación por ejemplo donde el orden es invertido o X se coloca a la mitad, etcétera.

Pero el polipéptido de fusión podría construirse a partir de cualquier otra combinación de uno o más antígenos inducidos durante la inanición con uno o más antígenos de *M. tuberculosis*.

Dentro del alcance de la presente invención se encuentra un análogo de un polipéptido de fusión el cual tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos 80% con cualquier parte de cualquiera de los polipéptidos de fusión de la invención y el cual es inmunógeno y una secuencia de ácido nucleico la cual codifica este polipéptido. Estos análogos están comprendidos dentro del término "polipéptido de la invención" o "polipéptido de fusión de la invención", términos que se utilizan de manera intercambiable por toda la especificación y las reivindicaciones. Por el término "secuencia de ácido nucleico de la invención" se propone una secuencia de ácido nucleico que codifica este polipéptido. Además, dentro del alcance de la presente invención se encuentra el(los) péptido(s) corto(s) o largo(s) solapante(s) o no solapante(s) el(los) cual(es) tiene(n) una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos 80% con cualquiera de los polipéptidos de fusión de la invención y el(los) cual(es) es(son) inmunógeno(s).

Una modalidad actualmente preferida de la invención es una vacuna para reforzar la inmunidad de una vacunación previa con la BCG, es decir la vacuna se administra a individuos vacunados previamente con la BCG.

Este primer aspecto de la invención comprende una variante del antígeno inducido durante la inanición mencionado anteriormente o un polipéptido de fusión el cual se vuelve lípido para permitir un efecto autoadyuvante del polipéptido.

La vacuna de la invención se puede administrar por medio del suministro en las mucosas, por ejemplo por vía oral, nasal, bucal o tradicionalmente por vía intramuscular, intradérmica, por medio de una inyección subcutánea o por vía transdérmica o cualquier otra ruta adecuada, por ejemplo por vía rectal.

En otra modalidad, la invención da a conocer el uso de un antígeno inducido durante la inanición o un polipéptido de fusión como se definió anteriormente para la preparación de una composición inmunógena, vacuna o composición farmacéutica que se puede utilizar para una vacunación profiláctica junto con la BCG, una vacuna reforzadora o la vacunación terapéutica contra una infección causada por una micobacteria virulenta, por ejemplo por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium lepra* o *Mycobacterium ulcerans*. La descripción da a conocer una vacuna que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno inducido durante la inanición o un polipéptido de fusión como se definió anteriormente o comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria para el mismo que es capaz de hibridarse con la secuencia de ácido nucleico de la invención bajo condiciones restrictivas.

El fragmento de ácido nucleico es preferiblemente un fragmento de ADN. El fragmento se puede utilizar como una composición farmacéutica como se describe a continuación. La descripción da a conocer una vacuna que comprende un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la invención, insertado opcionalmente en un vector. La vacuna da por resultado la expresión in vivo de un antígeno por un animal, inclusive un ser humano, a quien se ha administrado la vacuna, la cantidad de antígeno expresado es efectiva para conferir una resistencia sustancialmente incrementada a la tuberculosis causada por micobacterias virulentas, por ejemplo por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium lepra* o *Mycobacterium ulcerans*, en un animal, inclusive un ser humano. La descripción da a conocer el uso de una vacuna que comprende un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la invención para una vacunación terapéutica contra la tuberculosis causada por una micobacteria virulenta. La descripción da a conocer una vacuna que se puede utilizar para la vacunación profiláctica junto con la BCG o una vacuna reforzadora para una persona vacunada previamente con la BCG para inmunizar un animal, inclusive un ser humano, contra la tuberculosis causada por una micobacteria virulenta, por ejemplo por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium lepra* o *Mycobacterium ulcerans*, que comprende como el componente efectivo un microorganismo que no es patógeno, tal como la BCG de vaccinia, adenovirus o *Mycobacterium bovis*, en donde al menos una copia de un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de fusión como se definió anteriormente

se ha incorporado en el microorganismo (por ejemplo se ha colocado en un plásmido o en el genoma) de una manera que permite que el microorganismo exprese y secrete opcionalmente el polipéptido de fusión. La descripción da a conocer un vector de expresión infeccioso, tal como la BCG de vaccinia, adenovirus o Mycobacterium bovis que comprende un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la invención y una célula transformada que alberga al menos este vector.

La descripción también se refiere a un método para inmunizar y reforzar la inmunidad de un animal, inclusive un ser humano, contra la tuberculosis causada por micobacterias virulentas, por ejemplo por Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium lepra o Mycobacterium ulcerans, el método comprende administrar al animal el polipéptido de fusión definido anteriormente, la composición inmunógena de acuerdo con la invención o la vacuna de acuerdo con la invención.

Además, la descripción se refiere a un método para tratar a un animal, inclusive un ser humano, que tiene tuberculosis, activa o latente, causada por micobacterias virulentas, por ejemplo por Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium lepra o Mycobacterium ulcerans, el método comprende administrar al animal la composición inmunógena, vacuna o composición farmacéutica como se definió anteriormente. La descripción da a conocer el uso de un antígeno inducido durante la inanición o un polipéptido de fusión o fragmento de ácido nucleico como se definió anteriormente para la preparación de una composición inmunógena, vacuna o composición farmacéutica en combinación con la BCG de M. bovis, por ejemplo para una vacunación profiláctica (inclusive de refuerzo) o terapéutica contra una infección causada por una micobacteria virulenta, por ejemplo por Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium lepra o Mycobacterium ulcerans.

La vacuna de acuerdo con la invención se puede utilizar profilácticamente en un sujeto que no está infectado con una micobacteria virulenta o en un individuo vacunado previamente con la BCG de M. tuberculosis o terapéuticamente en un sujeto infectado con una micobacteria virulenta.

Se debe entender que las modalidades del primer aspecto de la invención, tales como los polipéptidos inmunógenos descritos, también aplican a todos los otros aspectos de la invención; y viceversa.

Por toda esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprenden” o variaciones de la misma tales como “comprende” o “que comprende” implica la inclusión de un elemento establecido o número entero o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

DEFINICIONES

Inanición

Por el término “inanición” se entiende como la privación de un organismo de su fuente de carbono, nitrógeno o energía, cualquier combinación de los anteriores o aún todos éstos.

Proteínas inducidas durante la inanición

Por el término “proteínas inducidas durante la inanición” se entiende cualquier proteína que a nivel transcripcional o de proteínas es inducida (incrementada) al menos 6.5 veces después de la tensión de la micobacteria por la inanición.

Combinación con la BCG de M. bovis

Por el término “combinación con la BCG de M. bovis” se entiende la co-administración con cualquier cepa de la BCG de M. bovis que incluye Pasteur, Phipps, Frappier, Connaught, Tice, Denmark, Glaxo, Prague, Birkhaug, Sweden, Japan, Moreau y Russia en cantidades que conducen ya sea a una respuesta inmune específica significativamente incrementada o a una protección significativa en un modelo animal o un humano ya sea junto con uno o más de los polipéptidos de fusión definidos anteriormente o con uno o más de los fragmentos de ácido nucleico que los codifican o administrada al mismo tiempo pero en sitios o rutas separadas.

Refuerzo de la BCG de M. bovis

Por el término “refuerzo de la BCG de M. bovis” se entiende la administración de uno o más polipéptidos de fusión como se definió anteriormente o uno o más fragmentos de ácido nucleico que los codifican en cualquier período después de la vacunación con cualquier cepa de la BCG de M. bovis que incluye Pasteur, Phipps, Frappier, Connaught, Tice, Denmark, Glaxo, Prague, Birkhaug, Sweden, Japan, Moreau y Russia en cantidades que conducen ya sea a una respuesta inmune específica significativamente incrementada o una protección significativamente incrementada en un modelo animal o un humano.

Polipéptido

Un polipéptido preferido para utilizarse como una unidad de los polipéptidos de fusión de la presente invención es un polipéptido inmunógeno de *M. tuberculosis*. Este polipéptido puede basarse por ejemplo en un polipéptido derivado de la célula de *M. tuberculosis* y/o el producto filtrado del cultivo de *M. tuberculosis*. El polipéptido será normalmente un polipéptido recombinante o sintético y puede consistir del polipéptido inmunógeno, una porción inmunógena del mismo o puede contener secuencias adicionales. Las secuencias adicionales pueden derivarse del antígeno de *M. tuberculosis* nativo o pueden ser heterólogas y estas secuencias pueden ser, pero no es necesario que sean, inmunógenas.

El término “polipéptido de fusión” se entiende como un orden aleatorio de dos o más polipéptidos inmunógenos de *M. tuberculosis* o análogos del mismo fusionados con o sin un(unos) separador(es) de aminoácido de longitud y secuencia arbitrarias.

La palabra “polipéptido” en la presente invención debe tener su significado usual. Es decir, una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, inclusive una proteína de longitud completa, oligopéptido, péptido corto y fragmento del mismo y polipéptido de fusión, en donde los residuos de aminoácidos son unidos por enlaces de péptidos covalentes.

El polipéptido se puede modificar químicamente al someterse a la glicosilación, al someterse a la lipidación (por ejemplo por medio de la lipidación química con palmitoiloxi-succinimida como es descrito por Mowat y colaboradores 1991 o con cloruro de dodecanoilo como es descrito por Lustig y colaboradores 1976), al comprender grupos prostéticos o al contener aminoácidos adicionales tales como por ejemplo una etiqueta de his o un péptido de señal.

Cada polipéptido inmunógeno será caracterizado por aminoácidos específicos y será codificado por secuencias de ácido nucleico específicas. Dentro del alcance de la presente invención se encuentran estas secuencias y análogos y variantes producidos por medio de métodos recombinantes o sintéticos en donde estas secuencias de polipéptidos han sido modificadas por medio de la sustitución, inserción, adición o supresión de uno o más residuos de aminoácidos en el polipéptido recombinante mientras que aún son inmunógenas en cualquiera de los ensayos biológicos descritos en este documento.

Las sustituciones son preferiblemente “conservadoras”. Éstas se definen de acuerdo con la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí. Los aminoácidos en la tercera columna se indican en un código de una letra.

ALIFÁTICO	No polar	GAP
		ILV
	Sin carga polar	CSTM
		NQ
	Con carga polar	DE
		KR
AROMÁTICO		HFWY

Cada polipéptido es codificado por una secuencia de ácido nucleico específica. Dentro del alcance de la presente invención se encuentran los análogos y estas secuencias de ácido nucleico las cuales han sido modificadas por medio de la sustitución, inserción, adición o supresión de uno o más ácidos nucleicos. Las sustituciones son preferiblemente sustituciones taciturnas en el uso de codones lo cual no conducirá a ningún cambio en la secuencia de aminoácidos, pero se pueden introducir para mejorar la expresión de la proteína.

Fragmento de ácido nucleico

Por los términos “fragmento de ácido nucleico” y “secuencia de ácido nucleico” se entiende cualquier molécula de ácido nucleico que incluya ADN, ARN, ANB (ácidos nucleicos bloqueados), ANP, ARN, ARNdc e híbridos de ARN-ADN. También están incluidas las moléculas de ácido nucleico que comprenden nucleósidos que no son de origen natural. El término incluye moléculas de ácido nucleico de cualquier longitud por ejemplo de 10 a 10000 nucleótidos, dependiendo del uso. Cuando la molécula de ácido nucleico es para el uso como un producto farmacéutico, por ejemplo en la terapia de ADN, o para el uso en un método para producir un polipéptido de acuerdo con la invención, se utiliza preferiblemente una molécula que codifica al menos un epítipo, que tiene una longitud de aproximadamente 18 a aproximadamente 1000 nucleótidos, la molécula es insertada opcionalmente en un vector. Cuando la molécula de ácido nucleico se utiliza como una sonda, como un cebador o en una terapia antisentido, se utiliza preferiblemente una molécula que tiene una longitud de 10-100. De acuerdo con la invención, se pueden utilizar otras longitudes de molécula, por ejemplo una molécula que tiene al menos 12, 15, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o 1000 nucleótidos (o derivados de nucleótidos), o una molécula que tiene como máximo 10000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30 o 20 nucleótidos

(o derivados de nucleótidos).

El término “restrictivo” cuando se utiliza en conjunto con las condiciones de hibridación es como se define en el campo, es decir la hibridación se realiza a una temperatura no mayor de 15-20°C bajo el punto de fusión T_m, véase Sambrook y colaboradores, 1989, páginas 11.45-11.49. Preferiblemente, las condiciones son “sumamente restrictivas”, es decir 5-10°C bajo el punto de fusión T_m.

Identidad de secuencias

El término “identidad de secuencias” indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos de una longitud sustancialmente igual o entre dos secuencias de ácido nucleico de una longitud sustancialmente igual. Las dos secuencias a ser comparadas deben alinearse para el mejor ajuste posible con la inserción de espacios o alternativamente el truncamiento en los extremos de las secuencias de proteínas. La

identidad de secuencias se puede calcular como en $\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$, donde N_{dif} es el número total de residuos no

idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y en donde N_{ref} es el número de residuos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencias de 75% con la secuencia AATCAATC (N_{dif}=2 y N_{ref}=8). Un espacio se cuenta como falta de identidad del(los) residuo(s) específico(s), es decir la secuencia de ADN AGTGTC tendrá una identidad de secuencias de 75% con la secuencia de ADN AGTCAGTC (N_{dif}=2 y N_{ref}=8). La identidad de secuencias puede calcularse alternativamente por medio del programa BLAST por ejemplo el programa BLASTP (Pearson W.R y D.J. Lipman (1988))(www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). En una modalidad de la invención, el alineamiento se realiza con el método de alineamiento de secuencias ClustalW con parámetros por omisión como es descrito por Thompson J. y colaboradores 1994, disponible en <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>.

Un porcentaje mínimo preferido de identidad de secuencias es al menos 80%, tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% y al menos 99.5%. Preferiblemente, los números de sustituciones, inserciones, adiciones o supresiones de uno o más residuos de aminoácidos en el polipéptido de fusión están limitados, es decir no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sustituciones, no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 inserciones, no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 adiciones y no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 supresiones en comparación con las unidades de polipéptidos inmunógenos en base a los polipéptidos derivados de M. tuberculosis.

Porción inmunógena

El polipéptido de la invención comprende una porción inmunógena, tal como un epítipo para una célula B o una célula T. La porción inmunógena de un polipéptido inmunógeno es la parte del polipéptido, la cual produce una respuesta inmune en un animal o un ser humano y/o en una muestra biológica determinada por cualquiera de los ensayos biológicos descritos en este documento. La porción inmunógena de un polipéptido puede ser un epítipo de células T o un epítipo de células B. Las porciones inmunógenas pueden estar relacionadas con una o algunas partes relativamente pequeñas del polipéptido, pueden estar esparcidas por toda la secuencia del polipéptido o pueden estar situadas en partes específicas del polipéptido. Para algunos polipéptidos, se ha demostrado aún que los epítipos están esparcidos por todo el polipéptido cubriendo la secuencia completa (Ravn y colaboradores 1999).

A fin de identificar los epítipos de células T relevantes que son reconocidos durante una respuesta inmune, es posible utilizar un método de “fuerza bruta”: puesto que los epítipos de células T son lineales, los mutantes de supresión del polipéptido, si son construidos sistemáticamente, revelarán qué regiones del polipéptido son esenciales en el reconocimiento inmune, por ejemplo al sujetar estos mutantes de supresión por ejemplo al ensayo de IFN-(descrito en este documento). Otro método utiliza oligopéptidos solapantes para la detección de los epítipos de MHC clase II, preferiblemente sintéticos, que tienen una longitud de por ejemplo 20 residuos de aminoácidos derivados del polipéptido. Estos péptidos pueden someterse a prueba en ensayos biológicos (por ejemplo en el ensayo de IFN-(descrito en este documento) y algunos de éstos tendrán una respuesta positiva (y por lo cual serán inmunógenos) como es evidenciado por la presencia de un epítipo de célula T en el péptido. Para la detección de los epítipos de MHC clase I, es posible predecir los péptidos que se enlazarán (Stryhn y colaboradores 1996) y por lo tanto producirán sintéticamente estos péptidos y someterlos a prueba en ensayos biológicos relevantes por ejemplo el ensayo de IFN-(como es descrito en este documento). Los péptidos que tienen preferiblemente una longitud de por ejemplo 8 a 11 residuos de aminoácidos derivados del polipéptido. Los epítipos de células B se pueden determinar por medio del análisis del reconocimiento de células B para péptidos solapantes que cubren el polipéptido de interés como es descrito por ejemplo en Harboe y colaboradores 1998.

Las porciones inmunógenas de polipéptidos pueden ser reconocidas por una parte amplia (alta frecuencia) o por una parte menor (baja frecuencia) de la población humana genéticamente heterogénea. Además, algunas porciones inmunógenas inducen altas respuestas inmunológicas (dominantes), mientras que otras inducen respuestas más bajas, pero aún significativas (subdominantes). La alta frecuencia >< baja frecuencia puede relacionarse con la porción inmunógena que se enlaza a las moléculas de MHC ampliamente distribuidas (tipo HLA) o aún por las múltiples moléculas de MHC (Kilgus y colaboradores 1991, Sinigaglia y colaboradores 1988).

Análogos

Una característica común de los polipéptidos de fusión de la invención es su capacidad para inducir una respuesta inmunológica como se ilustra en los ejemplos. Se entiende que dentro del alcance de la presente invención se encuentran los análogos de un polipéptido de fusión de la invención producido por medio de la sustitución, inserción, adición o supresión que también es inmunógeno como se determina por medio de cualquiera de los ensayos descritos en este documento.

Sustancialmente puro

En el presente contexto, el término “polipéptido sustancialmente puro” significa una preparación de polipéptido que contiene a lo sumo 5% en peso de otro material de polipéptido con el cual está asociado de manera natural o durante una producción recombinante o sintética (se prefieren porcentajes más bajos de otro material de polipéptido, por ejemplo a lo sumo 4%, a lo sumo 3%, a lo sumo 2%, a lo sumo 1% y a lo sumo ½%). Se prefiere que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 96% puro, es decir que el polipéptido constituya al menos 96% en peso del material de polipéptido total presente en la preparación y se prefieren porcentajes más altos, tal como al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, al menos 99.25%, al menos 99.5% y al menos 99.75%. Se prefiere especialmente que el polipéptido esté en “forma esencialmente pura”, es decir que el polipéptido esté esencialmente libre de cualquier otro antígeno con el cual está asociado de manera natural, es decir que esté libre de cualquier otro antígeno de bacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis o una micobacteria virulenta. Esto se puede realizar al preparar el polipéptido por medio de métodos recombinantes en una célula hospedante que no es micobacteriana como será descrito en detalle posteriormente o al sintetizar el polipéptido por medio de los métodos bien conocidos de síntesis de péptidos en fase sólida o líquida, por ejemplo por medio del método descrito por Merrifield o variantes del mismo y al utilizar procedimientos de purificación apropiados que son bien conocidos para la persona de experiencia ordinaria en el campo.

Micobacteria virulenta individual infectada actualmente e individual inmune

Por el término “micobacteria virulenta” se entiende una bacteria capaz de causar la enfermedad de tuberculosis en un animal o en un ser humano. Los ejemplos de las micobacterias virulentas son *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium lepra* o *Mycobacterium ulcerans*. Los ejemplos de animales relevantes son ganado bovino, zarigüeyas, tejones, búfalos, leones, kurus y canguros.

Por “un animal o humano infectado actualmente con una bacteria virulenta” se entiende un individuo con una infección probada por medio de cultivo o microscópicamente con micobacterias virulentas y/o un individuo diagnosticado clínicamente con TB y quien es sensible a una quimioterapia anti-TB. Las diagnosis por medio de cultivo, microscopio y clínicas de TB son bien conocidas por cualquier persona experta en el campo.

Un individuo inmune se define como una persona o un animal el cual se ha librado de o ha controlado una infección con una micobacteria virulenta o ha recibido una vacunación con la BCG de *M. bovis*.

Inmunógeno

Un polipéptido inmunógeno se define como un polipéptido que induce una respuesta inmune. La respuesta inmune puede ser supervisada por medio de uno de los siguientes métodos:

Una respuesta celular in vitro se determina por la liberación de una citocina relevante tal como IFN-(, de linfocitos retirados de un animal o humano infectado actualmente o previamente con micobacterias virulentas o por la detección de la proliferación de estas células T. La inducción se realiza por la adición del polipéptido o la porción inmunógena a una suspensión que comprende de 1x10⁵ células a 3x10⁵ células por pocillo. Las células se aíslan de ya sea la sangre, el bazo, el hígado o el pulmón y la adición del polipéptido o la porción inmunógena del polipéptido da por resultado una concentración no mayor que 20 g por ml de suspensión y la estimulación se realiza de dos a cinco días. Para supervisar la proliferación celular, las células son impulsadas con Timidina con etiqueta radioactiva y después de 16-22 horas de incubación, la proliferación es detectada por medio del conteo de centelleo líquido. Una respuesta positiva es una respuesta mayor que el fondo más dos desviaciones estándar. La liberación de IFN-(se puede determinar por medio del método ELISA, el cual es bien conocido para una persona experta en el campo. Una respuesta positiva es una respuesta mayor que el fondo más dos desviaciones estándar. Otras citocinas diferentes de IFN-(podrían ser relevantes cuando se supervisa una respuesta inmunológica para el polipéptido, tal como IL-12, TNF-(, IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF-(. Un método diferente y más sensible para determinar la presencia de una citocina (por ejemplo IFN-() es el método ELISPOT donde las células aisladas de ya sea la sangre, el bazo, el hígado o el pulmón se diluyen a una concentración preferible de 1 a 4 x 10⁶ células/ml y se incuban durante 18-22 horas en presencia del polipéptido o la porción inmunógena del polipéptido dando por resultado una concentración no mayor que 20 g por ml. Las suspensiones de células son diluidas en el futuro de 1 a 2 x 10⁶/ml y son transferidas a placas Maxisorp revestidas con anti-IFN-(y son incubadas preferiblemente de 4 a 16 horas. Las células que producen IFN-(son determinadas por el uso de un anticuerpo anti-IFN secundario etiquetado y un sustrato relevante que da origen a manchas, las cuales pueden ser enumeradas utilizando un microscopio de disección. También es una posibilidad el determinar la presencia del ARNm que codifica la citocina relevante por medio del uso de la técnica de PCR. Usualmente,

una o más citocinas serán medidas utilizando por ejemplo las técnicas de PCR, ELISPOT o ELISA. Será apreciado por una persona experta en el campo que un incremento significativo o una disminución significativa en la cantidad de cualquiera de estas citocinas inducidos por un polipéptido específico se pueden utilizar en la evaluación de la actividad inmunológica del polipéptido.

5 Una respuesta celular in vitro también puede ser determinada por medio del uso de líneas de células T derivadas de un individuo inmune o una persona infectada con M. tuberculosis donde las líneas de células T han sido conducidas ya sea con micobacterias vivas, extractos de la célula bacteriana o filtrado de cultivo durante 10 a 20 días con la adición de IL-2. La inducción se realiza por la adición de no más de 20 g de polipéptido por ml de suspensión a las líneas de células T que contienen de 1×10^5 células a 3×10^5 células por pocillo y la incubación se realiza de dos a seis días. La inducción de IFN- γ o la liberación de otra citocina relevante es detectada por el ensayo ELISA. La estimulación de células T también se puede supervisar al detectar la proliferación de células utilizando Timidina etiquetada de manera radioactiva como se describiera anteriormente. Para ambos ensayos, una respuesta positiva es una respuesta mayor que el fondo más dos desviaciones estándar.

10 Una respuesta celular in vivo puede determinarse como una respuesta positiva de DTH después de la inyección intradérmica o un parche de aplicación local de a lo sumo 100 g del polipéptido o la porción inmunógena a un individuo quien está infectado clínica o subclínicamente con una Micobacteria virulenta, una respuesta positiva que tiene un diámetro de al menos 5 mm 72-96 horas después de la inyección o aplicación.

15 Una respuesta humoral in vitro es determinada por una respuesta específica de anticuerpos en un individuo inmune o infectado. La presencia de anticuerpos se puede determinar por medio de una técnica de ELISA o una inmunotransferencia Western donde el polipéptido o la porción inmunógena es absorbido a ya sea una membrana de nitrocelulosa o una superficie de poliestireno. El suero se diluye preferiblemente en PBS de 1:10 a 1:100 y se agrega al polipéptido absorbido y la incubación se realiza de 1 a 12 horas. Por medio del uso de los anticuerpos secundarios etiquetados, se puede determinar la presencia de anticuerpos específicos al medir la presencia o ausencia de una etiqueta específica por ejemplo por medio del ensayo ELISA donde una respuesta positiva es una respuesta de más del fondo más dos desviaciones estándar o alternativamente una respuesta visual en una inmnotransferencia Western.

20 Otro parámetro relevante es la medición de la protección en modelos animales inducida después de la vacunación con el polipéptido en un adyuvante o después de la vacunación de ADN. Los modelos animales adecuados incluyen primates, cobayos o ratones, los cuales son sometidos a un reto con una infección de una Micobacteria virulenta. La lectura para la protección inducida podría ser una disminución de la carga bacteriana en órganos objetivo en comparación con los animales no vacunados, tiempos de supervivencia prolongados en comparación con los animales no vacunados y pérdida de peso o patología disminuida en comparación con los animales no vacunados.

Métodos de preparación

30 En general, los polipéptidos de fusión de la invención y las secuencias de ADN que codifican estos polipéptidos de fusión se pueden preparar por medio del uso de cualquiera de una variedad de procedimientos.

35 El polipéptido de fusión puede producirse de manera recombinante utilizando una secuencia de ADN que codifica el polipéptido, que se ha insertado en un vector de expresión y se ha expresado en un hospedante apropiado. Los ejemplos de células hospedantes son E. coli. También se pueden producir sintéticamente los polipéptidos de fusión que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos y generalmente menos de 50 aminoácidos y se pueden generar utilizando técnicas bien conocidas para aquellas personas de experiencia ordinaria en el campo, tales como las técnicas en fase sólida comercialmente disponibles donde los aminoácidos se agregan secuencialmente a cadenas crecientes de aminoácidos.

40 Los polipéptidos de fusión también se pueden producir con un compañero de fusión adicional, métodos por medio de los cuales se pueden lograr características superiores del polipéptido de la invención. Por ejemplo, los compañeros de fusión que facilitan la exportación del polipéptido cuando se producen de manera recombinante, los compañeros de fusión que facilitan la purificación del polipéptido y los compañeros de fusión que mejoran la inmunogenicidad del polipéptido de la invención son todos de interés. La invención pertenece en particular a un polipéptido de fusión que comprende fusiones de dos o más polipéptidos inmunógenos basados en polipéptidos derivados de M. tuberculosis.

45 Otros compañeros de fusión, los cuales podrían mejorar la inmunogenicidad del producto, son las linfocinas tales como IFN- γ , IL-2 e IL-12. A fin de facilitar la expresión y/o purificación, el compañero de fusión puede ser por ejemplo una proteína fimbrial bacteriana, por ejemplo los componentes de pilus pilina y papA; proteína A; el péptido ZZ (las fusiones ZZ son comercializadas por Pharmacia en Suecia); la proteína de enlace a maltosa; glutatión S-transferasa; (-galactosidasa; o poli-histidina. Las proteínas de fusión se pueden producir de manera recombinante en una célula hospedante, la cual podría ser E. coli y es una posibilidad para inducir una región conectora entre los diferentes compañeros de fusión. La región conectora entre por ejemplo las unidades de polipéptidos inmunógenas individuales pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos.

50 Los polipéptidos de fusión interesantes son los polipéptidos de la invención, los cuales se someten a la lipidación de manera que el polipéptido inmunógeno es presentado de manera adecuada al sistema inmune. Este efecto es

conocido por ejemplo a partir de vacunas basadas en el polipéptido *Borrelia burgdorferi* OspA como se describe por ejemplo en el documento WO 96/40718 A o vacunas basadas en la lipoproteína *Pseudomonas aeruginosa* OprI y (Cote-Sierra J 1998). Otra posibilidad es la fusión N-terminal de una secuencia de señal conocida y una cisteína N-terminal, al polipéptido inmunógeno. Esta fusión da por resultado la lipidación del polipéptido de fusión inmunógeno en la cisteína N-terminal cuando se produce en un hospedante de producción adecuado.

Vacuna

Un aspecto importante de la invención pertenece a una composición de vacuna que comprende un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención. A fin de asegurar el desempeño óptimo de esta composición de vacuna se prefiere que comprenda un portador, vehículo o adyuvante inmunológico y farmacéuticamente aceptable.

Una vacuna efectiva, en donde un polipéptido de fusión de la invención es reconocido por el animal, en un modelo animal será capaz de disminuir la carga bacteriana en órganos objetivo, prolongar los tiempos de supervivencia y/o disminuir la pérdida de peso o patología después del reto con una *Micobacteria* virulenta, en comparación con los animales no vacunados.

Los portadores adecuados se seleccionan del grupo que consiste de un polímero al cual se enlaza(n) el(los) polipéptido(s) por medio de una interacción hidrófoba que no es covalente, tal como un plástico por ejemplo poliestireno o un polímero al cual el(los) polipéptido(s) se enlaza(n) covalentemente, tal como un polisacárido o un polipéptido por ejemplo albúmina de suero bovino, ovalbúmina o hemocianina de lapa californiana. Los vehículos adecuados se seleccionan del grupo que consiste de un diluyente y un agente de suspensión. El adyuvante se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de bromuro de dimetiloctadecilamonio (DDA), bromuro de dimetiloctadecenilamonio (DODAC), Quil A, poli I:C, hidróxido de aluminio, adyuvante incompleto de Freund, IFN-(, IL-2, IL-12, lípido de monofosforilo A (MPL), Dimicolato de Trehalosa (TDM), dibehenato de Trehalosa y dipéptido de muramilo (MDP) o extracto de lípido micobacteriano, en particular extractos de lípidos apolares como se da a conocer en el documento PCT/DK2004/000488.

La preparación de vacunas las cuales contienen polipéptidos como ingredientes activos es generalmente bien entendida en el campo, como se ejemplifica por las Patentes Norteamericanas Nos. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231 y 4.599.230, todas incorporadas en este documento a manera de referencia.

Otros métodos para lograr un efecto adyuvante para la vacuna incluyen el uso de agentes tales como hidróxido o fosfato de aluminio (alumbre), polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol^{MR}), agregación de la proteína en la vacuna por medio del tratamiento térmico, agregación por medio de la reactivación con anticuerpos tratados con pepsina (Fab) a albúmina, una mezcla con células bacterianas tales como *C. parvum* o endotoxinas o componentes de lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas, emulsión en vehículos oleosos fisiológicamente aceptables tales como mono-oleato de manida (Aracel A^{MR}) o emulsión con solución al 20 por ciento de un perfluorocarburo (Fluosol-DA^{MR}) utilizado como un sustituto de bloque también se pueden emplear. Otras posibilidades implican el uso de sustancias moduladoras inmunes tales como citocinas o inductores sintéticos de IFN-gamma tales como poli I:C en combinación con los adyuvantes mencionados anteriormente.

Otra posibilidad interesante para lograr un efecto adyuvante es emplear la técnica descrita en Gosselin y colaboradores, 1992 (que se incorpora por este acto a manera de referencia en este documento). En resumen, un antígeno relevante tal como un antígeno de la presente invención se puede conjugar con un anticuerpo (o un fragmento de anticuerpo de enlace a antígenos) contra los receptores Fc en los monocitos/macrófagos. Para mejorar la vacuna BCG, uno o más antígenos relevantes tales como uno o más polipéptidos de fusión de la presente invención se pueden mezclar con una vacuna BCG antes de la administración y se pueden inyectar junto con la vacuna BCG obteniendo con lo cual un efecto sinérgico que conduce a una mejor protección. Otra posibilidad interesante para lograr un efecto sinérgico es mantener la vacuna BCG y el(los) polipéptido(s) de fusión de la presente invención separados pero utilizarlos al mismo tiempo y administrarlos en diferentes sitios o a través de diferentes rutas.

Para reforzar las vacunas BCG utilizadas actualmente, un antígeno relevante tal como uno o más de los polipéptidos de fusión de la presente invención se puede administrar en el momento donde las vacunas BCG comienzan a menguar típicamente o aún antes, tal como 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65 o 70 años después de la vacunación con la BCG. Posteriormente se podría administrar en intervalos regulares, tales como 1, 2, 3, 4, 5 o 10 años, por hasta 5 veces.

Las vacunas se administran de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que serán profilácticas o terapéuticamente efectivas e inmunógenas. La cantidad a administrarse depende del sujeto que es tratado, inclusive por ejemplo la capacidad del sistema inmune del individuo para montar una respuesta inmune y el grado de protección deseado. Los intervalos de dosificación adecuados están en el orden de varios cientos de microgramos del polipéptido de fusión de la invención por vacunación con un intervalo preferido de aproximadamente 0.1 µg a 1000 µg, tal como en el intervalo de aproximadamente 1 µg a 300 µg y especialmente en el intervalo de aproximadamente 10 µg a 100 µg. Los regímenes adecuados para la administración inicial e inyecciones de refuerzo también son variables pero se caracterizan por una administración inicial seguida por

inoculaciones subsecuentes u otras administraciones.

La forma de aplicación se puede variar ampliamente. Cualquiera de los métodos convencionales para la administración de una vacuna son aplicables. Éstos incluyen la aplicación oral, nasal o a la mucosa en ya sea una forma sólida que contiene los ingredientes activos (tal como una píldora, supositorio o cápsula) o en una dispersión fisiológicamente aceptable, tal como una pulverización, polvo o líquido o por vía parenteral, por medio de una inyección, por ejemplo, aplicada por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular o transdérmica. La dosificación de la vacuna dependerá de la ruta de administración y variará de acuerdo con la edad de la persona que es vacunada y, en un grado menor, el tamaño de la persona que es vacunada. Actualmente, la mayoría de vacunas son administradas por vía intramuscular por medio de una inyección con aguja y esto es probablemente para continuar como la ruta estándar. Sin embargo, se han desarrollado formulaciones de vacuna las cuales inducen una inmunidad mucosa, típicamente por medio del suministro oral o nasal. Uno de los sistemas de suministro más ampliamente estudiados para la inducción de la inmunidad mucosa contiene la toxina del cólera (CT, por sus siglas en inglés) o su subunidad B. Esta proteína mejora las respuestas inmunes de las mucosas e induce la producción de IgA cuando se administra en formulaciones de vacunas. Una ventaja es la facilidad de suministro para vacunas orales o nasales. Las toxinas modificadas de otras especies microbianas, las cuales tienen toxicidad reducida pero una capacidad inmunoestimuladora retenida, tal como la toxina modificada lábil al calor de bacterias Gram-negativas o enterotoxinas de estafilococos también se pueden utilizar para generar un efecto similar. Estas moléculas son particularmente adecuadas para la administración a las mucosas.

Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, por medio de la inyección, por ejemplo, ya sea por vía subcutánea o intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para supositorios, las sustancias aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles y triglicéridos; estos supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0.5% a 10%, preferiblemente 1-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen ventajosamente 10-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

En muchos casos, será necesario tener múltiples administraciones de la vacuna. Especialmente, las vacunas se pueden administrar para prevenir una infección con micobacterias virulentas y/o para tratar una infección micobacteriana establecida o para reforzar a una persona vacunada previamente con la BCG. Cuando se administra para prevenir una infección, la vacuna se proporciona profilácticamente, antes de que estén presentes los signos clínicos o síntomas definitivos de una infección.

Debido a la variación genética, diferentes individuos pueden reaccionar con respuestas inmunes de resistencia variante al mismo polipéptido. Por lo tanto, la vacuna de acuerdo con la invención puede comprender varios polipéptidos de fusión y/o polipéptidos diferentes a fin de incrementar la respuesta inmune. La vacuna puede comprender dos o más polipéptidos de fusión o polipéptidos inducidos durante la invención o porciones inmonógenas de los mismos, donde todos los antígenos inducidos durante la invención o polipéptidos de fusión son como se definió anteriormente o algunos pero no todos los polipéptidos pueden derivarse de micobacterias virulentas. En el último ejemplo, los polipéptidos que no satisfacen necesariamente los criterios expuestos anteriormente para los polipéptidos de fusión pueden actuar ya sea debido a su inmunogenicidad propia o pueden actuar solamente como adyuvantes.

La vacuna puede comprender 1-20, tal como 2-20 o aún 3-20 diferentes polipéptidos o polipéptidos de fusión, tal como 3-10 diferentes polipéptidos o polipéptidos de fusión.

La descripción también pertenece a un método para inmunizar un animal, inclusive un ser humano, contra la TB causada por micobacterias virulentas, que comprende administrar al animal el polipéptido de fusión de la invención o una composición de vacuna de la invención como se describió anteriormente o una vacuna viva descrita anteriormente. En una modalidad actualmente preferida, el animal o humano es un individuo inmune como se describió anteriormente.

La descripción también pertenece a un método para producir una composición inmunógena de acuerdo con la invención, el método comprende preparar, sintetizar o aislar un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención y solubilizar o dispersar el polipéptido de fusión en un medio para una vacuna y agregar opcionalmente otros antígenos de M. tuberculosis y/o un portador, vehículo y/o sustancia adyuvante.

Los fragmentos de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar para efectuar la expresión in vivo de polipéptidos inmunógenos, es decir los fragmentos de ácido nucleico se pueden utilizar en las comúnmente llamadas vacunas de ADN como se revisa en Ulmer y colaboradores 1993, el cual se incorpora a manera de referencia.

En la construcción y preparación de ADN plásmido que codifica un polipéptido de fusión a utilizarse definido por la vacunación de ADN se puede utilizar una cepa hospedante tal como E. coli. El ADN plásmido entonces se puede

preparar a partir de cultivos durante toda la noche de la cepa hospedante que lleva el plásmido de interés y se puede purificar utilizando por ejemplo el equipo de columna Qiagen Giga-Plasmid^{MR} (Qiagen, Santa Clarita, CA, EUA) que incluye un paso de remoción de endotoxinas. Es esencial que el ADN plásmido utilizado para la vacunación de ADN esté libre de endotoxinas.

5 Por lo tanto, la invención también se refiere a una vacuna que comprende un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la invención, la vacuna efectúa la expresión in vivo del polipéptido inmunógeno por un animal, inclusive un ser humano, a quien se ha administrado la vacuna, la cantidad de polipéptido expresado es efectiva para conferir una resistencia sustancialmente incrementada a infecciones causadas por micobacterias virulentas en un animal, inclusive un ser humano.

10 La eficacia de esta vacuna de ADN puede mejorarse posiblemente por medio de la administración del gen que codifica el producto de expresión junto con un fragmento de ADN que codifica un polipéptido el cual tiene la capacidad de modular una respuesta inmune.

Una posibilidad para activar de manera efectiva una respuesta inmune celular se puede lograr por medio de la expresión del polipéptido inmunógeno relevante en un microorganismo o virus que no es patógeno. Los ejemplos bien conocidos de estos microorganismos son la BCG de *Mycobacterium bovis*, *Salmonella* y *Pseudomona* y los ejemplos de virus son el virus *Vaccinia* y el *Adenovirus*.

15 Por lo tanto, la descripción también desvela una mejora de la vacuna BCG viva actualmente disponible, en donde una o más copias de una secuencia de ADN que codifica uno o más polipéptidos de fusión como se definió anteriormente se han incorporado en el genoma del microorganismo de una manera que permite que el microorganismo exprese y secrete el polipéptido de fusión. La incorporación de más de una copia de una secuencia de ácido nucleico de la invención está contemplada para mejorar la respuesta inmune.

Otra posibilidad es integrar el ADN que codifica el polipéptido de fusión de acuerdo con la invención en un virus atenuado tal como el virus *vaccinia* o *Adenovirus* (Rolph y colaboradores 1997). El virus *vaccinia* recombinante es capaz de entrar en el citoplasma o el núcleo de la célula hospedante infectada y por lo tanto el polipéptido de fusión de interés puede inducir una respuesta inmune, la cual está contemplada para inducir una protección contra la TB.

20 La invención también se refiere al uso de un polipéptido de fusión de la invención para el uso como vacunas terapéuticas como se ha descrito en la bibliografía ejemplificada por D. Lowry (Lowry y colaboradores 1999). Los antígenos con propiedades terapéuticas se pueden identificar basándose en su capacidad para disminuir la gravedad de la infección con *M. tuberculosis* en animales experimentales o para prevenir la reactivación de una infección previa, cuando se administran como una vacuna. La composición utilizada para vacunas terapéuticas se puede preparar como se describió anteriormente para las vacunas.

REALIZACIONES ADICIONALES

A. Una vacuna que comprende un polipéptido de fusión que comprende uno o más antígenos inducidos durante la inanición o uno o más fragmentos de polipéptidos seleccionados de SEQ ID NO: 12,

35 B. Una vacuna que comprende un polipéptido de fusión de acuerdo con la realización A, donde los polipéptidos inducidos durante la inanición o fragmentos de polipéptidos se fusionan con ESAT6, Ag85B, TB10.4 y Ag85A, o análogos de los mismos, y en cualquier combinación y orden de posición.

C. Una vacuna como se define en cualquiera de las realizaciones A-B para uso profiláctico, uso terapéutico, una vacuna multifase o para usar para reforzar la inmunidad de vacunación de BCG previa.

40 D. Una vacuna o una composición farmacéutica como se define en cualquiera de las realizaciones A-C que va a administrarse por vía intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o mucosa.

E. Una vacuna como se reivindica en la realización B donde el polipéptido de fusión comprende 2 polipéptidos inmunógenos diferentes o análogos de los mismos.

45 F. Una vacuna como se reivindica en la realización B donde el polipéptido de fusión comprende 3 polipéptidos inmunógenos diferentes o análogos de los mismos.

G. Una vacuna como se reivindica en la realización B donde el polipéptido de fusión comprende 4 polipéptidos inmunógenos diferentes o análogos de los mismos.

H. Una vacuna de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende polipéptidos de fusión con combinaciones de ESAT6-Ag85A-X, ESAT6-Ag85B-X, Ag8A-X, Ag85B-X, TB10-Ag85A-X, TB10-Ag85B-X donde X es el antígeno inducido durante la inanición con SEQ ID NO: 12 y donde el orden de las unidades de antígenos puede ser de cualquier combinación por ejemplo donde el orden está invertido o X está situado en el medio.

50 I. Una vacuna de acuerdo con la realización H, que comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionada de

las secuencias de aminoácidos que codifican los polipéptidos de fusión.

Ag85B-ESAT6-Rv2660c;

Ag85B-TB 10.4-Rv2660c;

Ag85B-Rv2660c;

5 Ag85A-Rv2660c;

Ag85A-ESAT6-Rv2660c;

Ag85A-TB10.4-Rv2660c;

Rv2660c-Rv2659c;

Ag85B-ESAT6-Rv2660c-Rv2659c;

10 en cualquier orden de las unidades polipeptídicas, o análogos de las mismas.

J. Un polipéptido de fusión como se describe en cualquier realización precedente.

L. Una vacuna de acuerdo con la realización J para uso profiláctico, uso terapéutico o ambos, una vacuna multifase, o para usar para reforzar la inmunidad de vacunación de BCG anterior.

15 N. Una vacuna que comprende uno o más antígenos inducidos durante la inanición o uno o más fragmentos de polipéptidos seleccionados de SEQ ID NO: 12.

O. Una vacuna de acuerdo con la realización N, para uso profiláctico, uso terapéutico, una vacuna multifase o para usar para reforzar la inmunidad de vacunación de BCG.

P. Una vacuna como se define en cualquiera de las realizaciones N-O que se debe administrar por vía intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o mucosa.

20 **Leyendas de las figuras**

Figura 1: Respuestas de anticuerpos a Rv2660c para pacientes con TB VIH-negativos (TB+/VIH-) y VIH-positivos (TB+/VIH+) de Uganda y controles saludables de Dinamarca (Controles). El corte se basó en el análisis de curva de ROC con un nivel de especificidad del 97%. La sensibilidad observada se muestra sobre la presentación gráfica de los datos.

25 Figura 2: Inmunogenicidad de Rv2659c

Los grupos de ratones F1(Balb/cxC57BL/6) se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con Rv2659c en DDA/MPL. Una semana después de la vacunación final, las PBMCs se analizaron por medio de un ensayo ELISA por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con 5 microgramos/ml de Rv2659c.

30 Figura 3: El antígeno Rv2659c induce una protección contra la infección con *M. tuberculosis*

Los grupos de ratones Balb/c-C57BL/6 se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con el antígeno Rv2659c y la eficacia de protección se evaluó por medio de la reducción en conteos de CFU en pulmones y se comparó con ratones no inmunizados e inmunizados con la BCG 12 semanas después de la vacunación. Los resultados se expresan como \log_{10} de unidades formadoras de colonias (CFU) en los pulmones y son resultado promedio de 6 ratones por grupo experimental.

35 Figuras 4A-C: Inmunogenicidad del antígeno Rv2660c

Los ratones F1(Balb/cxC57BL/6) se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con la proteína recombinante de Rv2660c en DDA/MPL. FIG 4A: Una semana después de la vacunación final, las PBMCs se analizaron por medio del ensayo ELISA por la liberación de IFN-gamma después de la estimulación con 0.2, 1 o 5 microgramos/ml del antígeno Rv2660c. Tres semanas después de la vacunación final, las células de bazo FIG. 4B se analizaron por medio del ensayo ELISA por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con 0.2, 1 o 5 microgramos/ml de Rv2660c recombinante y las PBMCs FIG. 4C se analizaron por las respuestas proliferativas después de la estimulación con 0.2, 1 o 5 microgramos/ml del antígeno Rv2660c recombinante.

45 Figura 5: Protección contra la infección con *Mycobacterium tuberculosis* inducida por el antígeno Rv2660c

Los grupos de ratones Balb/c-C57BL/6 se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con Rv2660c y la eficacia de protección se evaluó por medio de conteos de CFU en los pulmones y se comparó con ratones no inmunizados e inmunizados con la BCG 6 semanas después de la infección por aerosol. Los resultados se expresan como \log_{10} de unidades formadoras de colonias (CFU) en los pulmones y son resultados promedio de 6 ratones por grupo experimental. Como control positivo, una dosis individual de BCG

50

Danish 1331^{MR} (5×10^4 bacilos/ratón) se inyectó s.c. en la base de la cola al mismo tiempo que la primera vacunación de subunidad; no se administraron inyecciones de refuerzo.

Figuras 6: Inmunogenicidad de Hybrid56, HyVac21 e HyVac28

5 Los grupos de ratones F1(Balb/cxC57BL/6) se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con 5 microgramos de Ag85b-ESAT6-Rv2660c (H56), Ag85a-TB10.4-Rv2660c (H21) o Ag85b-TB10.4-Rv2660c (H28) en DDA/TDB (LipoVac). Una semana después de la vacunación final, las PBMCs se analizaron por medio del ensayo ELISA por la liberación de INF-gamma después de la estimulación con 1 microgramo/ml de la proteína de fusión utilizada para la inmunización, Ag85b, TB10.4 o Rv2660c (figuras 6A-6C). Tres semanas después de la vacunación final con Ag85b-ESAT6-Rv2660c, las células de bazo FIG. 6D se analizaron por medio del ensayo ELISA por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con 0.2, 1 o 5 microgramos/ml de Ag85B, ESAT6 o Rv2660c recombinante y las PBMCs FIG. 6E se analizaron por las respuestas proliferativas contra los mismos antígenos a 1 microgramo/ml.

Figuras 7: Protección fuerte contra la infección con *M. tuberculosis* después de la inmunización con Hybrid56

15 FIG. 7A: Los grupos de ratones Balb/c-C57BL/6 se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con Ag85B-ESAT6-Rv2660c (Hybrid56) y la eficacia de protección se evaluó por medio de conteos de CFU en los pulmones y se comparó con ratones no inmunizados e inmunizados con la BCG 2, 6, 12 y 24 semanas después de la infección por aerosol. FIG. 7B: Los grupos de ratones B6 se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con ya sea Ag85b-ESAT6 (Hybrid1) o Ag85b-ESAT6-Rv2031c (Hybrid32) y la eficacia de protección se evaluó por medio de conteos de CFU en los pulmones y se comparó con ratones no inmunizados e inmunizados con la BCG 7, 13, 24, 35 y 44 semanas después de la infección por aerosol. Los resultados son expresados como unidades formadoras de colonias \log_{10} (CFU) en los pulmones y son resultados promedio de 6 ratones por grupo experimental. Como control positivo, una dosis individual de BCG Danish 1331^{MR} (5×10^4 bacilos/ratón) se inyectó s.c. en la base de la cola al mismo tiempo que la primera vacunación de subunidad; no se administraron inyecciones de refuerzo.

25 Figura 8: Curvas de supervivencia Kaplan-Meier (n = 7). La inmunización de cobayos con la proteína de fusión Ag85b- ESAT6-Rv2660c prolonga el tiempo de supervivencia al nivel de los animales inmunizados con la BCG después del reto con *M. tuberculosis* en aerosol en dosis bajas.

Figura 9: El antígeno Hybrid56 (Ag85b-ESAT6-Rv2660c) indujo inmunogenicidad y protección.

30 Los ratones F1(Balb/cxC57BL/6) se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con Ag85b-ESAT6-Rv2660c (Hybrid56) en DDA/MPL. Diez semanas después de la vacunación final, las células del bazo se analizaron por medio del ensayo ELISA por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con 0.2, 1 o 5 $\mu\text{g/ml}$ de Ag85B, ESAT6 o Rv2660c (como se observó anteriormente en la figura 9A). La eficacia de protección se evaluó por la reducción en conteos de CFU en los pulmones en comparación con ratones inmunizados con un control adyuvante diez semanas después de la vacunación. Los resultados se expresan como \log_{10} de unidades formadoras de colonias (CFU) en los pulmones de 12 ratones por grupo experimental (figura 9B).

Ejemplos

Materiales y métodos

Animales

40 Los ratones hembra C57BL/6xBalb/C F1 o C57BL/6 libres de agentes patógenos específicos, de 8 a 16 semanas de edad, obtenidos de Bornholtegaard, Dinamarca se utilizaron para el análisis de respuestas inmunes y estudios de protección evaluados por el análisis de CFU. Los estudios de infección se realizaron en las instalaciones BSL3 en Statens Serum Institute. Los animales se alojaron en jaulas aisladoras y se alimentaron con agua y alimento estéril *ad libitum*. Se permitió a todos los animales un período de descanso de una semana antes del inicio de los experimentos.

Preparaciones de Antígenos Recombinantes

50 El antígeno recombinante Ag85B-ESAT6 (Hybrid1) se produjo como se describió previamente (Olsen, van Pinxteren y colaboradores, 2001). En resumen, esta proteína etiquetada con His se expresó en *Escherichia coli* XL-1 Blue y se purificó en una columna Talon^{MR} seguido por la cromatografía de intercambio iónico de proteínas utilizando una columna HiTrap Q^{MR} (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La muestra se dializó contra amortiguador de HEPES 25 mM (pH 8.0)-NaCl 0.15 M-glicerol al 10%-Tween 20 al 0.01% antes de la dilución y el almacenamiento.

55 El antígeno Rv2660c recombinante se produjo por medio del mismo procedimiento descrito previamente para otra proteína micobacteriana pequeña (Skjot, Oettinger y colaboradores, 2000). En resumen, el gen de Rv2660c de longitud completa se amplificó por medio de la PCR de ADN geonómico de *M. tuberculosis* y se subclonó en el plásmido de expresión pDest17. La proteína recombinante se produjo en *Escherichia coli* B121 blue y se purificó por medio de la cromatografía de afinidad con iones metálicos en una columna de Ni⁺ en esencia como se describiera previamente (Theisen, Vuust y colaboradores, 1995) pero con amortiguadores de fosfato que contenían urea 8 M, la

cual se retiró después de la purificación.

Las proteínas de fusión Hybrid56 (Ag85B-ESAT6-Rv2660c), Hybrid32 (Ag85b-ESAT6-Rv2031c), HyVac21 (Ag85a-TB10.4-Rv2660c) y HyVac28 (Ag85b-TB10.4-Rv2660c) se clonaron en el vector de expresión pDest17 (Invitrogen) por medio de la recombinación de un sitio específico de acuerdo con el fabricante.

- 5 Las proteínas de fusión se expresaron en la cepa de *E. coli* BL21 después de la inducción por medio de IPTG. Las cuatro proteínas de fusión recombinantes se recolectaron como cuerpos de inclusión después de la alteración de las células por detergente suave (B-PER, Sigma) y sonicación. Los cuerpos de inclusión lavados se disolvieron en NaOAc 20 mM + urea 8 M a pH 4.9 y se pasaron sobre una columna Q sepharose^{MR} para capturar la endotoxina. La práctica recolectada se diluyó en amortiguador de bis-tris + urea 8 M pH 6.5 y el pH se ajustó a pH 6.5. La proteína entonces se pasó sobre CM sepharose^{MR} para capturar las impurezas y luego se capturó en una columna Q sepharose^{MR}. La columna se lavó con amortiguador de bis-tris pH 6.5 + urea 3 M. Las proteínas enlazadas se eluyeron con NaCl. La proteína entonces se intercambió con amortiguador en una columna af Sephadex^{MR} a tris-HCl 25 mM pH 8 y glicerol al 10%.

Reconocimiento humano - serología

- 15 Todos los sueros se empobrecieron en anticuerpos de reacción cruzada antes del uso en un ensayo ELISA por la adición de 20 µl de extracto de *E. coli* (S3761, Promega, Madison, WI) a 200 µl de muestra de suero seguido por la incubación durante 4 horas a temperatura ambiente mientras se mezclaba. Después de la centrifugación (10.000 x g, 10 minutos), se agregó azida de sodio 0.05% al sobrenadante. El ensayo ELISA se realizó como sigue, las placas de microtítulo Maxisorp^{MR} de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) se revistieron durante toda la noche a 4°C con un antígeno a 1.0 µg/ml (100 µl por pocillo) en amortiguador de carbonato-bicarbonato (pH 9.6). Las placas entonces se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween 20^{MR} al 0.05% (PBS-T). Las muestras de suero se diluyeron 1:100 en PBS que contenía Tween 20^{MR} al 0.2% y albúmina de suero bovino al 1.0% (peso/volumen) (amortiguador de dilución) y se agregó 0.1 ml de suero diluido a los pocillos por duplicado y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de los lavados 3 x con PBS-T, las placas se incubaron durante una hora con 100 µl de Ig antihumano de conejo conjugada con Peroxidasa (P212, DAKO, Glostrup, Dinamarca) diluida 1:8000 en amortiguador de dilución. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron con sustrato de Tetrametilbenzidina (TMB plus, Kem-En-Tec, ^{***}, Dinamarca) durante 30 minutos y el desarrollo se detuvo por la adición de H₂SO₄ 1 M. Entonces se midió la densidad óptica a 405 nm (OD₄₀₅).

Preparación de vacunas y procedimiento de inmunización

- 30 Los ratones se inmunizaron con 5 micro g de vacuna recombinante (ya sea Rv2659c, Rv2660c, Hybrid56, HyVac21, HyVac28 o Hybrid32) suministrados en 25 µg de lípido A de monofosforilo (MPL, Corixa, WA, EUA) emulsionado en bromuro de dioctadecilamonio (DDA, 250 µg/dosis, Eastman Kodak, Inc., Rochester, N.Y.) en un volumen total de 200 µl, como se describió recientemente (Olsen, van Pinxteren y colaboradores, 2001). Las vacunas (0.2 ml/ratón) se inyectaron tres veces por vía subcutánea (s.c.) en la espalda con intervalos de dos semanas. Una dosis individual de BCG Danish 1331^{MR} (5 x 10⁴ bacilos/ratón) se inyectó s.c. en la base de la cola al mismo tiempo que la primera vacunación de subunidad; no se administraron inyecciones de refuerzo. La inmunidad previa al reto se evaluó típicamente con linfocitos sanguíneos 5 y 7 semanas después de la primera vacunación y esplenocitos 7 semanas después de la primera vacunación.

Infecciones experimentales y enumeración bacteriana en órganos

- 40 Para evaluar el nivel de protección, los ratones se sometieron a un reto 10 semanas después de la primera inmunización ya sea por la ruta del aerosol en un sistema de exposición por inhalación Glas-Col, calibrado para suministrar aproximadamente 100 CFU de *M. tuberculosis* Erdman por pulmón. Los ratones se sacrificaron 2, 6, 12 o 24 semanas después (Hybrid56) o 7, 13, 24, 35 o 44 semanas después (Hybrid32) y los pulmones y los bazo se retiraron para la enumeración bacteriana. Los órganos se homogeneizaron por separado en solución salina estéril y las diluciones en serie se colocaron en agar Middlebrook 7H11^{MR} complementado con 2 mg de hidrazida de ácido 2-tiofen-carboxílico por ml para inhibir selectivamente el crecimiento de BCG residual en los órganos de prueba. Las colonias se contaron después de 2 a 3 semanas de incubación a 37°C.

Cultivos de Linfocitos

- 50 Los órganos se homogeneizaron por medio de maceración a través de un tamiz de acero inoxidable de malla fina en RPMI completo (GIBCO, Grand Island, NY, que incluía glutamina 2 mM, 100 U/ml de cada uno de penicilina 6-potásica y sulfato de estreptomina, FCS al 10% y 2-ME 50 mM). Los linfocitos sanguíneos se purificaron en un gradiente de densidad Lympholyte^{MR} (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá). Las células se acumularon de cinco ratones en cada grupo y se cultivaron por triplicado en pocillos de microtítulo de fondo redondo (96 pocillos; Nunc, Roskilde, Dinamarca) que contenían 2x10⁵ células en un volumen de 200 microlitros de medio RPMI 1640 complementado con 2-mercaptoetanol 5x10⁻⁵ M, glutamina 1 mM, penicilina-estreptomina 5% (vol/vol) suero bovino fetal. Los antígenos micobacterianos se utilizaron en concentraciones que variaban de 5 a 0.2 mg/ml. Los cultivos se incubaron a 37°C en CO₂ al 10% durante 3 días, antes de la remoción de 100 µl de sobrenadante para interferón

gamma (determinación de IFN-gamma por medio de un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) como se describe a continuación.

Ensayo Inmunoabsorbente Unido a Enzimas (ELISA) para IFN-gamma

5 Un método de ELISA de doble emparejado se utilizó para cuantificar los niveles de IFN-gamma en titulaciones por duplicado de sobrenadantes de cultivo, utilizando un equipo comercial para el ensayo de IFN-gamma, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mabtech, AB. Suecia). Las concentraciones de IFN-gamma en las muestras se calcularon utilizando una curva estándar generada a partir de IFN-gamma recombinante (Life Technologies) y los resultados se expresan en pg/ml. La diferencia entre los pozos por duplicado fue consistentemente menor que 10% del promedio.

10 Infección experimental y evaluación de eficacia de las vacunas en el modelo de cobayo

A los cobayos hembra Hartley no consanguíneos adquiridos de Charles River Laboratories (North Wilmington, Mass.) se les administró ya sea la BCG por vía intradérmica en una dosis de 10^3 CFU una vez o 20 μ g de ya sea Ag85b-ESAT6 o Ag85b-ESAT6-Rv2660c emulsionado en DDA/MPL tres veces con un período de descanso de 3 semanas entre las inmunizaciones. Seis semanas después de la tercera inmunización se administró un reto de MTB en aerosol utilizando un dispositivo (Glas-Col, Terre Haute, Ind.) calibrado para suministrar aproximadamente 20 bacilos en cada pulmón de los cobayos. Los tiempos de supervivencia para los cobayos infectados se determinaron al observar los animales en una base diaria por los cambios en el consumo de alimentos, evidencia de respiración dificultosa y cambios de comportamiento. Además, los animales se pesaron en una base semanal hasta que se observó una caída de peso sostenida durante varios días, indicando una enfermedad.

20 **Ejemplo 1**

Reconocimiento humano de un antígeno inducido durante la inanición

25 El antígeno Rv2660c se evaluó para el reconocimiento humano en un panel de pacientes con TB pulmonar de Uganda proporcionado por el Banco de Especímenes de Tuberculosis WHO. Ambos pacientes con un estado positivo y negativo de infección por VIH se incluyeron (N=94 y N=73, respectivamente). El grupo de control consistió en cien donadores saludables residentes en Dinamarca con una cobertura calculada de BCG de >90%.

Las placas de microtítulo se revistieron con 1.0 μ g/ml (100 μ l por pozo) de proteína de Rv2660c incubada con 100 x muestras de suero diluido y se desarrollaron utilizando Ig antihumano de conejo conjugada con peroxidasa y tetrametilbenzidina como sustrato (resultados en la Figura 1).

Conclusión

30 En este estudio, se sometió a prueba el reconocimiento de una proteína inducida durante la inanición. Basándose en un corte determinado a partir del grupo de control utilizando una sensibilidad de 97% si era posible confirmar la infección de TB en 45% de los casos con VIH- y 61% de los casos con VIH+. Indicando claramente que la proteína de RV2660c es expresada y reconocida por el sistema inmune durante una infección con MTB.

Ejemplo 2

35 Inmunogenicidad y prevención de la reactivación por medio de la administración posterior a la exposición de un antígeno inducido durante la inanición (Rv2659c)

40 Los ratones se infectaron con *M. tuberculosis* y se trataron con antibióticos para reducir la carga bacteriana y entrar a una etapa de infección latente con una carga bacteriana cercana al nivel de detección. Durante la etapa latente de la infección, los ratones se vacunaron tres veces en intervalos de dos semanas con Rv2659c en adyuvante (por ejemplo DDA/MPL). Una semana después de la vacunación final, las células sanguíneas se analizaron por medio del ensayo ELISA por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con Rv2659c (figura 2).

Capacidad de la proteína inducida durante la inanición Rv2659c para inducir la protección contra la reactivación de *M. tuberculosis*

45 Los grupos de ratones con *M. tuberculosis* latente se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con Rv2659c formulado en adyuvante (por ejemplo DDA/MPL) y la eficacia de protección se evaluó por medio de la reducción en unidades formadoras de colonias (CFU) de los pulmones y bazo cuando se compararon con ratones no vacunados (infectados de manera latente). La protección contra la reactivación se evaluó tres meses después de la vacunación. El antígeno Rv2659c indujo una reducción de 3 a 90 veces los niveles bacterianos en los pulmones en comparación con los ratones infectados de manera latente, no inmunizados, reactivados (figura 3).

50 Para evaluar la influencia de la vacunación con Rv2659c sobre el posible desarrollo de una patología en los ratones infectados de manera latente, se tomó tejido pulmonar de ratones vacunados, infectados de manera latente para el examen histopatológico. No se detectó necrosis caseosa, fibrosis o mineralización significativas en las lesiones y no se observó una infiltración aumentada de células inflamatorias.

Conclusión

En este estudio, se sometió a prueba el potencial de una proteína inducida durante la inanición, Rv2659c como una vacuna terapéutica. Cuando la proteína de Rv2659c se administró a ratones en combinación de adyuvantes de bromuro de dimetildioctadecilamonio-lípido de monofosforilo A, se indujo/reforzó una respuesta inmune fuerte. La inmunización dio por resultado una reducción logarítmica de 0.5-1.0 en la carga bacteriana en los pulmones. De esta manera, los estudios sugieren que la vacunación posterior a la exposición reduce o retarda la reactivación de *M. Tuberculosis* sin desencadenar una inmunopatología pulmonar.

Ejemplo 3

10 Inmunogenicidad y protección contra la infección por aerosol de *M. tuberculosis* por el antígeno inducido durante la inanición Rv2660c

Los ratones se vacunaron tres veces en intervalos de dos semanas con Rv2660c en adyuvante (por ejemplo DDA/MPL). Una semana después de la vacunación final, las células sanguíneas se analizaron por medio del ensayo ELISA por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con Rv2660c (figura 4A). Tres semanas después de la vacunación final, las células del bazo se analizaron por la secreción de IFN-gamma después de la estimulación con Rv2660c (figura 4B) y las células sanguíneas se analizaron por las respuestas proliferativas específicas de antígenos (figura 4C).

Los grupos de ratones vacunados por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con Rv2660c formulado en adyuvante (por ejemplo DDA/MPL) se sometieron a un reto por medio de la infección por aerosol con *M. tuberculosis* y la eficacia de protección se evaluó por medio de la reducción en unidades formadoras de colonias (CFU) aisladas de los pulmones en comparación con ratones no vacunados. La protección se evaluó 12 semanas después de la vacunación. El antígeno Rv2660c indujo una reducción logarítmica (10) de ½ en los niveles bacterianos de los pulmones en comparación con ratones infectados no inmunizados (figura 5).

Conclusión

En este estudio, se sometió a prueba el potencial de una proteína inducida durante la inanición Rv2660c como un antígeno de vacuna. Cuando la proteína Rv2660c se administró a ratones en combinación de adyuvantes de bromuro de dimetildioctadecilamonio-lípido de monofosforilo A, se indujo una respuesta inmune fuerte. La inmunización dio por resultado una reducción logarítmica (10) de aproximadamente 0.5 en la carga bacteriana en los pulmones.

Ejemplo 4

30 Fusión de antígenos inducidos durante la inanición con vacunas preventivas (Vacuna de múltiples fases)

Respuestas inmunológicas después de la inmunización con proteínas de fusión triples

Los grupos de ratones se vacunaron por vía subcutánea dos veces en intervalos de dos semanas con los polipéptidos de fusión Hybrid56, HyVac21 o HyVac28 en adyuvante (por ejemplo DDA/MPL). Una semana después de la vacunación final, las células sanguíneas se analizan por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con 1 microgramo/ml de proteína de fusión de inmunización o los componentes individuales en las proteínas de fusión (figuras 6A-6C). Tres semanas después de la vacunación final con Hybrid56, las células de bazo se analizan por medio del ensayo ELISA por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con 0.2, 1 o 5 microgramos/ml de los componentes individuales en la proteína de fusión (figura 6D). Las células sanguíneas se analizan por las respuestas proliferativas específicas de antígenos tres semanas después de la vacunación final (Figura 6E),

La capacidad de tres polipéptidos de fusión para inducir la protección contra la infección con *M. tuberculosis* en ratones

Los grupos de ratones se vacunan por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con los polipéptidos de fusión Hybrid1, Hybrid56 y Hybrid32 en adyuvante (DDA/MPL) y la eficacia de protección se evalúa por medio de la reducción en unidades formadoras de colonias (CFU) de los pulmones y bazo en comparación con ratones naturales (no vacunados) después de la infección por aerosol. Como un control positivo para la protección, una dosis individual de BCG Danish 1331^{MR} (5x10⁴ bacilos/ratón) se inyectó s.c. en la base de la cola al mismo tiempo que la primera vacunación de subunidad (Figuras 7A y 7B).

50 Capacidad de protección del polipéptido Hybrid56 (Ag85b-ESAT6-Rv2660c) contra una infección por aerosol de *M. tuberculosis* en cobayos

Los grupos de cobayos se vacunan por vía subcutánea tres veces en intervalos de tres semanas con el polipéptido de fusión en adyuvante (por ejemplo DDA/MPL) y la eficacia de protección se evalúa principalmente al medir cada peso de los animales en una base semanal. Como un control positivo para la protección, una dosis individual de BCG Danish 1331^{MR} (5x10⁴ bacilos/ratón) se inyecta i.d. al mismo tiempo que la primera vacunación de subunidad.

Los resultados se presentan como curvas de supervivencia en la figura 8.

Conclusión

En este estudio, se investigó el potencial inmunológico de tres proteínas de fusión (Hybrid56, HyVac21 y HyVac28). Cuando las proteínas de fusión se administraron a ratones en la combinación de adyuvantes de bromuro de dimetildioctadecilamonio-lípido de monofosforilo A, se indujo una fuerte respuesta inmune dependiente de la dosis en los tres componentes de proteínas individuales indicando su potencial como una vacuna de múltiples fases. Seleccionando a Hybrid56 como un ejemplo, las respuestas inmunes inducidas estuvieron acompañadas por altos niveles de inmunidad de protección que incrementan con el tiempo, alcanzando un nivel que fue claramente superior al nivel de protección alcanzado con la BCG de *Mycobacterium bovis*, la vacuna clásica contra la MTB. Además, una proteína de fusión triple similar que contenía el antígeno clásico de latencia de MTB Rv2031c (Ag85b-ESAT6-Rv2031c) reemplazando Rv2660c, no mostró una protección mejorada a través del tiempo. Finalmente, el alto nivel de protección para Hybrid56 se confirmó en el modelo de cobayo mucho más susceptible.

Ejemplo 5

Actividad de una fusión de un antígeno inducido durante la inanición y una vacuna preventiva (vacuna de múltiples fases) administrada después de la exposición (terapéuticamente).

Los ratones se infectaron con *M. tuberculosis* y se trataron con antibióticos para reducir la carga bacteriana y para entrar a una etapa de infección latente con una carga bacteriana baja. Durante la etapa latente de infección, los ratones se vacunaron tres veces en intervalos de dos semanas con el polipéptido de fusión en adyuvante (por ejemplo DDA/MPL). Quince semanas después de la vacunación final, las células sanguíneas se analizan por medio del ensayo ELISA por la secreción de INF-gamma después de la estimulación con 0.2, 1 o 5 ug/ml de componentes individuales de la proteína de fusión (figura 9A).

La capacidad del polipéptido de fusión para inducir la protección contra la reactivación de *M. tuberculosis*

Los grupos de ratones con *M. tuberculosis* latente se vacunaron por vía subcutánea tres veces en intervalos de dos semanas con el polipéptido de fusión formulado en adyuvante (por ejemplo DDA/MPL) y la eficacia de protección se evaluó por medio de la reducción en unidades formadoras de colonias (CFU) de los pulmones en comparación con ratones no vacunados (infectados de manera latente). La protección contra la reactivación se evaluó tres meses después de la vacunación. El polipéptido de fusión indujo una reducción significativa de la reactivación dando por resultado niveles bacterianos pulmonares reducidos en comparación con los ratones infectados de manera latente, no inmunizados, reactivados (figura 9B).

Conclusión

En este estudio, se investigó el potencial de una vacuna de subunidad de tuberculosis basada en una proteína de fusión de los antígenos Rv2660c, ESAT6 (Rv3875) y el antígeno 85B (Rv1886c) como una vacuna terapéutica. Cuando la proteína de fusión se administró a ratones en la combinación de adyuvantes de bromuro de dimetildioctadecilamonio-lípido de monofosforilo A, se indujo/reforzó una respuesta inmune fuerte. La inmunización dio por resultado una reducción en la carga bacteriana en los pulmones durante la reactivación de la infección latente. De esta manera, los estudios sugieren que la vacunación después de la exposición con una fusión de un antígeno inducido durante la inanición y una vacuna preventiva (Vacuna de múltiples fases) reduce o retarda la reactivación de *M. tuberculosis*.

Referencias

- Andersen, P. y Heron, I. 1993 *J. Immunol. Methods* 161 29-39
 Andersen, P. y colaboradores 1991. *Infect. Immun.* 59:1905-1910
 Betts J. C. y colaboradores 2002. *Mol Microbiol.* 43:717-731
 Brandt, L. y colaboradores 2000 *Infect. Immun.* 68:2; 791-795.
 Brooks, J.V., Frank, A.A., Keen, M.A., Bellisle, J.T. & Orme, I.M. *Infect Immun* 2001, 69(4), 2714-2717.
 Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S. y colaboradores *JAMA* 1994, 271, 698-702
 Cole, S.T y colaboradores 1998 *Nature* 393: 537-544
 Cote-Sierra J. y colaboradores 1998, *Gene* 9 de Octubre;221(1):25-34
 Gosselin y colaboradores (1992) *J. Immunol.* 149: 3477-3481
 Harboe, M. y colaboradores 1998 *Infect. Immun.* 66:2; 717-723
 Lowry, D.B. y colaboradores 1999, *Nature* 400: 269-71
 Lyashchenko, K.P. y colaboradores 2000. *J Immunological Methods* 242: 91-100
 Nagai y colaboradores 1991, *Infect. Immun* 59:1; 372-382
 Solicitud de Patente Danesa PA 2000 00666 "Nucleic acid fragments and polypeptide fragments derived from *M. tuberculosis*"
 Solicitud de Patente Danesa PA 1999 01020 (WO 01/23388) "Tuberculosis vaccine and diagnostic based on the *Mycobacterium tuberculosis* esat-6 gene family".
 Solicitud de Patente norteamericana 09/0505,739 "Nucleic acid fragments and polypeptide fragments derived

from *M. tuberculosis*"

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

LISTADO DE SECUENCIAS

25	<110> Statens Serum Institut	
	<120> Nuevas vacunas de proteínas de fusión de TB	
	<130> 15018dk1	
30	<160> 18	
	<170> PatentIn versión 3.1	
35	<210> 1	
	<211> 960	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
40	<400> 1	
	atggctgaca tcccctacgg ccgtgactat cccgacccga tctgggtgtga cgaggacggc	60
	cagccgatgc cgccggtcgg cgccgaattg ctcgacgaca ttagggcatt cttagcggcgg	120
	ttcgtagtct atccaagcga ccatgaactg atcgcgcaca ccctctggat tgcgcattgc	180
	tggtttatgg aggcgtggga ctcaacgccc cgaatcgctt ttttgtcacc ggaaccggc	240
	tctggcaaga gccgcgact cgaagtcacg gaaccgctag tgccccggcc ggtgcatgcc	300
	atcaactgca caccggccta cctgttccgt cgggtggccg atccggtcgg gcggccgacc	360
	gtcctgtacg acgagtgtga caccctgttt ggcccgaag ctaaagaaca cgaggaaatt	420
	cgcggcgtga tcaacgccg ccaccgcaag ggagccgctg cgggcccgtg cgatcatccgc	480
	ggcaagatcg ttgagaccga ggaactgcca gcgtactgtg cggtcgcctt ggccggcctc	540
	gacgacctgc ccgacacat catgtctcgg tcgatcgtg tgaggatgcg caggagggca	600
	ccaaccgaac ccgtggagcc gtggcgcccc cgcgtcaacg gccccgaggc cgagaagctg	660
	cacgaccggt tggcgaactg ggccggccgc attaaccgc tggaaagcgg ttggccggcg	720
	atgccggacg gggtgaccga ccggcgccgc gacgtctggg agtccctggt tgcggttgc	780
	gacaccgagg gcgggactg gcccaaaacc gcccggtgca ccgcagaaac ggatgcaacc	840
	gcaaatcgag gagccaagcc cagcataggc gtgctgctgc tgcgggatat ccgtcgagtc	900
	ttcagcgacc gggaccggat ggcgaccagc gacatcctga ccggactgaa ccggatggag	960

ES 2 647 070 T3

<210> 2
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

5

<400> 2

Met Ala Asp Ile Pro Tyr Gly Arg Asp Tyr Pro Asp Pro Ile Trp Cys
 1 5 10 15
 Asp Glu Asp Gly Gln Pro Met Pro Pro Val Gly Ala Glu Leu Leu Asp
 20 25 30
 Asp Ile Arg Ala Phe Leu Arg Arg Phe Val Val Tyr Pro Ser Asp His
 35 40 45
 Glu Leu Ile Ala His Thr Leu Trp Ile Ala His Cys Trp Phe Met Glu
 50 55 60
 Ala Trp Asp Ser Thr Pro Arg Ile Ala Phe Leu Ser Pro Glu Pro Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly Lys Ser Arg Ala Leu Glu Val Thr Glu Pro Leu Val Pro Arg
 85 90 95
 Pro Val His Ala Ile Asn Cys Thr Pro Ala Tyr Leu Phe Arg Arg Val
 100 105 110
 Ala Asp Pro Val Gly Arg Pro Thr Val Leu Tyr Asp Glu Cys Asp Thr
 115 120 125
 Leu Phe Gly Pro Lys Ala Lys Glu His Glu Glu Ile Arg Gly Val Ile
 130 135 140
 Asn Ala Gly His Arg Lys Gly Ala Val Ala Gly Arg Cys Val Ile Arg
 145 150 155 160
 Gly Lys Ile Val Glu Thr Glu Glu Leu Pro Ala Tyr Cys Ala Val Ala
 165 170 175
 Leu Ala Gly Leu Asp Asp Leu Pro Asp Thr Ile Met Ser Arg Ser Ile
 180 185 190
 Val Val Arg Met Arg Arg Arg Ala Pro Thr Glu Pro Val Glu Pro Trp
 195 200 205
 Arg Pro Arg Val Asn Gly Pro Glu Ala Glu Lys Leu His Asp Arg Leu
 210 215 220
 Ala Asn Trp Ala Ala Ala Ile Asn Pro Leu Glu Ser Gly Trp Pro Ala
 225 230 235 240

ES 2 647 070 T3

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

Val Ala Val Ala Asp Thr Ala Gly Gly His Trp Pro Lys Thr Ala Arg
 260 265 270

Ala Thr Ala Glu Thr Asp Ala Thr Ala Asn Arg Gly Ala Lys Pro Ser
 275 280 285

Ile Gly Val Leu Leu Leu Arg Asp Ile Arg Arg Val Phe Ser Asp Arg
 290 295 300

Asp Arg Met Arg Thr Ser Asp Ile Leu Thr Gly Leu Asn Arg Met Glu
 305 310 315 320

Glu Gly Pro Trp Gly Ser Ile Arg Arg Gly Asp Pro Leu Asp Ala Arg
 325 330 335

Gly Leu Ala Thr Arg Leu Gly Arg Tyr Gly Ile Gly Pro Lys Phe Gln
 340 345 350

His Ser Gly Gly Glu Pro Pro Tyr Lys Gly Tyr Ser Arg Thr Gln Phe
 355 360 365

Glu Asp Ala Trp Ser Arg Tyr Leu Ser Ala Asp Asp Glu Thr Pro Glu
 370 375 380

Glu Arg Asp Leu Ser Val Ser Ala Val Ser Ala Val Ser Pro Pro Val
 385 390 395 400

Gly Asp Pro Gly Asp Ala Thr Gly Ala Thr Asp Ala Thr Asp Leu Pro
 405 410 415

Glu Ala Gly Asp Leu Pro Tyr Glu Pro Pro Ala Pro Asn Gly His Pro
 420 425 430

Asn Gly Asp Ala Pro Leu Cys Ser Gly Pro Gly Cys Pro Asn Lys Leu
 435 440 445

Leu Ser Thr Glu Ala Lys Ala Ala Gly Lys Cys Arg Pro Cys Arg Gly
 450 455 460

Arg Ala Ala Ala Ser Ala Arg Asp Gly Ala Arg
 465 470 475

<210> 3
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 3

ES 2 647 070 T3

atgaccgccc tcggcggggtc gccgccgacg cgacgatgcc cggccacaga ggaccgggca 60
cccgcgacag tcgccacacc gtctagcacc gatcctaccg cgccccgcgc cgtgtcgtgg 120
tggtcggtgc acgagtatgt cgcaccgacc ctggcccgcg ccgtggaatg gccgatggcc 180
ggcaccgccg cgtggtgcga cctcgacgac accgaccgcc tcaaatgggc cgcgatctgc 240
gacgctgctc ggcattgggc actccgggtg gagacgtgcc aggccgcgct ggcccaggca 300
tcacgtgacg tatccgccgc cgccgactgg ccggcgggtct ctcgggagat ccagcgtcgg 360
cgtgacgcct acattcggcg ggtggtggtc tga 393

<210> 4
<211> 130
<212> PRT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*
<400> 4

5

Met Thr Ala Val Gly Gly Ser Pro Pro Thr Arg Arg Cys Pro Ala Thr
1 5 10 15
Glu Asp Arg Ala Pro Ala Thr Val Ala Thr Pro Ser Ser Thr Asp Pro
20 25 30
Thr Ala Ser Arg Ala Val Ser Trp Trp Ser Val His Glu Tyr Val Ala
35 40 45
Pro Thr Leu Ala Ala Ala Val Glu Trp Pro Met Ala Gly Thr Pro Ala
50 55 60
Trp Cys Asp Leu Asp Asp Thr Asp Pro Val Lys Trp Ala Ala Ile Cys
65 70 75 80
Asp Ala Ala Arg His Trp Ala Leu Arg Val Glu Thr Cys Gln Ala Ala
85 90 95
Ser Ala Glu Ala Ser Arg Asp Val Ser Ala Ala Ala Asp Trp Pro Ala
100 105 110
Val Ser Arg Glu Ile Gln Arg Arg Arg Asp Ala Tyr Ile Arg Arg Val
115 120 125
Val Val
130

10

<210> 5
<211> 261
<212> ADN
<213> *Mycobacterium tuberculosis*
<400> 5

15

ES 2 647 070 T3

atgtgCGcgt tccCGtcgcc gAgTctcggg tggacggtct ctcacgagac cGaaaggccc 60
 ggcatggcag acgctcccc gttgtcacgg cggtacatca cgatcagtga ggccgccgaa 120
 tatctagcgg tcaccgaccg cacggTccgc cagatgatcg cGacgGCCg cctacgCGga 180
 taccgctccg gCaccgcct cgtccgtctg cGccgCgatg aggtcGacgg cGccatgcac 240
 ccgttcggtg gtgCCgcatg a 261

5 <210> 6
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 6

Met Cys Ala Phe Pro Ser Pro Ser Leu Gly Trp Thr Val Ser His Glu
 1 5 10 15
 Thr Glu Arg Pro Gly Met Ala Asp Ala Pro Pro Leu Ser Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Ile Thr Ile Ser Glu Ala Ala Gly Tyr Leu Ala Val Thr Asp Arg Thr
 35 40 45
 Val Arg Gln Met Ile Ala Asp Gly Arg Leu Arg Gly Tyr Arg Ser Gly
 50 55 60
 Thr Arg Leu Val Arg Leu Arg Arg Asp Glu Val Asp Gly Ala Met His
 65 70 75 80
 Pro Phe Gly Gly Ala Ala
 85

10
 15 <210> 7
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 7

20 atggccgatg cggttaagta cgtagttatg tgcaactgCG acgacgaacc gggagcGctc 60
 atcatcgcct ggatcGacga cGaacgaccc gccggcgggc acatacagat gcggtcGaac 120
 acccgcttca ccGaaacaca gtggggccgc catatcGagt ggaaactcga atgcccggcga 180
 tgccGaaagt atgCGccgat atccgagatg accgCCcgg cgatcctcga cggtttcggg 240
 gcGaaGcttc acgagctgag aacgtcGacc atccccgacg ctgacgatcc atcaatagca 300
 gaggcGcgac acGtaattcc gttcagcGca ttatgcttgc gcttgagcca gctaggcggg 360
 taa 363

ES 2 647 070 T3

<210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

5

<400> 8

Met Ala Asp Ala Val Lys Tyr Val Val Met Cys Asn Cys Asp Asp Glu
 1 5 10 15
 Pro Gly Ala Leu Ile Ile Ala Trp Ile Asp Asp Glu Arg Pro Ala Gly
 20 25 30
 Gly His Ile Gln Met Arg Ser Asn Thr Arg Phe Thr Glu Thr Gln Trp
 35 40 45
 Gly Arg His Ile Glu Trp Lys Leu Glu Cys Arg Ala Cys Arg Lys Tyr
 50 55 60
 Ala Pro Ile Ser Glu Met Thr Ala Ala Ala Ile Leu Asp Gly Phe Gly
 65 70 75 80
 Ala Lys Leu His Glu Leu Arg Thr Ser Thr Ile Pro Asp Ala Asp Asp
 85 90 95
 Pro Ser Ile Ala Glu Ala Arg His Val Ile Pro Phe Ser Ala Leu Cys
 100 105 110
 Leu Arg Leu Ser Gln Leu Gly Gly
 115 120

10

<210> 9
 <211> 1128
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

15

<400> 9

gtgacgcaaa ccggcaagcg tcagagacgc aaattcggtc gcatccgaca gttcaactcc 60

ES 2 647 070 T3

ggccgctggc aagccagcta caccggcccc gacggccgcg tgtacatcgc ccccaaaacc 120
 ttcaacgcca agatcgacgc cgaagcatgg ctcaccgacc gccgcccga aatcgaccga 180
 caactatggt ccccggcatc gggtcaggaa gaccgccccg gagccccatt cggtgagtac 240
 gccgaaggat ggctgaagca gcgtggaatc aaggaccgca cccgcccga ctatcgcaaa 300
 ctgctggaca accacatcct ggccaccttc gctgacaccg acctacgca catcaccg 360
 gccgcccgtgc gccgctggta cgccaccacc gccgtgggca caccgaccat gcgggcacac 420
 tcctacagct tgctgcgcg aatcatgcag accgccttgg ccgacgacct gatcgactcc 480
 aaccctgcc gcattcagg cggtccacc gcccgccgcg tccacaagat caggccccg 540
 accctcgacg agctggaaac catcaccaaa gccatgccc acccctacca ggcgttcgtg 600
 ctgatggcgg catggctggc catgcgctac ggcgagctga ccgaattacg ccgcaaagac 660
 atcgacctgc acggcgaggt tgcgcgggtg cggcgggctg tcgttcgggt gggcgaaggc 720
 ttcaaggtga cgacaccgaa aagcgatgcg ggagtgcgcg acataagtat cccgccacat 780
 ctgatacccg ccatcgaaga ccaccttcac aaacacgtca accccggccg ggagtccctg 840
 ctgttcccat cggtaacga cccaaccgt cacctagcac cctcggcgct gtaccgcatg 900
 ttctacaagg cccgaaaagc cgccggccga ccagacttac gggtgacga ccttcgacac 960
 tccggcgccg tgttgctgc atccaccggc gccacactgg ccgaactgat gcagcggcta 1020
 ggacacagca cagccggcgc cgcactccgc taccagcacg ccgccaaggg ccgggaccgc 1080
 gaaatcgccg cactgttaag caaactggcc gagaaccagg agatgtga 1128

<210> 10
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

5

<400> 10

Val Thr Gln Thr Gly Lys Arg Gln Arg Arg Lys Phe Gly Arg Ile Arg
 1 5 10 15
 Gln Phe Asn Ser Gly Arg Trp Gln Ala Ser Tyr Thr Gly Pro Asp Gly
 20 25 30
 Arg Val Tyr Ile Ala Pro Lys Thr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Ala Glu
 35 40 45
 Ala Trp Leu Thr Asp Arg Arg Arg Glu Ile Asp Arg Gln Leu Trp Ser
 50 55 60
 Pro Ala Ser Gly Gln Glu Asp Arg Pro Gly Ala Pro Phe Gly Glu Tyr
 65 70 75 80

10

ES 2 647 070 T3

Ala Glu Gly Trp Leu Lys Gln Arg Gly Ile Lys Asp Arg Thr Arg Ala
85 90 95

His Tyr Arg Lys Leu Leu Asp Asn His Ile Leu Ala Thr Phe Ala Asp
100 105 110

Thr Asp Leu Arg Asp Ile Thr Pro Ala Ala Val Arg Arg Trp Tyr Ala
115 120 125

Thr Thr Ala Val Gly Thr Pro Thr Met Arg Ala His Ser Tyr Ser Leu
130 135 140

Leu Arg Ala Ile Met Gln Thr Ala Leu Ala Asp Asp Leu Ile Asp Ser
145 150 155 160

Asn Pro Cys Arg Ile Ser Gly Ala Ser Thr Ala Arg Arg Val His Lys
165 170 175

Ile Arg Pro Ala Thr Leu Asp Glu Leu Glu Thr Ile Thr Lys Ala Met
180 185 190

Pro Asp Pro Tyr Gln Ala Phe Val Leu Met Ala Ala Trp Leu Ala Met
195 200 205

Arg Tyr Gly Glu Leu Thr Glu Leu Arg Arg Lys Asp Ile Asp Leu His
210 215 220

Gly Glu Val Ala Arg Val Arg Arg Ala Val Val Arg Val Gly Glu Gly
225 230 235 240

Phe Lys Val Thr Thr Pro Lys Ser Asp Ala Gly Val Arg Asp Ile Ser
245 250 255

Ile Pro Pro His Leu Ile Pro Ala Ile Glu Asp His Leu His Lys His
260 265 270

Val Asn Pro Gly Arg Glu Ser Leu Leu Phe Pro Ser Val Asn Asp Pro
275 280 285

Asn Arg His Leu Ala Pro Ser Ala Leu Tyr Arg Met Phe Tyr Lys Ala
290 295 300

Arg Lys Ala Ala Gly Arg Pro Asp Leu Arg Val His Asp Leu Arg His
305 310 315 320

Ser Gly Ala Val Leu Ala Ala Ser Thr Gly Ala Thr Leu Ala Glu Leu
325 330 335

Met Gln Arg Leu Gly His Ser Thr Ala Gly Ala Ala Leu Arg Tyr Gln
340 345 350

ES 2 647 070 T3

His Ala Ala Lys Gly Arg Asp Arg Glu Ile Ala Ala Leu Leu Ser Lys
 355 360 365

Leu Ala Glu Asn Gln Glu Met
 370 375

5 <210> 11
 <211> 228
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 11

gtgatagcgg gcgtcgacca ggcgcttgca gcaacaggcc aggctagcca gcgggcggca 60
 ggcgcattctg gtgggggtcac cgctcgggtgc ggcgtgggca cggaacagag gaacctttcg 120
 gtggttgcac cgagtcagtt cacatttagt tcacgcagcc cagattttgt ggatgaaacc 180
 gcagggtcaat cgtgggtgcdc gatactggga ttgaaccagt ttcactag 228

15 <210> 12
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 12

Val Ile Ala Gly Val Asp Gln Ala Leu Ala Ala Thr Gly Gln Ala Ser
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Ala Gly Ala Ser Gly Gly Val Thr Val Gly Val Gly Val
 20 25 30
 Gly Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ser Val Val Ala Pro Ser Gln Phe Thr
 35 40 45
 Phe Ser Ser Arg Ser Pro Asp Phe Val Asp Glu Thr Ala Gly Gln Ser
 50 55 60
 Trp Cys Ala Ile Leu Gly Leu Asn Gln Phe His
 65 70 75

20 <210> 13
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

25 <400> 13

ES 2 647 070 T3

atgagggctc gcagcgatgc tggaggccag tctgtgaagt cccgcacgtc gaatcgggtcc 60
 agaagctcgc gccggagccg cgtcaggtca tccatcagtg ccctcgttga taatccgcag 120
 gctcggccgc gcgagctccc tgttctgtgc ggggtggccc tagtgcgcggt cgagccggtc 180
 tgcgagttcg tgccggagcc ggtttgtgga caggccgagg tgctcggcga gccagccgcc 240
 gctcatcggg tcacctcagc ccgccggtca ccctcaacga ccgtttgcag ccgttcgcag 300
 aaggcgagcg cggtggtgat cagctccgtc agctcggttg cgcggggtgcg gcgtgcctcg 360
 gtgagttcgg tggacgcgac aacagcgtga 390

<210> 14
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 14

5

Met Arg Ala Arg Ser Asp Ala Gly Gly Gln Ser Val Lys Ser Arg Thr
 1 5 10 15
 Ser Asn Arg Ser Arg Ser Ser Arg Arg Ser Arg Val Arg Ser Ser Ile
 20 25 30
 Ser Ala Leu Val Asp Asn Pro Gln Ala Arg Pro Arg Glu Leu Pro Val
 35 40 45
 Leu Cys Gly Trp Pro Val Val Arg Val Glu Pro Val Cys Glu Phe Val
 50 55 60
 Pro Glu Pro Val Cys Gly Gln Ala Glu Val Leu Gly Glu Pro Ala Ala
 65 70 75 80
 Ala His Arg Val Thr Ser Ala Arg Arg Ser Pro Ser Thr Thr Val Cys
 85 90 95
 Ser Arg Ser Gln Lys Ala Ser Ala Val Val Ile Ser Ser Val Ser Ser
 100 105 110
 Val Ala Arg Val Arg Arg Ala Ser Val Ser Ser Val Asp Ala Thr Thr
 115 120 125

10

Ala

<210> 15
 <211> 273
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 15

15

ES 2 647 070 T3

atggatgacc tgacgcggct ccggcgcgag cttctggacc gattcgacgt gcgggacttc 60
 acagactggc ctccagcatc gctgcgagcc ctcatcgcga cctacgaccc ctggatcgac 120
 atgacggcca gcccgcaca gcctgtatcg cccggagggc ctcgactccg actcgtgcga 180
 ttaaccacca acccatccgc gagagcagcc cctatcggaa acggtgggga ctcttctgtt 240
 tgcgctggtg agaaacagtg ccgcccaccg tag 273

<210> 16
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 16

5

Met Asp Asp Leu Thr Arg Leu Arg Arg Glu Leu Leu Asp Arg Phe Asp
 1 5 10 15
 Val Arg Asp Phe Thr Asp Trp Pro Pro Ala Ser Leu Arg Ala Leu Ile
 20 25 30
 Ala Thr Tyr Asp Pro Trp Ile Asp Met Thr Ala Ser Pro Pro Gln Pro
 35 40 45
 Val Ser Pro Gly Gly Pro Arg Leu Arg Leu Val Arg Leu Thr Thr Asn
 50 55 60
 Pro Ser Ala Arg Ala Ala Pro Ile Gly Asn Gly Gly Asp Ser Ser Val
 65 70 75 80
 Cys Ala Gly Glu Lys Gln Cys Arg Pro Pro
 85 90

10

<210> 17
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 17

15

gtggaggtga gggctagcgc ccgcaagcac ggcatcaacg acgacgcat gctccacgca 60
 taccgcaacg cgctgcgcta cgtcgaactg gaataccacg gcgaagtcca actgctggtg 120
 atcggccccg accaaaccgg gcgcctttta gagctgggtca tcccagcaga cgaaccaccc 180
 cggattatcc acgccaacgt actacgcccg aagttctacg actacctgag gtga 234

20

<210> 18
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 18

25

ES 2 647 070 T3

Val Glu Val Arg Ala Ser Ala Arg Lys His Gly Ile Asn Asp Asp Ala
1 5 10 15
Met Leu His Ala Tyr Arg Asn Ala Leu Arg Tyr Val Glu Leu Glu Tyr
20 25 30
His Gly Glu Val Gln Leu Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Thr Gly Arg
35 40 45
Leu Leu Glu Leu Val Ile Pro Ala Asp Glu Pro Pro Arg Ile Ile His
50 55 60
Ala Asn Val Leu Arg Pro Lys Phe Tyr Asp Tyr Leu Arg
65 70 75

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende un polipéptido de fusión que comprende:

- 5 i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o
 ii) uno o más fragmentos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 que comprende un epítipo de linfocitos T o un epítipo de linfocitos B, o
 iii) polipéptidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % con i) o ii) que comprenden un epítipo de linfocitos T o linfocitos B,

y en la que el polipéptido de fusión se construye a partir de una combinación de uno o más antígenos inducidos durante la inanición con uno o más antígenos de *M. tuberculosis*.

10 2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho antígeno o uno o más fragmentos de dicho antígeno se fusionan con uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en ESAT6, Ag85B, TB10.4 y/o Ag85A, en cualquier combinación y orden de posición.

3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el polipéptido de fusión comprende 2 diferentes polipéptidos inmunógenos.

15 4. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el polipéptido de fusión comprende 3 diferentes polipéptidos inmunógenos.

5. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polipéptido de fusión comprende 4 diferentes polipéptidos inmunógenos.

20 6. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un polipéptido de fusión con una combinación de ESAT6-Ag85A-X, ESAT6-Ag85B-X, Ag85A-X, Ag85B-X, TB10-Ag85A-X o TB10-Ag85B-X donde X es SEQ ID NO: 12 y donde el orden de las unidades de antígenos puede ser de cualquier combinación.

7. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos que codifican los siguientes polipéptidos de fusión:

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

en cualquier orden de las unidades de polipéptidos.

35 8. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso profiláctico, uso terapéutico, o para utilizarse para reforzar la inmunidad de la vacunación previa con la BCG.

9. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, que se debe administrar por vía intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o mucosal.

10. Un polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 7.

40 11. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende el polipéptido de fusión Ag85B-ESAT6-Rv2660c, en cualquier orden de las unidades polipeptídicas.

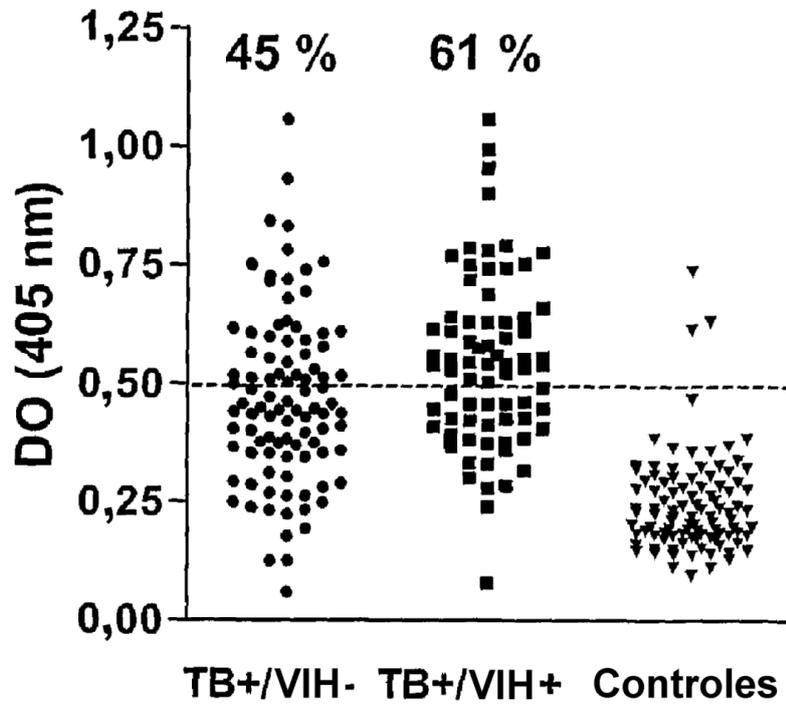


Figura 1

Figura 2

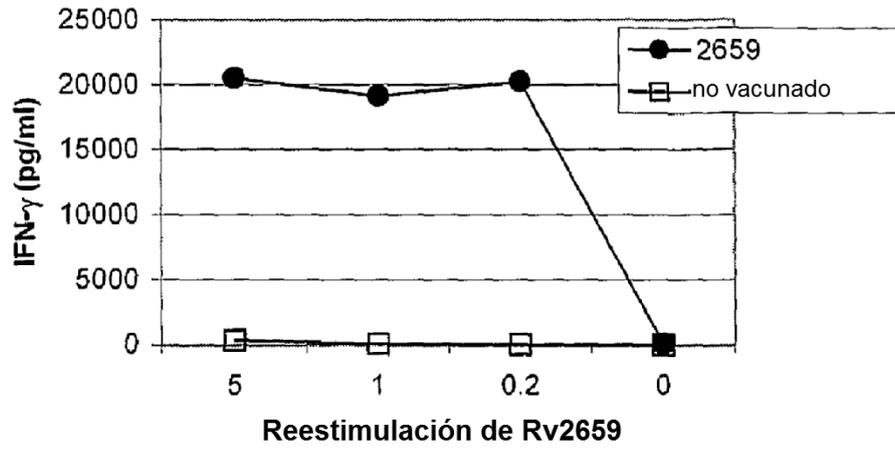
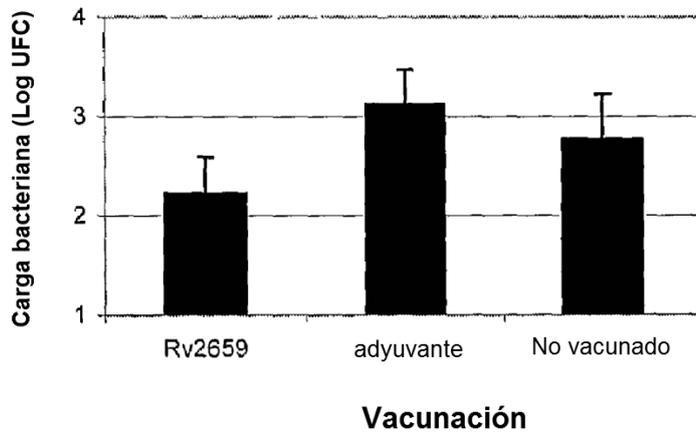


Figura 3



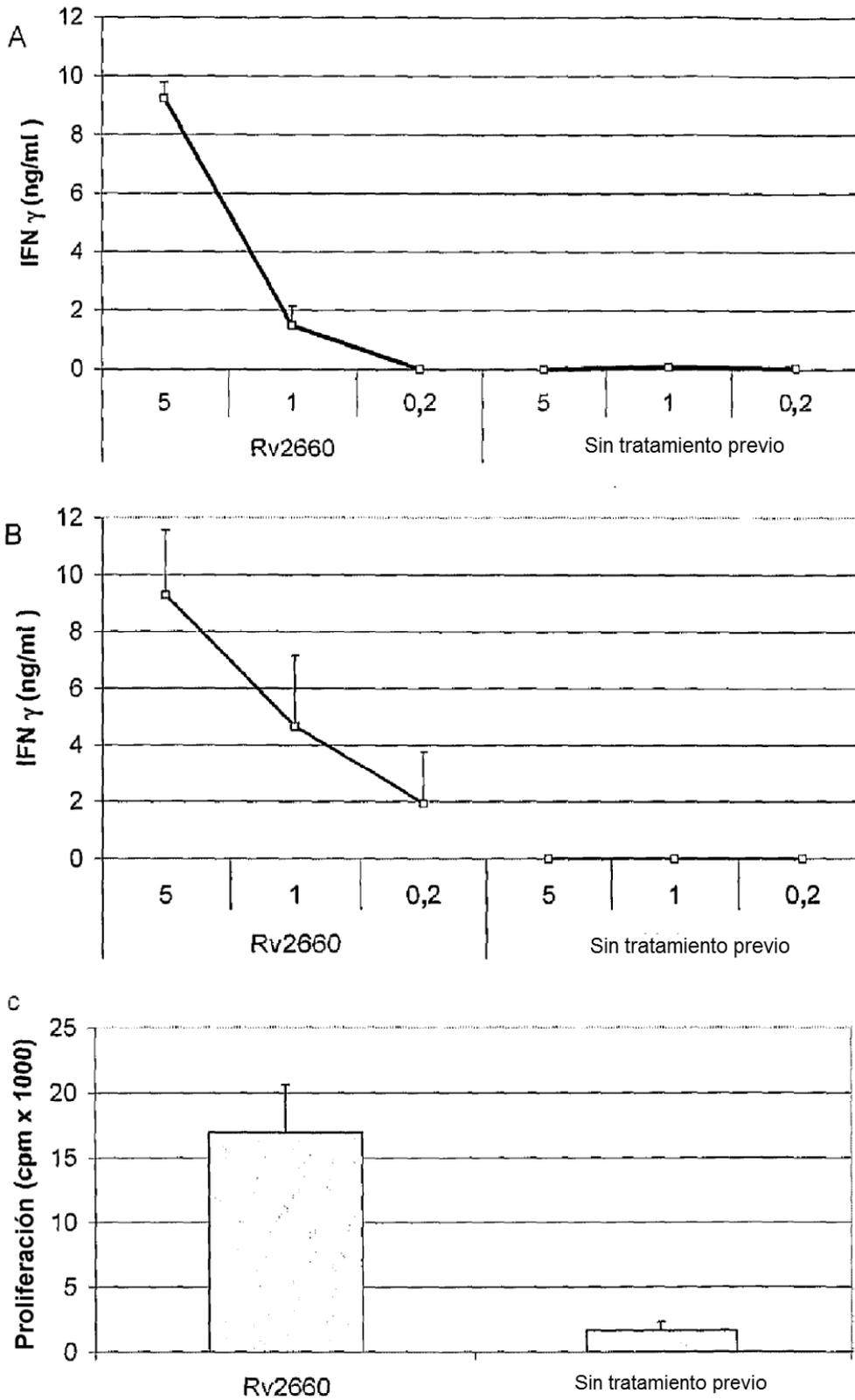


Figura 4

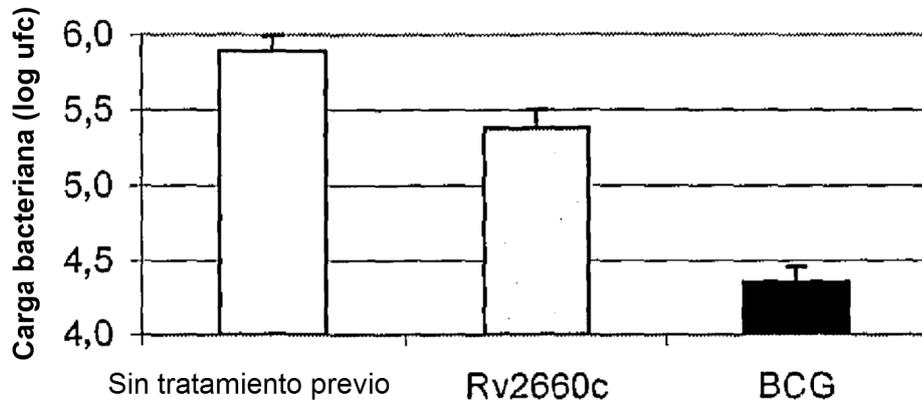


Figura 5

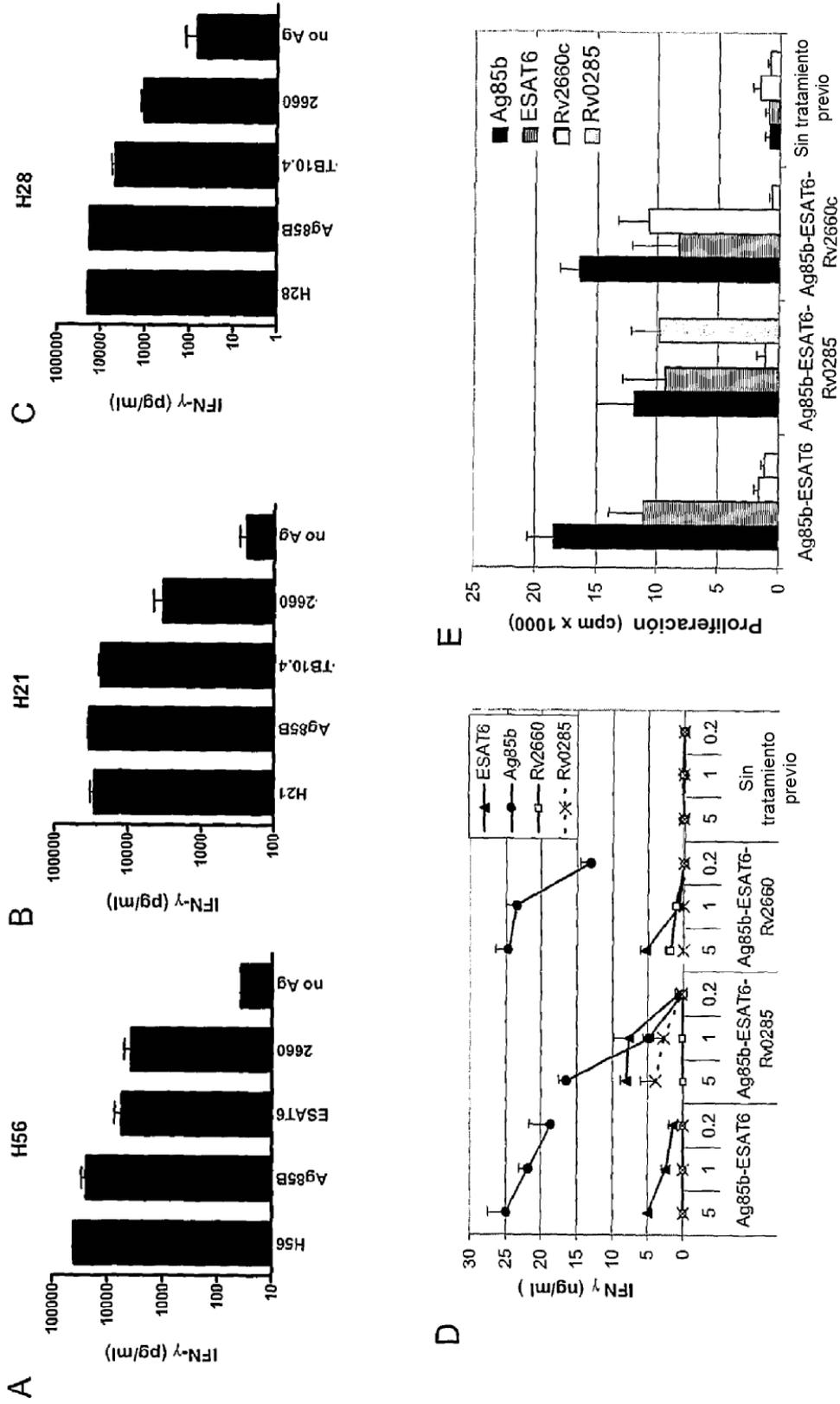


Figura 6

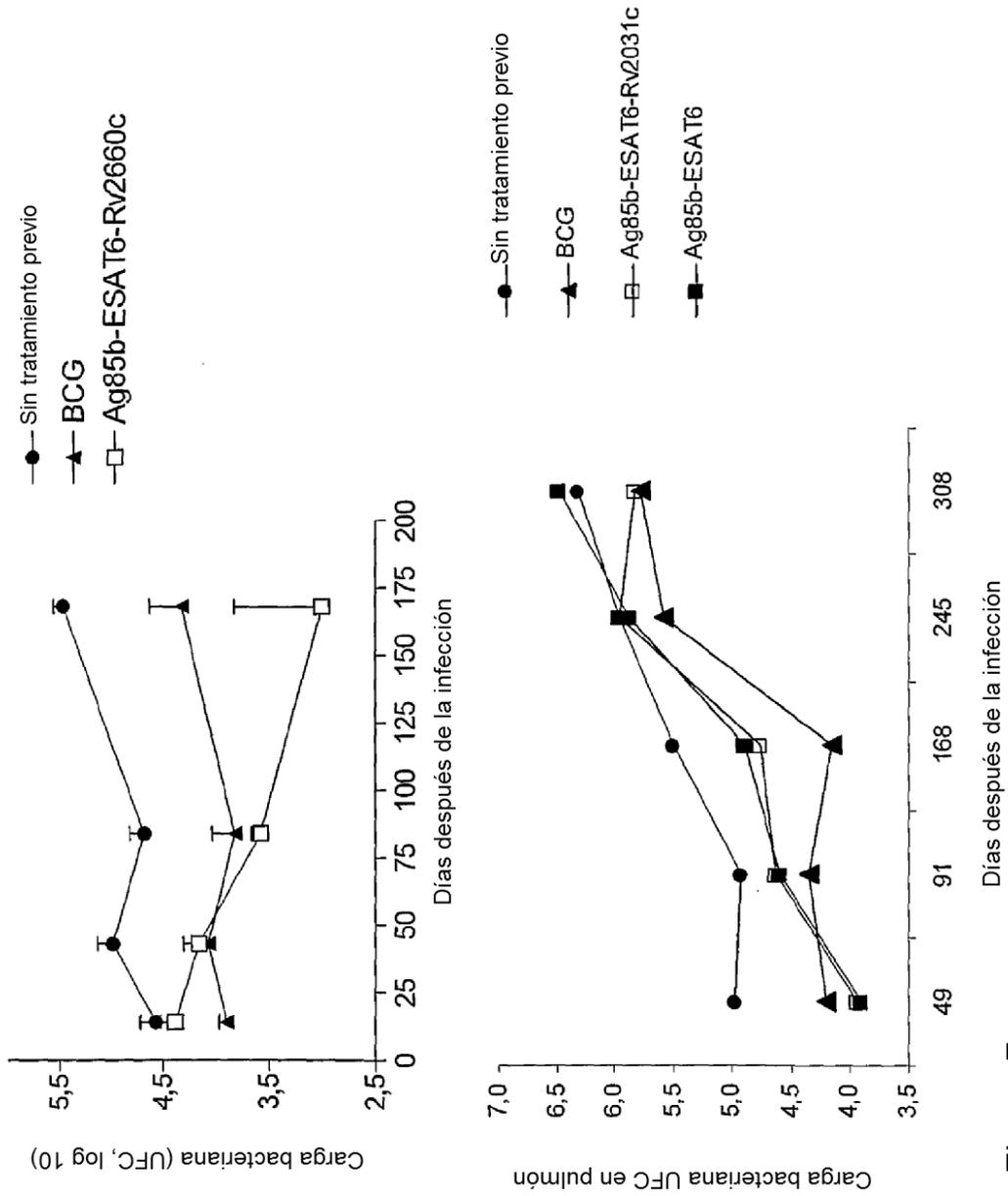


Figura 7

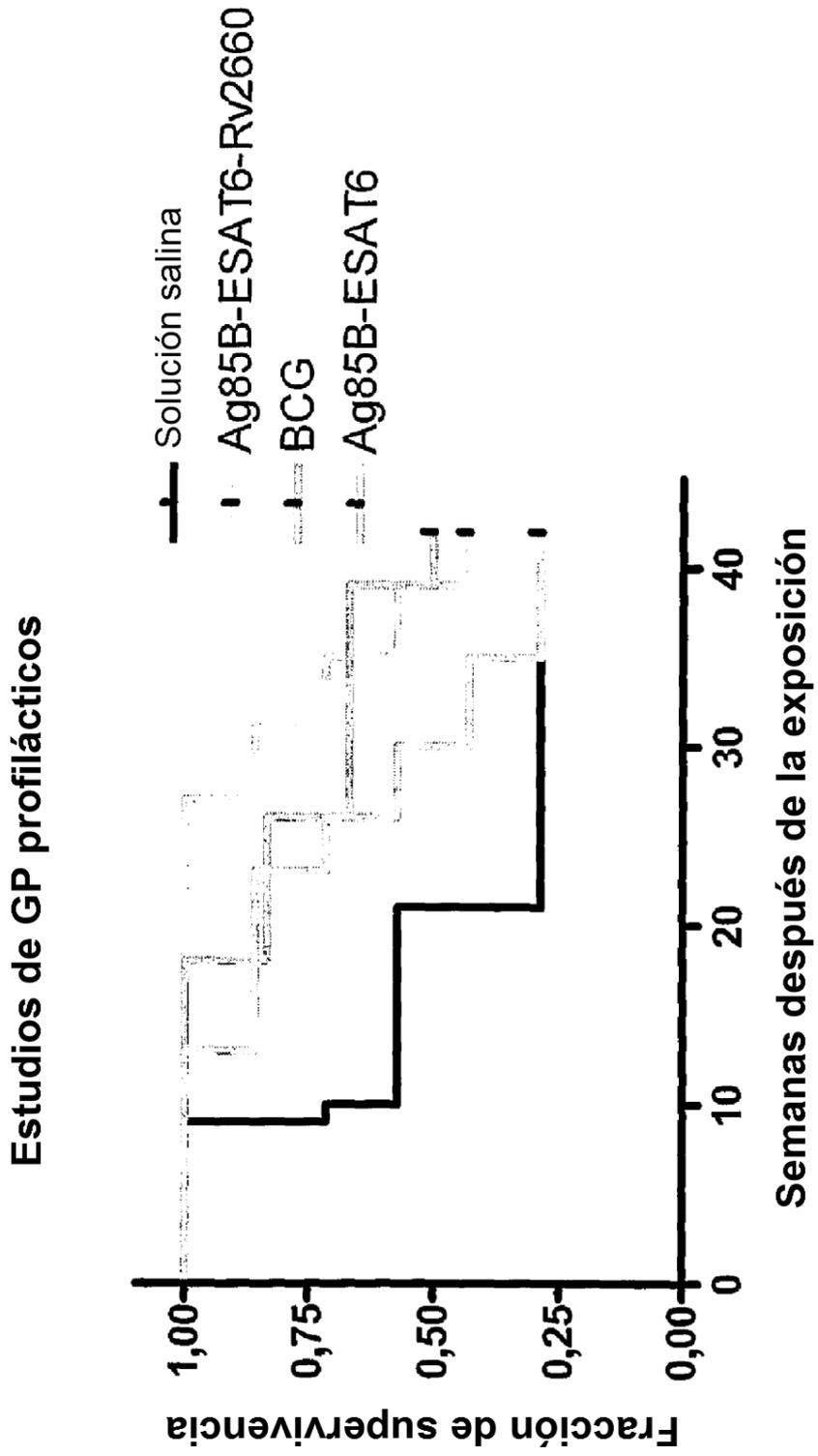


Figura 8

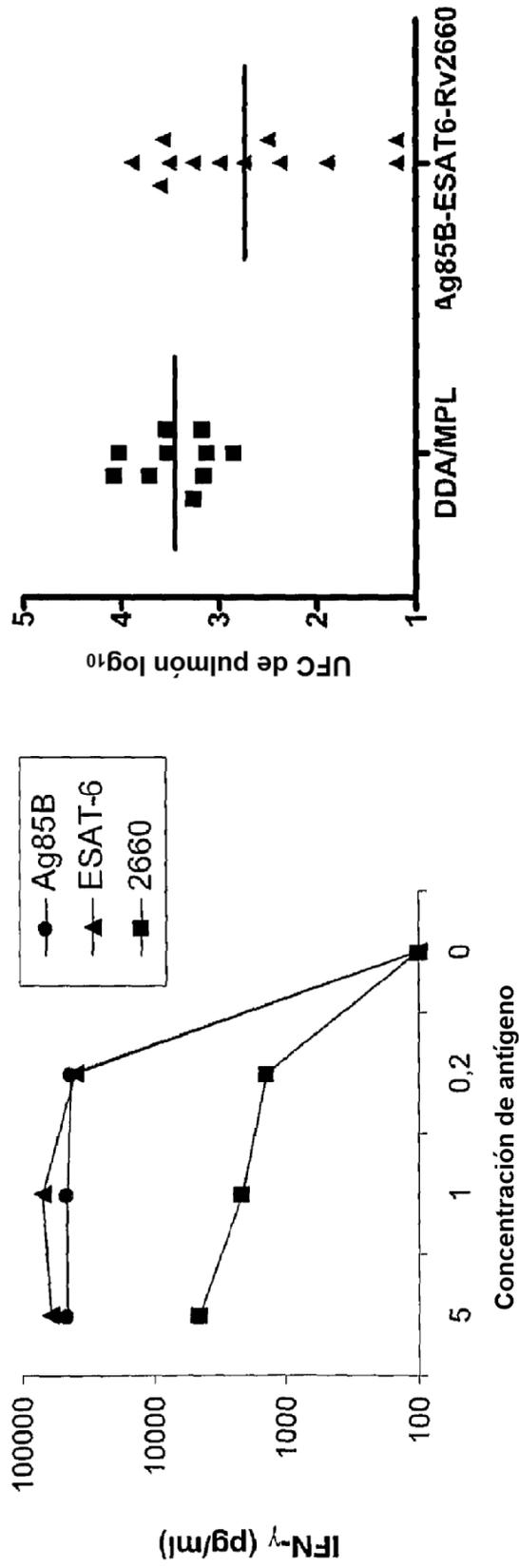


Figura 9