

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 190**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62	(2006.01)
C12N 15/53	(2006.01)
C12N 15/54	(2006.01)
C12N 15/31	(2006.01)
C07K 14/35	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)
A61K 38/44	(2006.01)
A61K 38/45	(2006.01)
A61K 39/04	(2006.01)
A61P 31/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/AU2012/001569**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13091004**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12859440 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2794885**

54 Título: **Prevención y tratamiento de la infección por Mycobacterium**

30 Prioridad:

22.12.2011 US 201161579166 P

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

19.02.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF SYDNEY (50.0%)
Parramatta Road The University of Sydney
New South Wales 2006, AU y
CENTENARY INSTITUTE OF CANCER MEDICINE
AND CELL BIOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TRICCAS, JAMES ANTHONY;
PINTO-NADANACHANDRAN, RACHEL y
BRITTON, WARWICK JOHN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 655 190 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

Prevención y tratamiento de la infección por Mycobacterium

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con la identificación de antígenos para prevenir y tratar infección por Mycobacterium, especialmente pero no exclusivamente infección por Mycobacterium tuberculosis, a sistemas de expresión que incluyen Mycobacterium vivo para la expresión de dichos antígenos para la prevención y tratamiento de dicha infección, y al uso de dichos antígenos y sistemas de expresión para la prevención y tratamiento de dicha infección.

Antecedentes de la invención

10 La referencia a cualquier técnica anterior en la especificación no es, y no debe tomarse como, un reconocimiento o sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia o en cualquier otra jurisdicción o que esta técnica anterior podría razonablemente esperarse a ser verificada, entendida y considerada relevante por una persona experimentada en la técnica.

15 Mycobacterium tuberculosis, el agente causante de la tuberculosis (TB), cobra casi 2 millones de vidas anualmente ((Dye, 2010) y globalmente es la principal causa de muerte debido a un solo agente bacteriano. La situación se ha vuelto más crítica en la última década debido a la coinfección con el VIH y la ineficacia de la vacuna actual, Bacillus Calmette-Guérin(BCG), para proteger a los adultos contra la TB ((Dye, 2010).

La identificación de antígenos novedosos y protectores reconocidos por individuos infectados representaría un avance importante en el control de la TB y podría formar la base de nuevas terapias para limitar la propagación de la enfermedad.

20 Las vacunas para TB actuales en los ensayos clínicos incluyen vacunas de subunidades de vectores virales o con base en adyuvantes, así como vacunas micobacterianas enteras, que expresan uno o más antígenos inmunogénicos de M. tuberculosis (Kaufmann, 2011). La mayoría de estas estrategias se basan en antígenos secretados de M. tuberculosis que, presumiblemente, se "ven" más fácilmente por la respuesta inmune del huésped (revisado en ((Kaufmann, 2011)). La eficacia protectora en humanos de estas nuevas vacunas candidatas aún no se ha determinado.

Sigue existiendo la necesidad de más antígenos candidatos y vacunas para la prevención y/o el tratamiento de la infección por Mycobacterium, especialmente la infección por M. Tuberculosis.

30 Además de la identificación de antígenos, la modulación dirigida de la expresión del antígeno en células presentadoras de antígeno mediante vehículos de vacuna recombinantes tales como Bacilo Calmette Guerin (BCG) ayudaría significativamente al desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas eficaces.

Sigue existiendo la necesidad de sistemas de expresión candidatos, especialmente aquellos capaces de una expresión inmediata y sostenida del antígeno protector, permitiendo de este modo respuestas inmunes específicas de antígeno mejoradas a Mycobacterium, especialmente M. tuberculosis.

Resumen de la invención

35 La invención busca abordar una o más de las necesidades mencionadas anteriormente y/o proporciona mejoras en la prevención y/o tratamiento de infección por Mycobacterium y en una realización proporciona un método para minimizar la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en un individuo que incluye:

- formar una respuesta inmune a un componente de una vía de asimilación de un sulfato de Mycobacterium (SAP) en un individuo;

40 minimizando así la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en el individuo.

En otra realización, se proporciona un método para proporcionar a un individuo con inmunidad a la infección por Mycobacterium, que incluye:

- formar una respuesta inmune a un componente de un Mycobacterium SAP en un individuo;

proporcionando así al individuo inmunidad a la infección por Mycobacterium.

45 En otra realización, se proporciona un método para prevenir el desarrollo de una infección por Mycobacterium en un individuo que incluye:

- proporcionar un componente de un Mycobacterium SAP en un individuo que requiere dicha prevención en condiciones para permitir la formación de una respuesta inmune a dicho componente en dicho individuo;

evitando así que la infección se desarrolle en el individuo.

En otra realización, se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene una infección por Mycobacterium para, como mínimo, minimizar la progresión de la infección o una afección asociada con la infección, que incluye:

- proporcionar un componente de un Mycobacterium SAP en un individuo que requiere dicho tratamiento en condiciones para permitir la formación de una respuesta inmune a dicho componente en dicho individuo;

5 de ese modo tratando al individuo.

En otra realización, se proporciona un uso de un componente de un Mycobacterium SAP en la fabricación de un medicamento para minimizar la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en un individuo.

En otra realización, se proporciona un uso de un componente de Mycobacterium SAP para minimizar la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en un individuo.

10 Se divulga un método para determinar si una persona es inmune a una Mycobacterium, incluyendo:

- proporcionar un componente de un Mycobacterium SAP en un individuo en condiciones para permitir la formación de una respuesta inmune a dicho componente en dicho individuo;

- determinar si el individuo desarrolla una respuesta inmune protectora a dicho componente;

en el que el desarrollo de una respuesta inmune protectora determina que el individuo es inmune a un Mycobacterium;

15 determinando así si el individuo es inmune a un Mycobacterium.

El gen o producto génico Mycobacterium CsyD es un componente para uso en los métodos descritos anteriormente.

En otra realización, se proporciona una vacuna o composición inmunoestimulante para proporcionar una respuesta inmune a Mycobacterium en un individuo que incluye:

- un componente de un Mycobacterium SAP;

20 • un compuesto para potenciar una respuesta inmune al componente del Mycobacterium SAP.

En otra realización, se proporciona una vacuna o composición inmunoestimulante para proporcionar una respuesta inmune a un Mycobacterium en un individuo que incluye:

- una célula de Mycobacterium que incluye un gen o proteína CysD recombinante.

25 En otra realización, se proporciona una proteína recombinante adecuada para usar en la composición descrita anteriormente, dicha proteína incluye una primera región que tiene una secuencia codificada por un gen Mycobacterium CysD y una o más regiones adicionales que tienen una secuencia codificada por un gen Mycobacterium Agb85. También se proporciona un ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, y un vector de expresión que incluye dicho ácido nucleico.

30 En otra realización, se proporciona una proteína adecuada para uso en la composición descrita anteriormente que incluye una primera región que tiene una secuencia codificada por un gen Mycobacterium CysD y una región adicional que tiene una secuencia codificada por un gen Mycobacterium Agb85. También se proporciona un ácido nucleico que codifica la proteína y un vector de expresión que incluye dicho ácido nucleico.

35 Se divulga un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica una proteína de Mycobacterium CysD y un promotor, en el que dicho promotor está ligado operativamente al ácido nucleico para la expresión del ácido nucleico cuando una cepa de Mycobacterium que incluye el vector se introduce en una APC, teniendo dicho promotor una secuencia de un promotor de Mycobacterium que causa la expresión de una chaperona independiente de Mycobacterium ATP.

Se divulga un Mycobacterium que incluye una proteína recombinante, ácido nucleico o vector de expresión descrito anteriormente. La célula puede derivarse de M. tuberculosis o puede ser una cepa atenuada de M. tuberculosis.

40 Se divulga un método para proporcionar una respuesta inmune específica de antígeno a la infección por Mycobacterium, que incluye:

- introducir una cepa de Mycobacterium en una célula presentadora de antígeno (APC);

en la que dicha cepa incluye:

45 • un ácido nucleico recombinante que codifica un antígeno de Mycobacterium para proporcionar una respuesta inmune específica de antígeno a la infección por Mycobacterium;

- un promotor operativamente unido al ácido nucleico recombinante para la expresión del ácido nucleico recombinante cuando la cepa se introduce en una APC, teniendo dicho promotor una secuencia de un promotor de Mycobacterium que causa la expresión de una chaperona independiente de Mycobacterium ATP.

Se divulga un vector de expresión que incluye:

- 5
- un ácido nucleico que codifica un antígeno de Mycobacterium para proporcionar una respuesta inmune específica de antígeno a la infección por Mycobacterium;
 - un promotor operativamente unido al ácido nucleico para la expresión del ácido nucleico cuando la cepa se introduce en una APC, teniendo dicho promotor una secuencia de un promotor de Mycobacterium que causa la expresión de una chaperona independiente de Mycobacterium ATP.
- 10 El promotor HspX de Mycobacterium es un promotor preferido para uso como un promotor que tiene la secuencia de un promotor de Mycobacterium que causa la expresión de una chaperona independiente de Mycobacterium ATP.

Se divulga una cepa de Mycobacterium que incluye el vector de expresión descrito anteriormente.

En otra realización, se proporciona un vector de expresión que incluye:

- 15
- un ácido nucleico que codifica una proteína que incluye una primera región que tiene una secuencia codificada por un gen Mycobacterium CysD y una región adicional que tiene una secuencia codificada por un gen Mycobacterium Agb85;
 - un promotor HspX de Mycobacterium que causa la expresión de dicho ácido nucleico cuando dicho vector se introduce en una APC.

20 Se divulga una célula, típicamente una célula de *M. tuberculosis* o una célula de Mycobacterium atenuada, por ejemplo una célula de *M. bovis* atenuada tal como BCG, o una célula atenuada de *M. tuberculosis*, incluyendo dicha célula el vector de expresión descrito anteriormente.

Se divulga un método para minimizar la probabilidad de desarrollo de una infección por *M. tuberculosis* en un individuo, que incluye:

- 25
- proporcionar una célula atenuada de *M. tuberculosis* en un individuo en el que se minimice la probabilidad de desarrollo de dicha infección;

en el que dicha célula incluye:

un vector de expresión que incluye:

- 30
- un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína que incluye una primera región que tiene una secuencia codificada por un gen Mycobacterium Agb85 y una región adicional que tiene una secuencia codificada por un gen Mycobacterium CysD;
 - un promotor de Mycobacterium HspX que causa la expresión de dicho ácido nucleico recombinante cuando dicho vector se introduce en un APC;

en el que dicha célula se proporciona en dicho individuo en condiciones para formar una respuesta inmune en el individuo a dicha proteína;

35 minimizando así la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en el individuo.

Breve descripción de los dibujos

40

Figura 1. Sobrerregulación del complejo de activación del sulfato de *M. tuberculosis* dentro de las células del hospedador y durante la persistencia no replicante. (A) Organización genética del locus cysDNC que codifica el complejo de activación del sulfato. En *M. tuberculosis*, las actividades de cysN (GTPasa) y cysC (quinasa) se fusionan juntas en un polipéptido y CysDNC constituye un operón. (B) Nivel de expresión relativo de CysDNC; medido por PCR cuantitativo en tiempo real, de bacilos cultivados durante 48 horas en cultivo (barra transparente) o 48 horas después de la infección de células RAW (barra negra). Los datos son la expresión relativa media \pm S.E.M medida por triplicado y es representativa de dos experimentos independientes. (C) Efecto de DETA-NO (Det) sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* cultivada. Se añadió DETA-NO 50 μ M al cultivo de *M. tuberculosis* (cuadrados rellenos) cada 24 horas durante 7 días o se dejó sin tratar (círculos rellenos). En los días 0, 1, 3 y 7, se tomaron alícuotas para determinar CFU/ml. (D) Nivel de expresión relativa de cysDNC (barra negra) en el día 7 después del tratamiento con DETA-NO en comparación con el cultivo de *M. tuberculosis* sin tratar (barra transparente).

50

Figura 2. Reconocimiento inmunitario del huésped del complejo de activación del sulfato *M. tuberculosis*. Las respuestas de células T específicas de antígeno en el MLN de ratones se midieron 3. (A) y 8 (B) semanas después de la exposición a *M. tuberculosis* intranasal. Las células secretoras de IFN- γ se enumeraron mediante ELISpot después

de evocación a las proteínas CysDNC o 85B (10 µg/ml). Los datos son las medias ± S.E.M. para cuatro ratones y son representativos de experimentos duplicados. La significancia de las diferencias entre las células estimuladas con proteínas y las células no estimuladas se determinó mediante ANOVA; * p <0,0001. (C) Se midieron las respuestas de células T específicas de antígeno en la sangre periférica de pacientes infectados con *M. tuberculosis* (círculos abiertos) (n= 15) e individuos TST-ve (círculos rellenos) (n= 11). Proliferación de células T en respuesta a *M. tuberculosis*. Las proteínas CFP, CysDNC y Ag85B a 10 µg/ml se midieron mediante la incorporación de ³H-timidina y se calculó un índice de estimulación. Las líneas horizontales representan la mediana para cada grupo. La significancia de las diferencias entre los pacientes infectados con *M. tuberculosis* y los individuos TST-ve se determinó mediante la prueba U de Mann-Whitney; * p <0,001.

Figura 3. Protección proporcionada por vacunas de ADN que codifican miembros del complejo de activación de sulfato después de la exposición a *M. tuberculosis*. Ratones C57BL/6 (n= 5) se inmunizaron 3 veces mediante inyección i.m a intervalos de 2 semanas con 100 µg cada una de pCADN3, ADN-cysD, ADN-cysNC o ADN-cysD combinados con ADN-cysNC. En el momento de la primera inyección de vacunas de ADN, los ratones se inmunizaron una vez mediante inyección s.c. con 5 x 10⁵ CFU de BCG. Cuatro semanas después de la tercera inmunización, los ratones fueron expuestos a *M. tuberculosis* en aerosol. Cuatro semanas después de la exposición, se determinó la carga bacteriana en el pulmón (A) y el bazo (B). Estos datos se muestran como la CFU media (± SEM) por órgano y son representativos de 1 de 3 experimentos individuales para todos los grupos. La significancia de las diferencias entre los grupos no vacunados e inmunizados en el pulmón y el bazo se determinó mediante ANOVA; * p <0,001.

Figura 4. Sobrerregulación y reconocimiento inmune del huésped de las enzimas corriente abajo en la vía de activación del sulfato de *M. tuberculosis*. (A) Sobrerregulación relativa de genes de *M. tuberculosis* SAP dentro de células RAW en comparación con bacilos cultivados in vitro. El ARN total se extrajo de bacilos cultivados in vitro o células RAW infectadas con *M. tuberculosis* 48 horas después de la infección. 1 µg de ARN total se transcribió de forma inversa y se sometió a PCR en tiempo real para evaluar la expresión de *M. tuberculosis* cysH, sirA, cysK1 y cysE. Los datos son la expresión relativa media ± S.E.M medida por triplicado y es representativa de dos experimentos independientes. (B) Las respuestas de células T específicas de antígeno en el MLN de ratones se midieron 8 semanas después de la exposición a *M. tuberculosis*. Las células secretoras de IFN-γ se enumeraron mediante ELISPOT después de la evocación de CysH, SirA, CysK1 y CysE (10 µg/ml). Los datos son las medias ± S.E.M. para cuatro ratones y son representativos de experimentos duplicados. La significancia de las diferencias entre las células estimuladas con proteínas y las células no estimuladas se determinó mediante ANOVA; * p <0,0001. (C) Reconocimiento de proteínas SAP en individuos infectados con TB. Se midieron las respuestas de células T específicas de antígeno en la sangre periférica de pacientes infectados con *M. tuberculosis* (círculos abiertos) (n= 15) e individuos TST-ve (círculos rellenos) (n= 11). Proliferación de células T en respuesta a *M. tuberculosis*. Proteínas de CFP (según la Figura 2C), CysH, SirA, CysK1 y CysE a 10 µg/ml se midió como se describe en la figura 2C. La significancia de las diferencias entre los pacientes infectados con *M. tuberculosis* y los individuos TST-ve se determinó mediante una prueba U de Mann-Whitney; * p <0,001.

Figura 5. Eficacia protectora de las vacunas de ADN que codifican las enzimas SAP corriente abajo. Ratones C57BL/6 (n= 5) se inmunizaron 3 veces mediante inyección i.m a intervalos de 2 semanas con 100 µg cada uno de pCADN3, ADN-cysD combinado con ADN-cysNC, o una mezcla de vacunas de ADN que expresan cysH, sirA, cysK1 o cysE. En el momento de la primera inyección de vacunas de ADN, los ratones se inmunizaron una vez mediante inyección s.c. con 5 x 10⁵ CFU de BCG. Cuatro semanas después de la tercera inmunización, los ratones fueron expuestos a *M. tuberculosis* por aerosol. Cuatro semanas después, se determinó la carga bacteriana en el pulmón (A) y el bazo (B). Estos datos se muestran como la CFU media (± SEM) por órgano y son representativos de 1 de 3 experimentos individuales para todos los grupos. La significancia de las diferencias entre los grupos no vacunados y los grupos inmunizados en el pulmón y el bazo (* p <0,0001) y las diferencias entre los animales inmunizados con BCG y otros grupos inmunizados (+p <0,0001) se determinaron mediante ANOVA.

Figura 6. Eficacia protectora de BCG después de reforzar con la proteína CysDN. Se inmunizaron grupos de ratones con 5 x 10⁵ CFU de BCG por inyección s.c. y después de 24 semanas, los ratones recibieron 100 µg s.c de proteína CysDNC en MPL-DDA (3 veces a intervalos de 2 semanas). Después de 6 semanas, los ratones se expusieron a *M. tuberculosis* en aerosol. Los ratones de control no fueron inmunizados ya sea no inmunizados o inmunizados con BCG y reforzados con adyuvante de MPL-DDA solamente. Cuatro semanas después de la exposición se determinaron las cargas bacterianas en el pulmón (A) y el bazo (B). Estos datos se presentan como el número bacteriano medio ± SEM por órgano para 6 a 10 ratones por grupo. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre ratones no inmunizados y otros grupos (* p <0,0001) y de las diferencias entre animales inmunizados con BCG/MPL-DDA y otros grupos (** p <0,0001; NS-sin diferencia significativa) se determinaron mediante ANOVA.

Figura complementaria 1. Asimilación de sulfato en micobacterias. Una vez importado a la célula, el sulfato se activa con ATP Sulfurilasa, codificado por CysDNC para producir adenosin-5'-fosfosulfato (APS). En micobacterias, APS se encuentra en un punto de ramificación metabólica. Podría ser fosforilado por APS quinasa, codificado por cysC, para producir fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), que funciona como el donante universal de sulfato para la sulfatación de biomoléculas que son el componente básico de la pared celular micobacteriana. La unidad estructural de sulfato en APS también podría reducirse a sulfito, catalizado por APS reductasa y codificado por cysH. El sulfito se reduce aún más a sulfuro por sulfito reductasa (codificado por sirA) y es la forma de azufre que se incorpora en la cisteína en

el último paso de esta vía reductora que implica dos enzimas, O-Acetilserina sulfidrasa (OASS) y serina acetiltransferasa codificada por *cysK1* y *cysE* respectivamente. La cisteína es el componente básico de muchas moléculas importantes en las micobacterias.

5 Figura 7. Inducción rápida del promotor *hspX* dentro de las células dendríticas. El nivel de expresión de GFP por BCG Pasteur, cultivos aireados BCG:*P_{hspX}*-GFP (rodando) o BCG:*P_{hspX}*GFP cultivados bajo tensión baja de oxígeno durante 7 días (vertical) se midió por citometría de flujo (A). El cultivo de BMDC de ratones C57BL/6 se infectó con BCG:*P_{hspX}*-GFP en MOI de 1:1 y la fluorescencia de GFP se determinó a 0, 6 y 24 horas después de la infección mediante citometría de flujo (B). Los datos muestran medias \pm SEM (n= 3) y son representativos de dos experimentos independientes. Las significancias de las diferencias relativas al punto de tiempo cero se determinaron mediante ANOVA (**p <0,0001). Expresión de GFP por BCG:*P_{hspX}*-GFP se visualizó mediante microscopía confocal a las 0, 6 y 24 horas después de la infección con BMDC (C). Las imágenes que se muestran son compuestas que usan el filtro GFP y las imágenes de contraste de fase para visualizar la morfología celular.

15 Figura 8. Inducción in vivo del promotor *hspX* dentro del huésped. Los ratones se vacunaron por vía subcutánea con 1×10^7 CFU de control BCG o BCG:*P_{hspX}*-GFP y a los 0, 1, 3 y 7 días después de la infección el nivel de expresión de GFP en las células CD45 se determinó del sitio de infección (A). Gráfico de distribución de células de ratones BCG:*P_{hspX}*-GFP (puntos negros) se superponen sobre el nivel de expresión de GFP de ratones infectados con BCG de control (puntos grises). El número total de GFP del inyectado se muestra en (B). Los datos mostrados son las medias \pm SEM y son representativos de dos experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre el día 0 y otros puntos de tiempo se determinó mediante ANOVA (** p <0,01; *** p <0,0001).

20 Figura 9. Expresión del promotor *hspX* dentro de células dendríticas reclutadas al sitio de vacunación. Los ratones se vacunaron como se describe en la Figura 2 y se determinó el número de células que exhibían un fenotipo DC (CD11_{chi}CD11_{bhi}) por citometría de flujo (A). Las células que expresan GFP dentro de la población CD45₊ se muestran como un gráfico de dispersión (B) junto con el número total de células GFP₊CD11_{bhi}CD11_{chi} en el sitio de vacunación a lo largo del tiempo (C). Los datos mostrados son medias \pm SEM y son representativos de dos experimentos independientes. La significancia de las diferencias entre el día 0 y otros puntos de tiempo se determinó mediante ANOVA (* p <0,05; ** p <0,001; *** p <0,0001).

30 Figura 10. El promotor *hspX* puede facilitar el reconocimiento de células T mejorado de un antígeno recombinante dentro de APCs. Los BMDC cultivados no se infectaron (uni) o se infectaron con control BCG, BCG:*P_{hsp60}*-85B o BCG:*P_{hspX}*-85B durante 4 horas antes de la coincubación con células T específicas de Ag85B purificadas a partir de ratones p25. La proliferación (A) y la liberación de IFN- γ (B) por las células T p25 en el día 3 se determinó mediante captación de [³H]-timidina o IFN- γ ELISA, respectivamente. Los datos muestran medias \pm SEM (n= 3) y son representativos de al menos dos experimentos independientes. Las significancias de las diferencias entre las células no infectadas y otros grupos se determinaron mediante ANOVA (**p <0,0001; ns, no significativo).

35 Figura 11. Cebado de células T reactivas con Ag85B en los DLNs de ratones vacunados con BCG:*P_{hspX}*-85B. Ratones C57BL/6 fueron inyectados por vía intravenosa con 5×10^5 células de ganglios linfáticos transgénicos p25 marcados con CFSE y un día más tarde se dejaron como controles no infectados (unv) o vacunados por vía subcutánea con 5×10^5 CFU de BCG, BCG:*P_{hsp60}*-85B o BCG:*P_{hspX}*-85B. A los 3 o 7 días después de la infección, se determinó el perfil CFSE y CD62L de las células T CD4 p25 transferidas en los DLNs (A). Los estados de división se representan como CFSE_{hi} (alto), CFSE_{int} (divisiones 1-5, int) o CFSE_{lo} (divisiones > 6, bajo). Se determinó la proporción de células T CD4 p25 en estados de división con base en los niveles de CFSE (B).

40 Figura 12. Inmunidad específica de las células T aumentada inducida por la vacunación con BCG que expresa Ag85B bajo el control del promotor *hspX*. Los ratones se dejaron sin vacunar (unv) o se vacunaron de manera subcutánea con 5×10^5 CPU de control BCG, BCG:*P_{hsp60}*-85B o BCG:*P_{hspX}*-85B. El número de esplenocitos que secretan IFN- γ que responden al péptido p25 de Ag85B se determinó a las 3 semanas (A) o 12 semanas (B) después de la vacunación. Doce semanas después de la vacunación, a los grupos de ratones también se les aplicó aerosol de *M. tuberculosis* H37Rv y 4 semanas después de la exposición se determinó la carga de *M. tuberculosis* en los pulmones (C) y el bazo (D). Los datos que se muestran son las medias \pm SEM para tres ratones por grupo y son representativos de dos experimentos independientes. Las significancias de las diferencias entre los ratones no vacunados y los grupos vacunados con BCG se determinaron mediante ANOVA (*p <0,05; **p <0,001; ***p <0,0001).

50 Figura 13. Vacunación con BCG:Ag85BCysD muestra inmunogenicidad mejorada. Se inmunizaron ratones C57BL/6 (n= 5) con 5×10^5 CFU de BCG o BCG que expresan la proteína de fusión Ag85BCysD. Los esplenocitos reestimulados con proteína Ag85BCysD demostraron un mayor número de células secretoras de IFN- γ en comparación con los esplenocitos de ratones inmunizados únicamente con BCG.

55 Figura 14. Protección inducida por la proteína de fusión Ag85B-CysD. Se inmunizaron ratones C57BL/6 (n= 5) 3 veces mediante inyección s.c. con adyuvante (MPL/DDA), proteína de fusión Ag85B-CysD (10 mg) o Ag85B (10 mg). En el momento de la primera inyección de vacunas de proteínas, los ratones se inmunizaron una vez mediante inyección s.c. con 5×10^5 CFU de BCG. Cuatro semanas después de la tercera inmunización, se expuso a los ratones con aerosol de *M. tuberculosis* con una dosis infecciosa de 100 bacilos viables por pulmón y se determinó la carga bacteriana en el pulmón (A) y el bazo (B) 4 semanas después. Los datos se muestran como la media de CFU (\pm SEM)

por órgano. La significancia de las diferencias entre los grupos se evaluó mediante ANOVA de una vía con una comparación por pares de conjuntos de datos agrupados de forma múltiple mediante la prueba post hoc de Bonferroni.

Descripción detallada de las realizaciones

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención.

5 Para el propósito de interpretar esta especificación, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa.

10 Como se describe aquí, los inventores muestran que los genes de la vía de asimilación de sulfato (SAP) y productos genéticos relacionados son altamente inmunorreactivos en el sentido de que la estimulación de linfocitos derivados de ganglios linfáticos de ratones infectados con *M. tuberculosis* con proteínas SAP proporciona una fuerte respuesta Th1 que dura hasta 8 semanas después de la infección. Además, en humanos infectados con *M. tuberculosis*, se observó que los linfocitos de sangre periférica proliferaban en respuesta a proteínas SAP en mayor medida que las células de individuos con *M. tuberculosis* negativos.

15 Además de lo anterior, los inventores muestran que los genes y proteínas de SAP pueden utilizarse para inducir una respuesta inmune protectora específica de antígeno. Más específicamente, los inventores muestran que la inmunización con genes y proteínas de SAP proporciona protección a los pulmones y el bazo en ratones infectados posteriormente con *M. tuberculosis* y la eficacia protectora se acerca a la observada con la inmunización con BCG.

20 Además, los inventores muestran que los genes y productos génicos de SAP pueden usarse para mejorar la inmunidad protectora proporcionada por la vacuna BCG por lo que, como se muestra en la especificación, los componentes de SAP mejoraron el efecto protector de BCG contra la infección por *M. tuberculosis* que fue más evidente en tejido pulmonar

25 Como se discute aquí, estos hallazgos son imprevistos ya que se propone que las proteínas SAP son proteínas intracelulares o asociadas a la membrana que, dada su ubicación, deben ser menos propensas que las proteínas secretadas a someterse a vigilancia inmunitaria. A este respecto, es sorprendente que la cantidad de activación inmune observada en estos estudios sea equivalente a la observada para el antígeno de superficie celular o antígeno secretado, Ag85B.

A. Definiciones

Tal como se usa aquí, excepto donde el contexto requiera lo contrario, el término "comprender" y variaciones del término, tales como "que comprende", "comprende" y "comprendido", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

30 La vía de asimilación de sulfato o SAP generalmente se refiere a la vía por la cual las micobacterias reducen el azufre, obteniendo de este modo un sustrato para la biosíntesis de cisteína y productos corriente abajo, incluido el micotiol. Con más detalle, la vía implica la formación de adenosina 5'-fosfosulfato (APS) a partir de sulfato, a partir del cual la reductasa de APS (codificada por CysH) puede producir sulfito, y a partir de la cual la sulfito reductasa (codificada por SirA) puede producir sulfuro y a partir de la cual, y con O-Acetil-L-serina, O-Acetil-L-serina Sulfidilasa (codificada por CysK1) puede producir cisteína. Las enzimas clave de SAP incluyen ATP sulfurilasa (adenilil-transferasa) (codificada por CysD), GTPasa (codificada por CysN) y APS quinasa. Estas enzimas permiten la formación de PAS a partir de sulfato y la formación de 3'fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) de APS.

40 Un componente SAP generalmente se refiere a una proteína o enzima implicada en la reducción de azufre en *Mycobacterium* de acuerdo con el SAP, ejemplos de los cuales incluyen los codificados por los genes CysD, CysNC, CysH, SirA, CysE, CysK1.

El complejo activador de sulfato o SAC generalmente se refiere a un complejo heterodimérico formado a partir de la asociación del producto del gen CysD con el producto del gen CysNC. Los genes CysD y CysNC existen juntos en micobacteria como un operón.

45 El gen CysD generalmente se refiere a un ácido nucleico que codifica una ATP sulfurilasa. El ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se muestra en la SEQ ID No: 1 aquí o que tiene homología y/o identidad definidas como se define aquí.

La proteína CysD generalmente se refiere a una ATP sulfurilasa. La proteína puede tener una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en la SEQ ID No: 2 aquí o tener de otra manera homología y/o identidad como se define aquí.

50 El gen CysNC generalmente se refiere a un ácido nucleico que codifica una GTPasa y una APS quinasa. El ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se muestra en la SEQ ID No: 3 aquí o tener de otra manera homología y/o identidad definidas como se define aquí.

La proteína CysNC generalmente se refiere a una GTPasa y a una APS quinasa. La proteína puede tener una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en la SEQ ID No: 4 aquí o tener una homología y/o identidad definidas como se define aquí.

5 El gen Ag85B generalmente se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se muestra en la SEQ ID No: 5 aquí o que tiene homología y/o identidad definidas como se define aquí.

La proteína Ag85B generalmente se refiere a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en la SEC ID No: 6 aquí o que tiene una homología y/o identidad definidas como se define aquí.

El promotor HspX generalmente se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se muestra en la SEQ ID No: 7 aquí o que tiene homología y/o identidad definidas como se define aquí.

10 85BCysD generalmente se refiere a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se muestra en la SEC ID No: 8 aquí.

pHspX85BCysD generalmente se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente como se muestra en la SEC ID No: 9 aquí.

B. Inducción de inmunidad específica de antígeno

15 Como se discute aquí, y se ejemplifica en los ejemplos, los inventores han demostrado que los componentes de SAP provocan una respuesta inmune protectora específica de antígeno. Específicamente, la inmunización con componentes de SAP, y en particular, componentes SAC previene la progresión de la infección por Mycobacterium en ratones infectados posteriormente con M. tuberculosis. Además, los inventores muestran que los componentes de SAP pueden usarse para reforzar la inmunidad derivada de la inmunización con BCG y que los componentes de SAP son altamente inmunorreactivos en individuos infectados con M. tuberculosis, sugiriendo que estos componentes son
20 útiles para minimizar el desarrollo de una enfermedad o condición causada por infección. Por lo tanto, la invención proporciona métodos para: (i) profilaxis; (ii) tratamiento; y (iii) reforzar la inmunidad a la infección por Mycobacterium. Es en estos contextos que los métodos de la invención minimizan la probabilidad de desarrollo de una infección, ya sea impidiendo que la infección se convierta en una enfermedad o patología relevante, o previniendo el desarrollo posterior de una enfermedad o patología una vez que se ha establecido una infección.
25

Por consiguiente, en una realización se proporciona un método para minimizar la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en un individuo que incluye:

- formar una respuesta inmune a un componente de una vía de asimilación de sulfato de Mycobacterium (SAP) en un individuo;

30 minimizando así la probabilidad de que se desarrolle una infección por Mycobacterium en el individuo.

En una realización, el individuo puede no tener una infección de Mycobacterium detectable y/o puede no haberse inmunizado previamente contra Mycobacterium. Tal individuo puede generalmente identificarse mediante la prueba de Mantoux que se usa ampliamente en la técnica.

35 En otra realización, el individuo puede ser asintomático o tener síntomas subclínicos de infección. Un sujeto asintomático más típicamente, tiene uno o más síntomas (por ejemplo, fiebre, tos, pérdida de peso). Los bacilos pueden estar presentes y cultivables, es decir, pueden cultivarse en cultivo a partir de los fluidos corporales anteriores y los individuos pueden tener lesiones pulmonares radiográficas evidentes que pueden incluir infiltración pero sin cavitación.

40 En otra realización, el individuo puede tener síntomas obvios de infección tales como lesiones cavitarias en los pulmones. Los bacilos pueden ser cultivables a partir de frotis de esputo y/u otros fluidos corporales señalados anteriormente, pero también están presentes en cantidades suficientes para ser detectables como bacilos acidorresistentes en los frotis de estos fluidos.

45 Típicamente, la respuesta inmune es predominantemente una respuesta Th1. Esta respuesta se determina detectando la proliferación celular después de la administración de la vacuna medida por incorporación de ³H timidina, o usando ensayos celulares en los que se evalúa la producción de IFN- γ , tal como citometría de flujo y/o ELISA. La respuesta inmune también se puede medir detectando anticuerpos específicos (a un título en el intervalo de 1 a $\times 10^6$, preferiblemente 1×10^3 , más preferible en el intervalo de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^6 , y lo más preferiblemente mayor que 1×10^6).

50 Se determina una respuesta celular in vitro mediante la liberación de una citocina relevante tal como IFN-gamma, de linfocitos extraídos de un animal o humano actualmente o previamente infectado con micobacterias virulentas, o mediante la detección de la proliferación de estas células T. La inducción se realiza mediante la adición del polipéptido o la porción inmunogénica a una suspensión que comprende de 1×10^5 células a 3×10^5 células por pozo. Las células se aíslan de la sangre, el bazo, el hígado o el pulmón y la adición del polipéptido o la porción inmunogénica del polipéptido da como resultado una concentración de no más de 20 ug por ml de suspensión y la estimulación se realiza

desde dos a cinco días. Para controlar la proliferación celular, las células se pulsan con timidina marcada radiactivamente y después de 16-22 horas de incubación, la proliferación se detecta por recuento de centelleo líquido. Una respuesta positiva es una respuesta más que antecedentes más dos desviaciones estándar. La liberación de IFN-gamma puede determinarse por el método de ELISA, que es bien conocido por una persona experimentada en la técnica. Una respuesta positiva es una respuesta más que antecedentes más dos desviaciones estándar. Otras citocinas que IFN-gamma podrían ser relevantes cuando se controla una respuesta inmunológica al polipéptido, como IL-12, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF- β . Otro método y más sensible para determinar la presencia de una citocina (por ejemplo, IFN-gamma) es el método ELISPOT donde las células aisladas de la sangre, el bazo, el hígado o el pulmón se diluyen a una concentración de preferencia de 1 a 4 x 10⁶ células/ml y se incuban durante 18-22 horas en presencia del polipéptido o la porción inmunogénica del polipéptido que da como resultado una concentración de no más de 20 ug por ml. Las suspensiones celulares se diluyen a continuación de 1 a 2 x 10⁶/ml y se transfieren a placas Maxisorp recubiertas con anti-IFN-gamma y se incuban durante preferiblemente 4 a 16 horas. Las células productoras de IFN-gamma se determinan mediante el uso de anticuerpo anti-IFN secundario marcado y un sustrato relevante que da lugar a manchas, que se pueden enumerar usando un microscopio de disección. También es posible determinar la presencia de ARNm que codifica la citocina relevante mediante el uso de la técnica de PCR. Habitualmente, se medirán una o más citocinas utilizando, por ejemplo, el PCR, ELISPOT o ELISA. Una persona experimentada en la técnica apreciará que puede usarse un aumento o disminución significativo en la cantidad de cualquiera de estas citocinas inducidas por un polipéptido específico en la evaluación de la actividad inmunológica del polipéptido.

La respuesta inmune puede formarse proporcionando un componente de Mycobacterium SAP en un individuo en condiciones para permitir la formación de una respuesta inmune a dicho componente en dicho individuo. Estos componentes pueden proporcionarse en diversas formas, como se discute en los subtítulos correspondientes a continuación.

La BCG recombinante y otras micobacterias vivas pueden administrarse por vía subcutánea o por inhalación. El régimen de dosificación también puede ser determinado por la persona experimentada usando su experiencia (por ejemplo, administración única, administración repetida (dos veces o más a intervalos regulares o irregulares), etc. Esto también dependerá típicamente de la enfermedad que se va a tratar y del individuo que recibe el tratamiento (en el cáncer de vejiga en humanos, por ejemplo, un régimen de BCG en dosis bajas se ha descrito como 75 mg, mientras que una dosis estándar es de 150 mg). Sin embargo, se ha documentado que dosis de BCG tan bajas como 1 mg respaldan efectivamente una respuesta inmune durante un largo período de tiempo (5 años). En la tuberculosis, un ejemplo de una dosis típica es mucho menor: 0,075 mg, que corresponde a 0,3-1,2 millones de micobacterias vivas). En términos generales, una dosis típica puede caer entre 0,01 μ g/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal. En el tratamiento de la tuberculosis, un tratamiento generalmente protege durante varios años. Sin embargo, también se prevé que se administren dosis repetidas (como es, por ejemplo, típicamente el caso en el tratamiento del cáncer de vejiga).

Donde la vacuna o la composición inmunoestimulante se basa en péptidos, la forma de aplicación puede variar ampliamente. Cualquiera de los métodos convencionales para la administración de una vacuna son aplicables. Estos incluyen la aplicación oral, nasal o mucosal en una forma sólida que contiene los ingredientes activos (como una píldora, supositorio o cápsula) o en una dispersión fisiológicamente aceptable, como una aspersión, polvo o líquido, o parenteralmente, mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular o aplicada de manera transdérmica. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con la edad de la persona a vacunarse y, en menor medida, el tamaño de la persona a vacunar. Actualmente, la mayoría de las vacunas se administran por vía intramuscular mediante inyección con aguja y es probable que continúe como la ruta estándar. Sin embargo, se han desarrollado formulaciones de vacuna que inducen la inmunidad de la mucosa, típicamente por administración oral o nasal. Uno de los sistemas de administración más ampliamente estudiados para la inducción de la inmunidad de la mucosa contiene toxina del cólera (CT) o su subunidad B. Esta proteína mejora la respuesta inmune de la mucosa e induce la producción de IgA cuando se administra en formulaciones de vacunas. Una ventaja es la facilidad de administración de vacunas orales o nasales. Las toxinas modificadas de otras especies microbianas, que tienen una toxicidad reducida pero conservan la capacidad inmunoestimuladora, como la toxina termolábil modificada de bacterias Gram-negativas o las enterotoxinas estafilocócicas también pueden usarse para generar un efecto similar. Estas moléculas son particularmente adecuadas para la administración mucosal.

Las vacunas se administran de manera convencional por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, 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 los supositorios, los aglomerantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialcalenglicoles o triglicéridos; tales 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 normalmente empleados tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y ventajosamente contienen 10-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

Donde la vacuna o la composición inmunoestimulante es un vector viral, un portador puede ser cualquier sustancia que no induzca por sí misma la producción de anticuerpos perjudiciales para el paciente que recibe la composición, y

que puede administrarse sin toxicidad indebida. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas. Dichos portadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sustancias auxiliares, tales como los agentes humectantes o emulsionantes, las sustancias reguladoras del pH y similares, también pueden estar presentes en tales vehículos. También pueden estar presentes agentes estabilizantes tales como trehalosa o sustancias que permiten la formación de vidrio de azúcar soluble en agua a temperatura ambiente. Este último incluye el uso de tecnología de estabilización de vidrio soluble mixta en formato de microesferas suspendido en líquidos de perfluorocarbono. Los liposomas también son portadores adecuados. Una discusión a fondo de los portadores farmacéuticos está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª ed., ISBN: 0683306472. La composición farmacéutica es preferiblemente estéril. Es preferiblemente libre de pirógenos. Es preferiblemente regulada, por ejemplo, a pH entre 6 y pH 8, generalmente alrededor de pH 7. Preferiblemente, la composición es sustancialmente isotónica con humanos. Las composiciones de la invención se pueden administrar a través de una variedad de diferentes rutas. Ciertas rutas pueden favorecerse para ciertas composiciones, ya que dan como resultado la generación de una respuesta más eficaz, o que son menos probable que induzcan efectos secundarios, o que son más fáciles de administrar. Por ejemplo, las composiciones utilizadas en esta invención pueden administrarse por cualquier número de vías que incluyen, pero no se limitan a, aplicaciones orales, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicas o transcutáneas, o medios subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, intravaginales o rectales. Las composiciones se pueden preparar para administración intranasal, como aspersión nasal, gotas nasales, gel o polvo, como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; como formas sólidas adecuadas para solución en o suspensión en, portadores líquidos antes de la inyección. La administración directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, intranasal, o administrada al espacio intersticial de un tejido. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

C. Determinación de la inmunidad a la infección por Mycobacterium

Se divulga un método para determinar si una persona es inmune a una Mycobacterium, incluyendo:

- proporcionar un componente de un Mycobacterium SAP en un individuo en condiciones para permitir la formación de una respuesta inmune a dicho componente en dicho individuo;
- determinar si el individuo desarrolla una respuesta inmune protectora a dicho componente; en el que el desarrollo de una respuesta inmune protectora determina que el individuo es inmune a un Mycobacterium;

determinando así si el individuo es inmune a un Mycobacterium.

El método es particularmente útil para confirmar el resultado de las pruebas de Mantoux u otras pruebas convencionales de Mycobacterium, o para delinear un resultado de la prueba de Mantoux, por ejemplo, para identificar las principales características de una respuesta inmune particular, o la naturaleza de los inmunógenos relevantes sobre los que se basa la respuesta. Los diversos ensayos mencionados en el subtítulo anterior para detectar la formación de una respuesta inmune se pueden implementar aquí.

D. Vacunas y composiciones inmunoestimulantes

La invención proporciona vacunas y composiciones inmunoestimulantes. En ciertas realizaciones, las vacunas y las composiciones inmunoestimulantes son útiles para proporcionar una respuesta inmune protectora contra la infección por Mycobacterium, especialmente la infección por M. tuberculosis.

Generalmente, cuatro formas diferentes de vacuna o composición se describen de la siguiente manera:

- (i) los que son acelulares y que contienen como ingrediente activo para la estimulación inmune, un componente SAP recombinante o sintético.
- (ii) aquellos que contienen como ingrediente activo para la estimulación inmune, un extracto celular que puede enriquecerse para un componente de SAP.
- (iii) aquellos que contienen como un ingrediente activo para la estimulación inmune, una célula que expresa un componente de SAP recombinante.
- (iv) aquellos que contienen un ácido nucleico que codifica un componente SAP que, al administrarse a un individuo, se expresa para formar el ingrediente activo para la estimulación inmune.
- (v) aquellos que contienen un vector viral que codifica un componente de SAP que forma un ingrediente activo para la inmunización.

Un inmunógeno en cada una de estas formas es el gen CysD o producto génico, o fragmentos de homólogos de los mismos.

Estas formas se describen con más detalle a continuación.

D.1 Composiciones acelulares que contienen un componente SAP recombinante o sintético.

En una realización, la respuesta inmune se forma proporcionando un componente del SAP en la forma de una composición acelular que incluye proteína SAP aislada o recombinante en el individuo.

- 5 Generalmente, estas composiciones incluyen dos componentes clave, el primero es el inmunógeno en forma del componente recombinante o SAP sintético y el segundo es un adyuvante para potenciar una respuesta inmune al inmunógeno.

Volviendo al inmunógeno, esto incluye CysD, o un fragmento inmunogénico o antigénico u homólogo del mismo. Los fragmentos y homólogos se describen con más detalle a continuación.

- 10 Se entenderá que el inmunógeno puede incluir además otros antígenos o inmunógenos de *Mycobacterium* recombinantes o sintéticos. Estos pueden proporcionarse en una forma en la que se fusionan a CysD mediante un enlace covalente, donde se asocian de forma no covalente con CysD, o cuando no están unidos a CysD en absoluto. Uno de tales antígenos asociado covalentemente con CysD es Ag85B. Otros se discuten en WO2009/070700.

- 15 En una realización, un componente de SAP dado (tal como proteínas CysD, CysNC, CysH, SirA, CysE, CysK1 y sus genes codificantes) puede tener una función conservada en términos de actividad en la ruta de asimilación de sulfato y aún tener una secuencia divergente. Estas proteínas o ácidos nucleicos se denominan homólogos.

- 20 En ciertas realizaciones, un componente de SAP dado es uno que tiene al menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%, más preferiblemente 98% o 99% de identidad con un componente de SAP dado. Por ejemplo, un inmunógeno CysD puede ser uno que tenga al menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%, más preferiblemente 98% o 99% de identidad con una proteína CysD mostrada en la SEQ ID No: 2. La secuencia de ácido nucleico que codifica el inmunógeno CysD puede ser una que tenga al menos 75%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, más preferiblemente 95%, más preferiblemente 98% o 99% de identidad con un gen CysD mostrado en la SEQ ID No: 1.

- 25 El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante métodos convencionales, por medio de programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programa GCG (Manual de programa para el paquete de Wisconsin, Versión 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, Estados Unidos 53711) como se describe en Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-453. GAP se usa con las siguientes configuraciones para la comparación de secuencia de polipéptidos: penalización de creación de GAP de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1. La identidad de secuencia de las moléculas de polinucleótidos se determina mediante métodos similares usando GAP con la siguiente configuración para la comparación de la secuencia de ADN: penalización de creación de GAP de 5,0 y penalización de extensión de GAP de 0,3.

- 30 En otra realización, se proporciona un componente de SAP dado en forma de un fragmento que es capaz de formar una respuesta inmune protectora. Estos fragmentos son generalmente de suficiente longitud y conformación, lo que permite la presentación por parte del APC en la Clase I o II. Pueden tener una longitud que varía generalmente desde aproximadamente 8 a 15, y aproximadamente de 8 a 11 para la presentación de la Clase I y de 11 a 15 para la presentación de la Clase II.

- 35 Con el fin de identificar epítomos de células T relevantes que se reconocen durante una respuesta inmune, un método común es usar péptidos solapantes para la detección de epítomos de MHC de clase II, preferiblemente sintéticos, que tienen una longitud de, por ejemplo, 20 residuos de aminoácidos derivados del polipéptido. Estos péptidos se pueden analizar en ensayos biológicos, tales como el ensayo de IFN-gamma como se describe aquí y aquellos que dan una respuesta positiva se clasificarán como epítomos de células T inmunogénicas. Los epítomos MHC de clase I se pueden identificar prediciendo aquellos péptidos que se enlazarán a la Clase I (Stryhn, A., et al., 1996 *Eur. J. Immunol.* 26:1911-1918) y en lo sucesivo producirán estos péptidos sintéticamente y se probarán en ensayos biológicos relevantes, por ejemplo, el ensayo de IFN-gamma como se describe aquí.

- 40 Los péptidos que tienen preferiblemente una longitud de, por ejemplo, 8 a 11 residuos de aminoácidos derivados del polipéptido. Los epítomos de células B pueden determinarse analizando el reconocimiento de células B a péptidos solapantes que cubren el polipéptido de interés como es por ejemplo descrito en Harboe, M., et al 1998 *Infect. Immun.* 66:2; 717-723

Cualquiera de CysD, CysNC, CysH, SirA, CysE, CysK1 o secuencias de ácidos nucleicos relacionadas se puede hacer mediante síntesis en fase sólida o tecnología de ADN recombinante.

- 45 Volviendo al adyuvante, hay muchos ejemplos de adyuvantes conocidos en la técnica. Ver también Allison (1998, *Dev. Biol. Stand.*, 92:3-11), Unkeless et al. (1998, *Annu. Rev. Immunol.*, 6: 251-281), y Phillips et al. (1992, *Vaccine*, 10:151-

158). Los adyuvantes a modo de ejemplos que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, citocinas, sales de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Baylor et al., Vaccine, 20:S18, 2002), adyuvantes de tipo gel (por ejemplo, fosfato de calcio, etc.); adyuvantes microbianos (por ejemplo, secuencias de ADN inmunomoduladoras que incluyen motivos CpG; endotoxinas tales como monofosforil lípido A (Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407, 1986); exotoxinas tales como toxina del cólera, toxina lábil al calor de *E. coli* y toxina pertussis; dipéptido de muramilo, etc.); coadyuvantes con base en emulsiones oleosas y emulsionantes (por ejemplo, Adyuvante de Freund, MF59 [Novartis], SAF, etc.); adyuvantes particulados (por ejemplo, liposomas, microesferas biodegradables, etc.); adyuvantes sintéticos (por ejemplo, copolímeros de bloques no iónicos, análogos de péptidos de muramilo, polifosfaceno, polinucleótidos sintéticos, etc.); y/o combinaciones de los mismos. Otros adyuvantes a modo de ejemplos incluyen algunos polímeros (por ejemplo, polifosfacenos, descritos en la patente de los Estados Unidos 5,500,161), Q57, saponinas (por ejemplo, QS21, Ghochikyan et al., Vaccine, 24: 2275, 2006), escualeno, tetraclorodecaóxido, CPG 7909 (Cooper et al., Vaccine, 22:3136, 2004), poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] (PCCP; Payne et al., Vaccine, 16:92, 1998), interferón- γ (Cao et al., Vaccine, 10:238, 1992), copolímero de bloque P1205 (CRL1005; Katz et al., Vaccine, 18:2177, 2000), interleucina-2 (IL-2; Mbwuike et al., Vaccine, 8:347, 1990), polimetil metacrilato (PMMA; Kreuter et al., J. Pharm. Sci., 70:367, 1981), bromuro de dimetiloctadecilamonio (DDA), IC31@ (Vann Dissel, Vaccine, 29:2100, 2011), etc.

Estas composiciones también pueden incluir diluyentes, excipientes y portadores que permiten la administración de la composición, como se conoce en la técnica.

20 D.2 Extractos celulares

En otra realización, la respuesta inmune se forma proporcionando un componente del SAP en forma de un extracto celular que incluye una proteína SAP aislada o recombinante en el individuo.

Los extractos de células se pueden obtener mediante técnicas conocidas, que incluyen, por ejemplo, la sonicación de una cepa de *Mycobacterium*, la granulación por centrifugación y la recuperación del lisado para la inmunización. El lisado podría enriquecerse adicionalmente para los componentes de SAP mediante, por ejemplo, cromatografía de inmunoafinidad. Esto es más útil donde la cepa no es recombinante para un componente de SAP, es decir, donde la cepa no es de otro modo un expresor en exceso de, o enriquecido para, un componente de SAP. Donde la cepa es una cepa recombinante que tiene altos niveles de expresión de un componente SAP, puede no ser necesaria una etapa de enriquecimiento cromatográfico.

30 Los extractos celulares pueden ser particularmente útiles como reactivo in vitro para evaluar la eficacia de un protocolo de inmunización.

D.3 Células recombinantes o transformadas

En la descripción, la respuesta inmune se forma proporcionando un componente del SAP en forma de una célula que incluye una proteína SAP aislada o recombinante en el individuo.

35 Se prefiere particularmente que la célula sea un *Mycobacterium*, y en particular una cepa de *M. tuberculosis*, especialmente una cepa de *M. tuberculosis* atenuada capaz de formar una vacuna viva atenuada. Una "vacuna viva atenuada" como se usa aquí es una vacuna que contiene microorganismos vivos o viables con virulencia reducida (atenuada); a diferencia de una vacuna inactivada.

40 Otros tipos de micobacterias incluyen miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (identificador taxonómico 77643 en la base de datos taxonómicos UniProt o NCBI), que incluye la especie *M. Tuberculosis* (la principal causa de tuberculosis humana), *M. bovis*, *M. Bovis* BCG (la cepa más utilizada para fines de vacunación), *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. pinnipedii*.

45 Preferiblemente, la célula es una cepa BCG. Las personas experimentadas en la técnica reconocerán que existen varias cepas de BCG adecuadas que son adecuadas para su uso en la práctica, que incluyen, pero no se limitan a, las designadas el Número ATCC®:

27289 *Mycobacterium bovis* BCG, Chicago 1 [B ; BCGT ; tice]

27291 *M. bovis*

35731 *M. bovis* TMC 1002 [BCG Birkhaug]

35732 *M. bovis* TMC 1009 [BCG Sueca]

50 35735 *M. bovis* TMC 1012 [BCG Montreal; CIP 105920]

35736 *M. bovis* TMC 1013 [BCG Brasileira]

35737 *M. bovis* TMC 1019 [BCG Japonesa]

- 35738 *M. bovis* TMC 1020 [BCG Mejicana]
- 35739 *M. bovis* TMC 1021 [BCG Australiana]
- 35741 *M. bovis* [BCG Glaxo]
- 35742 *M. bovis* TMC 1025 [BCG Praga]
- 5 35744 TMC 1029 [BCG Phipps]
- 35745 *M. bovis* TMC 1030 [BCG Connaught]
- 35746 *M. bovis* TMC 1101 [BCG Montreal, SM-R]
- 35747 *M. bovis* TMC 1103 [BCG Montreal, INH-R ; CIP 105919]
- 35748 *M. bovis* TMC 1108 [BCG Pasteur SM-R]
- 10 27290 *M. bovis* [BCG Copenhagen H]
- 19274 *M. bovis* depositada como *zrculosis* subespecies *bovis* 50 [BCG]
- 19015 *Mycobacterium* sp. d< i como *M. bovis* Karlson y Lessel BCG
- 35733 *M. bovis* TMC 1010 [BCG Danesa, SSI 1331] y
- 35734 *M. bovis* TMC 1011 [BCG Pasteur], etc.
- 15 Se entenderá que las micobacterias recombinantes no necesitan confinarse a cepas de BCG. Los expertos en la materia reconocerán que también se pueden emplear otras cepas de *Mycobacterium*, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a: cepa CDC 1551 de *M. tuberculosis* (véase, por ejemplo, Griffith et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Aug; 152(2):808; 1995), cepa de *M. tuberculosis* Beijing (van Soolingen et al., *J Chn Microbiol.* Dec:33(12):3234-8, 1995) cepa H37Rv (ATCC#:25618), cepa de *M. Tuberculosis* pantotenato auxotrofica (Sambandamurthy et al., supra; cepa mutante de *M. tuberculosis* rpo V (Collins et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 92(17):8036; 1995), cepa de *M. tuberculosis* leucina auxotrofo (Hondalus et al., *Infect. Immun.* 68(5):2888; 2000), etc., u otras cepas atenuadas y/o recombinantes derivadas de *M. tuberculosis*. Otras bacterias candidatas incluyen otros miembros del complejo *M. tuberculosis*, otras micobacterias (por ejemplo, complejo de bacteria *M. africanum* o *M. avium*) u otras especies de micobacterias.
- 20
- 25 El componente de SAP puede estar sobreexpresado, es decir, la proteína puede expresarse a un nivel que excede el de un organismo de control adecuado, tal como el mismo *mycobacterium* que no ha sido genéticamente modificado para sobreexpresar el componente de SAP. Las personas experimentadas en la técnica están familiarizadas con las mediciones comparativas de la actividad de proteínas y con el uso de estándares y controles adecuados para tales mediciones.
- 30 La sobreexpresión del componente SAP puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. En general, el método implicará unir secuencias de ácidos nucleicos que codifican el componente SAP a un promotor particular u otro elemento regulador que se activa cuando la cepa se introduce en una célula, especialmente una APC. Las personas experimentadas en la técnica reconocerán que muchas de tales secuencias de control de la expresión son conocidas y serían adecuadas para su uso. Por ejemplo, si se desea la expresión constitutiva del componente de SAP, las secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores y secuencias asociadas) incluyen, pero no se limitan a: promotor óptimo de micobacteria (mop, George et al., 1995); promotor blaF (Timm et al., 1994); promotores hsp60, ace o msp12; etc., con o sin un sitio de enlace ribosómico optimizado.
- 35
- 40 Alternativamente, la sobreexpresión de SAP puede no ser constitutiva, sino que puede ser inducible, en respuesta a una señal ambiental. Por ejemplo, la expresión de la proteína puede ser dirigida por un promotor que se induce en una ubicación particular o en respuesta a un estímulo ambiental, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a: promotor inducible de macrófagos (que dirige la expresión de genes que son específicamente sobreexpresados dentro del fagosoma de macrófago, ver Schannapinger et al., *JEM* 2003); promotor de acetamidas (Mahenthiralingam et al., *J. Gen. Microbiol.* 1993), e inducible por tetraciclina (Blokpoel et al., *Nucl. Acids Res.* 33(2):e22, 2005), etc.
- 45 Además, pueden utilizarse promotores de otras especies, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a: diversos promotores virales, por lo que después de estrategias "similares a la terapia génica" (por ejemplo, coinoculación de micobacterias y un virus manipulado), los antígenos de *Mtb* son expresado en tejidos seleccionados infectados por el virus coadministrado; etc.
- Como una alternativa adicional, los promotores de SAP nativos o de origen natural pueden alterarse por mutación para causar la sobreexpresión del componente de SAP.

Las personas experimentadas en la técnica reconocerán que hay varias vías disponibles para introducir secuencias de ácidos nucleicos que codifican el componente de SAP, en enlace operable con una o más secuencias de control de la expresión, en un hospedador micobacteriano donde se producirá una sobreexpresión. Por ejemplo, las secuencias se pueden incluir en un vector que se introduce posteriormente en el mycobacterium. Se conocen muchos
 5 vectores adecuados para contener y expresar genes, e incluyen, pero no se limitan a diversos elementos extracromosómicos tales como plásmidos, por ejemplo, aquellos que comprenden el origen de replicación pAL500, modificado para aumentar su número de copia; u otros plásmidos con orígenes de replicación que están o serán desarrollados; o elementos extracromosómicos que no se replican ni se integran en el genoma micobacteriano, sino que proporcionan una fuente suicida para que se produzca la recombinación homóloga; etc. La introducción de dicho
 10 vector en una micobacteria se puede llevar a cabo mediante cualquiera de varios métodos conocidos adecuados para ese vector particular, que incluyen, pero no se limitan a, electroporación y transducción mediada por micobacteriófagos para la recombinación homóloga. En una realización preferida, el vector es un plásmido y el método que se usa es la electroporación.

El componente SAP puede estar sobreexpresado en el cromosoma M. tuberculosis. Las personas experimentadas en la materia reconocerán que existen diversas estrategias de biología molecular para generar un mycobacterium con esta propiedad. Por ejemplo, pueden introducirse diversas mutaciones en el cromosoma (aleatoriamente o de forma dirigida) que dan como resultado una producción excesiva del componente SAP por parte de la bacteria. Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico que incluyen una o más secuencias de control de expresión operativamente unidas a secuencias de ácido nucleico que codifican el componente de SAP pueden introducirse en el cromosoma bacteriano, por ejemplo, mediante transducción con un plásmido suicida con o sin un medio para la
 15 contraselección, para proporcionar secuencias para la recombinación homóloga.

En una realización particularmente preferida de la invención, se proporciona un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4. Se divulga adicionalmente un vector de expresión que incluye:

- 25 - un ácido nucleico que codifica un antígeno de Mycobacterium para proporcionar una respuesta inmune específica de antígeno a la infección por Mycobacterium;
- un promotor operativamente unido al ácido nucleico para la expresión del ácido nucleico cuando la cepa se introduce en un APC, teniendo dicho promotor una secuencia de un promotor de Mycobacterium que causa la expresión inmediata y sostenida de un antígeno de Mycobacterium cuando dicho promotor se introduce en un APC.

En las realizaciones descritas anteriormente, el promotor HspX de Mycobacterium es el promotor para usar como un promotor que tiene la secuencia de un promotor de Mycobacterium que causa la expresión de una chaperona independiente de Mycobacterium ATP. Específicamente, como se ejemplifica en el Ejemplo 2 aquí, este promotor es capaz de inducir una expresión alta y sostenida de un componente de SAP en una cepa de BCG. Otros ejemplos de promotores útiles en la invención incluyen Rv0962c, Rv0971c, Rv0983, Rv0986, Rv2428, Rv1130, Rv2626c como se describe en Fontan et al. 2008 Infect. & Immun. 76:pp 717.

La formulación de vacunas bajo este subtítulo implica estudios para determinar la viabilidad bacteriana máxima y la estabilidad durante todo el proceso de fabricación. Esto incluye la determinación de la viabilidad máxima del organismo (vivo a muerto) durante el cultivo utilizando una variedad de medio comúnmente usado para el cultivo de micobacterias para incluir la adición de glicerol, azúcares, aminoácidos y detergentes o sales. Después de que las células de cultivo se cosechan por centrifugación o filtración de flujo tangencial y se resuspenden en un medio estabilizador que permite
 35 la protección de las células durante el proceso de congelación o liofilización. Los agentes estabilizantes comúnmente usados incluyen glutamato de sodio, aminoácidos o derivados de aminoácidos, glicerol, azúcares o sales comúnmente usadas. La formulación final proporcionará suficientes organismos viables para ser administrados por inyección intradérmica, inyección percutánea, perfusión o administración oral con suficiente estabilidad para mantener una vida útil adecuada para su distribución y uso.

Antes de la administración a humanos como una vacuna, las cepas de BCG descritas bajo este subtítulo se prueban de acuerdo con métodos que son bien conocidos por las personas experimentadas en la técnica. Por ejemplo, las pruebas de toxicidad, virulencia, seguridad, etc. se llevan a cabo en modelos animales adecuados, por ejemplo, en ratones, cobayos, etc., algunos de los cuales están inmunocomprometidos. La capacidad de las preparaciones de vacuna para provocar una respuesta inmune también se prueba típicamente en modelos animales adecuados, por ejemplo, ratones, cobayos, etc. Además, los estudios de protección que implican vacunación, refuerzo y exposición posterior con Mtb vivo pueden llevarse a cabo usando modelos animales adecuados tales como ratones, cobayos y primates no humanos. Finalmente, las personas experimentadas en la técnica están familiarizadas con las disposiciones para llevar a cabo pruebas clínicas en humanos que consienten, con el fin de probar la eficacia de las preparaciones de vacunas. Para detalles, ver, por ejemplo, la solicitud de patente de los Estados Unidos 20060121054 (Sun et al.) Publicada el 8 de junio de 2006, y las referencias citadas aquí.

D.4 vacunas de ácido nucleico

En la divulgación, la respuesta inmune se forma proporcionando un componente del SAP en forma de o un ácido nucleico que codifica una proteína SAP en el individuo.

En particular, como se ejemplifica en el Ejemplo 1, los inventores han demostrado que puede proporcionarse inmunidad protectora administrando una vacuna de ADN que contiene un gen que codifica CysD en ratones expuestos a *M. tuberculosis*.

5 El ácido nucleico puede proporcionarse en forma linealizada o circular para inyección. Generalmente, el ácido nucleico tendrá un promotor que permita la expresión del componente SAP en la célula relevante. Por ejemplo, donde la administración es para tejido muscular, el vector contendrá un promotor capaz de activarse mediante factores de transcripción y potenciadores del músculo. En estas realizaciones, generalmente se entiende que la célula muscular producirá el componente SAP relevante que luego será fagocitado por una APC tal como una célula dendrítica para su presentación a una célula T, sobre la cual se establece la inmunidad.

10 D.5 vectores de viales

En la divulgación, la respuesta inmune se forma proporcionando un componente del SAP en forma de un vector viral que contiene un ácido nucleico que codifica el componente, o que expresa un componente del SAP.

Ejemplos de vectores adecuados incluyen los que tienen base en un genoma de vaccinia y los que tienen base en un genoma de adenovirus.

15 Algunas de las composiciones descritas bajo los subtítulos anteriores se pueden formular como soluciones líquidas o suspensiones, sin embargo, también se contemplan formas sólidas tales como tabletas, píldoras, polvos y similares. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en o suspensión en líquidos antes de la administración. La preparación también puede ser emulsionada. Los ingredientes activos se pueden mezclar con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con los ingredientes activos. Los excipientes
20 adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares, o combinaciones de los mismos. Además, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH y similares. Si se desea administrar una forma oral de la composición, se pueden añadir diversos espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglomerantes y similares. La composición de la presente invención puede contener cualquiera de tales
25 ingredientes adicionales para proporcionar la composición en una forma adecuada para la administración.

Ejemplos

Ejemplo 1

M. tuberculosis puede sobrevivir en un amplio espectro de ambientes, incluyendo altos niveles de estrés oxidativo, bajo pH y privación de nutrientes ((Nathan, 2000 #29). La exposición y la adaptación de *M. tuberculosis* a estas
30 condiciones durante la infección requiere la regulación coordinada de expresión génica ((Timm, 2003 #93). Los genes implicados en el metabolismo del azufre se han identificado consistentemente como sobrerregulados en condiciones que imitan el entorno de los macrófagos ((Pinto, 2004 #14 ;, #35; Muttucumaru, 2004 #34; Manganelli, 2002 #75; Hampshire, 2004 #33; Betts, 2002 #49) y durante la infección de macrófagos ((Schnappinger, 2003 #31). Estos genes codifican enzimas de la vía de asimilación de sulfato (SAP) de *M. tuberculosis*, requerida para la reducción de azufre.
35 De hecho, los compuestos que contienen azufre son fundamentales en una amplia gama de actividades biológicas. En su forma reducida, el azufre se utiliza en la biosíntesis del aminoácido cisteína, uno de los objetivos principales para los intermedios reactivos de nitrógeno encontrado por *M. tuberculosis* en el entorno intracelular ((Rhee, 2005 #92). La cisteína puede incorporarse posteriormente en el micotiol, que funciona de manera análoga al glutatión (Fan, 2009, #197) y es crucial para *M. tuberculosis* dentro del granuloma al regular el equilibrio redox al encontrar radicales
40 libres liberados por las células hospedadoras. Mutantes de *Mycobacterium smegmatis* en los que la biosíntesis de micotiol ha sido abrogada exhibe resistencia de alto nivel a isoniazida y son más susceptibles que las cepas de tipo salvaje al estrés oxidativo y antibióticos ((Rawat, 2002 #82; Buchmeier, 2003 #85). Esta primera línea de defensa por *M. tuberculosis* por lo tanto, está relacionada con la disponibilidad de cisteína y, como tal, se ha demostrado que es necesaria para la supervivencia del organismo ((Safeen, 2003, #84; Buchmeier, 2006, #83; Newton, 2002, #81).
45 Reforzar esta mayor necesidad de cisteína en el entorno de macrófagos, es la sobrerregulación de ATP sulfurilasa, la primera enzima en el SAP, después de la exposición al estrés oxidativo ((Pinto, 2004 #14,; #35; Schnappinger, 2003 #31). Deshabilitar la biosíntesis de la cisteína atenúa la virulencia bacteriana y la persistencia durante la fase crónica de la infección en ratones ((Senaratne, 2006 #3).

Aunque los miembros del SAP parecen estar altamente expresados bajo condiciones presumiblemente encontradas dentro del huésped, no se sabe si estas proteínas constituyen componentes inmunogénicos de *M. tuberculosis*. El mayor interés se ha centrado en las proteínas secretadas de micobacterias, ya que se prevé que sean reconocidas mediante respuestas inmunes tempranas del huésped ((Andersen, 1992 #202; Roberts, 1995 #203). La reducción del sulfato tiene lugar dentro de la célula y por esta razón las enzimas SAP son componentes intracelulares o enlazados a la membrana ((de Souza, 2011 #206; Bhave, 2007 #205; Schelle, 2006 #204) y no sería detectado en
55 las pantallas de antígenos inmunogénicos secretados de *M. tuberculosis* ((Andersen, 1992 #202). En este informe demostramos que los miembros del SAP son componentes altamente inmunogénicos de *M. tuberculosis*, siendo reconocida por personas infectadas con *M. tuberculosis* y que confiere inmunidad protectora en un modelo murino de

TB. Nuestros resultados sugieren que los miembros de SAP son candidatos potenciales para la inclusión en nuevas vacunas contra TB.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

- 5 Escherichia coli K-12 y BL21 (DE3) se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) o agar (Sigma-Aldrich). M. tuberculosis H37Rv o cepa T103 (Jackson, 1999 #208) se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories) suplementado con glicerol al 0,5%, Tween 80 al 0,05%, y albúmina-dextrosa-catalasa al 10% (ADC) o en medio sólido Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories) suplementado con ácido oleico-ADC. Todos los cultivos se cultivaron a 37 °C con o sin agitación. Se añadieron antibióticos a los medios cuando se requirió a 25 µg/ml para kanamicina y 100 µg/ml para ampicilina. Se logró la persistencia de norreplicación de M. tuberculosis cultivada in vitro mediante la adición de 50 µM diarios del compuesto donante de óxido nítrico 2,2'-(Hidroxinitrosohidrazono)bis-etanimina (DETA-NO) (Sigma) usando el método de ((Bryk, 2008 #36). Se determinaron en el día 0, 1, 3 y 7 recuentos bacterianos para estos cultivos y en el día 7, se extrajo ARN de ambos cultivos para el análisis de PCR en tiempo real (RT).

Antígenos proteicos y vacunas de ADN

- 15 La proteína de filtrado de cultivo (CFP) se obtuvo de NIH Repositorio de Recursos de Investigación de Biodefensa e Infecciones Emergentes (NR-14825). La concavalina A (ConA) se adquirió de Sigma-Aldrich. La purificación de antígenos de proteína del SAP y la construcción de vectores de ADN que codifican genes SAP se describen en la tabla complementaria 1.

Inyección de macrófagos y PCR en tiempo real

- 20 La línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 se cultivó en RPMI (Gibco-BRL) suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS; Gibco-BRL) y L-glutamina 2 mM (Invitrogen) (RPMI completo), a 37 °C en CO₂ al 5%. Las células RAW264.7 adheridas se infectaron con M. tuberculosis a una multiplicidad de infección de 1:1. Cuatro horas después de la infección, las monocapas de macrófagos se lavaron con solución salina regulada con fosfato (PBS), las células se incubaron durante 48 horas adicionales en medio nuevo y se extrajo el ARN total para el análisis de PCR RT.

- 25 Las pellas de M. tuberculosis de cultivo en caldo o macrófagos infectados con M. tuberculosis se resuspendieron en reactivo TRI (Invitrogen) y se rompieron con perlas de zirconia/sílice de 0,1 mm en un Impactador de Perlas de productos BioSpec. Se extrajo el ARN, se trató con TURBO DNasa (Ambion) y se resuspendió en agua tratada con DPEC (Invitrogen) como se describió previamente ((Muttucumar, 2004 #34). Se sintetizó ADNc a partir de 1 µg de ARN total utilizando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen). Se realizó RT-PCR cuantitativo utilizando 4 µL de ADNc, mezcla maestra de PCR SYBR verde I (Qiagen) y 5 µM de un primer par de cebadores específicos de gen (tabla 1 suplementaria) en un volumen de reacción de 25 µL. Las reacciones de PCR se ejecutaron en un detector de secuencia de la serie Rotogene 6000 (Corbett research) en triplicado por par de cebadores. Los niveles de expresión relativos se determinaron usando el método de ciclo umbral comparativo de Livak y Schmittgen ((Livak, 2001 #99) usando el ARNr no inducido de M. Tuberculosis m16S (codificado por rrs) como el control ((Banaiee, 2006 #101).

Estudios humanos

- Objetivos: 15 pacientes infectados por M. tuberculosis, VIH negativos, fueron reclutados en la clínica de TB en el Hospital Royal Prince Alfred, Missenden Rd, NSW, Australia. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron a partir de biopsias o cultivos de pacientes de diversas edades y sexo que habían iniciado o no un tratamiento antituberculoso. La aprobación ética para este estudio fue dada por el Servicio de Salud del Area Sur Occidental de Sydney (número de protocolo: X06-0248). Los pacientes se compararon con 11 individuos sanos con prueba cutánea de tuberculina negativa (TST-ve).

- 45 Ensayo de proliferación de células T: se aislaron PBMCs de sangre completa en un gradiente de Ficoll (Histopaque-1077, Sigma Aldrich). 2,5 x10⁵ células/pozo de PBMCs se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5% durante 5 días en la presencia de 10 µg/ml de proteínas SAP, 10 µg/ml de CFP, Ag-85B o 3 µg/ml de ConA. La proliferación de células T se ensayó por incorporación de ³H-timidina (MP Biomedicals, 1 µCi/pozo) el día 5 usando espectroscopía de centelleo líquido (Microbeta Luminescence Counter, Wallace). El índice de estimulación de linfocitos (SI) se calculó usando la siguiente fórmula: conteos promedio por minuto (cpm) en la presencia de antígeno/cpm promedio en la ausencia de antígeno. Un SI de más de o igual a 3 se consideró una respuesta positiva al antígeno. Estudios murinos

- 50 Ratones hembras C57BL/6 de seis a ocho semanas de edad se obtuvieron de Animal Resources Centre (Perth, Australia) y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos. Para la determinación de la inmunogenicidad, se infectaron ratones (4/grupo) por ruta intranasal (i.n) con 5 x 10⁴ unidades formadoras de colonias (CFU) de M. tuberculosis Mt103. Tres y 8 semanas después de la infección se prepararon suspensiones de células individuales a partir del ganglio linfático mediastínico (MLN) de ratones inmunizados en medio RPMI completo y el número de células productoras de interferón (IFN)-γ se determinó mediante ELISpot como se describió previamente (Palendira, 2002 #210) utilizando enzimas SAP, CFP y Ag85B a una concentración de 10 µg/ml con ConA utilizado a

3 µg/ml. Para el análisis de eficacia protectora, se inmunizaron ratones (5/grupo) por vía subcutánea (s.c) una vez con 5×10^5 CFU de M. bovis BCG, o 3 veces a intervalos de 2 semanas con 10 µg de proteína CysDNC coadministrada con dimetil dioctadecil bromuro de amonio (DDA) (1,25 mg/ml) y monofosforil lípido A (MPL) (125 µg/ml) o intramuscularmente (i.m) con 100 µg de vacuna de ADN por inyección. Ocho semanas después de la vacunación final, los ratones fueron expuestos a M. tuberculosis Mt103 en aerosol utilizando un aparato de exposición por inhalación (Glas-Col) con una dosis infecciosa de 100 bacilos viables por pulmón. La carga bacteriana se determinó 4 semanas después de la prueba sembrando en placa homogeneizados de pulmón y bazo.

Análisis estadístico

Para la evaluación de la eficacia protectora, la significancia de las diferencias se evaluó mediante ANOVA de una vía con una comparación por pares de conjuntos de datos agrupados mediante la prueba post hoc de Bonferroni. Para la evaluación de la inducción de respuestas inmunes del huésped por enzimas SAP de ratones infectados o individuos infectados con M. tuberculosis en comparación con ratones no infectados o individuos TST-ve respectivamente, se usó la prueba U de Mann-Whitney (* P<0,05).

Resultados

Inducción de ARNm sulfúrilasa de M. tuberculosis ATP en el entorno intracelular se correlaciona con la potente inmunidad específica de antígeno.

El complejo activador de sulfato (SAC) de M. tuberculosis es el primer paso en el SAP (figura 1 complementaria) y constituye 3 actividades catalíticas, ATP sulfúrilasa, GTPasa y actividad de APS quinasa codificada por el operón CysDNC (figura 1A). La capacidad del SAC de M. tuberculosis para sobreregular positivamente su expresión en condiciones de cultivo que imitan el estrés intracelular ((Pinto, 2004 #14), sugiere que su expresión también puede ser inducida en el entorno intracelular. Para probar esto, examinamos los cambios en los niveles de ARNm de CysDNC dentro de células RAW264,7 durante la infección por M. tuberculosis. Encontramos que la expresión de CysDNC se mejoró significativamente, mostrando un aumento de aproximadamente 4,4 veces sobre el nivel encontrado en bacilos cultivados en caldo durante las primeras 48 horas (Figura 1B). También determinamos si la expresión de CysDNC se indujo en bacterias no replicantes para imitar las condiciones encontradas durante la infección latente. Usando el donante de óxido nítrico DETA-NO ((Bryk, 2008 #156) pudimos inhibir la replicación de M. tuberculosis in vitro en comparación con las bacterias no tratadas (Figura 1C). M. tuberculosis CysDNC fue altamente sobreregularado bajo condiciones de persistencia no replicante y demostró un aumento de 35 veces en la expresión de genes en comparación con micobacterias en crecimiento activo (Figura 1D). Esto implica que CysDNC puede estar involucrado en la capacidad de M. tuberculosis para adaptarse a la variedad de tensiones encontradas en el entorno intracelular y la progresión al estado latente.

Como CysDNC se indujo a altos niveles dentro del entorno intracelular y en bacterias no replicantes, se formuló la hipótesis de que la enzima puede ser reconocida por la respuesta inmune durante la infección por M. tuberculosis. Para probar esto, intranasalmente infectamos ratones con M. tuberculosis y examinamos la frecuencia de células secretoras de IFN-γ en los ganglios linfáticos de los mediastinales (MLN). Tres semanas después de la infección, la estimulación de células MLN con CysDNC ex vivo dio como resultado una fuerte inducción de células T secretoras de IFN-γ, que era similar a los niveles inducidos por la proteína inmuno-dominante Ag85B secretada de M. tuberculosis (figura 2A). Esta fuerte respuesta de células T se mantuvo hasta ocho semanas después de la infección (figura 2B). Se observaron patrones similares de respuestas celulares secretoras de IFN-γ específicas de antígeno en respuesta a CysDNC y Ag85B en el pulmón (datos no mostrados). Además, los ensayos de proliferación de linfocitos de PBMC humanas revelaron que CysDNC se reconoció durante la infección por M. tuberculosis humana (figura 2C). Las respuestas de CysDNC fueron similares a las de la evocación de Ag85B, pero menores que las inducidas por CFP. Sin embargo, CysDNC indujo significativamente la proliferación de PBMCs de pacientes con TB en comparación con los individuos TST-ve (Figura 2C). Estos resultados indican que M. tuberculosis CysDNC, que codifica ATP sulfúrilasa es un potente antígeno inmunoestimulador de M. tuberculosis.

Inmunidad protectora contra la exposición de M. tuberculosis virulento después de la vacunación con ADN que codifica ATP sulfúrilasa.

La expresión mejorada de los genes que codifican ATP sulfúrilasa en el entorno intracelular (Figura 1B), en nuestro modelo de persistencia no replicante (Figura 1C) y la capacidad de este complejo de proteína para inducir una respuesta ex vivo de citocina tipo Th1 específica de antígeno (Figura 2) pueden convertir a los productos codificados en objetivos efectivos para la inmunidad protectora antimicobacteriana. Para determinar esto, se inmunizaron los ratones con vectores de ADN que expresan cysD y/o cysNC y se expusieron a un aerosol con M. tuberculosis. La inmunización con todos los vectores que expresan cysD o cysNC dio como resultado una carga bacteriana significativamente reducida en comparación con los ratones vacunados con el vector control, tanto en el pulmón (Figura 3A) como en el bazo (Figura 3B) (p <0,01). En todos los experimentos, hubo una tendencia creciente a que ADN-cysD proporcionara una mejor eficacia protectora que ADN-cysNC en el pulmón, mientras que el uso de una combinación de ADN-cysD y ADN-cysNC igualaba la protección observada con ADN-cysD solo. La eficacia protectora fue significativamente mayor en el bazo cuando los ratones se inmunizaron con una combinación de estos dos

plásmidos, y esta protección se acercó al nivel alcanzado con BCG (Figura 3B). Por lo tanto, la ATP sulfurilasa es un componente altamente protector de *M. tuberculosis*.

Las enzimas corriente abajo de la Vía de Asimilación de Sulfato de *M. tuberculosis* (SAP) son componentes inmunogénicos de *M. tuberculosis*.

5 Los resultados prometedores obtenidos con *M. tuberculosis* ATP sulfurilasa (CysDNC) nos llevaron a cuestionar si otros miembros del SAP son objetivos de la respuesta inmune del huésped. Encontramos que todas las proteínas SAP evaluadas se sobreexpresaban significativamente en el ambiente intracelular, el ARNm de CysK1 mostraba la inducción más alta de aproximadamente 6,7 veces (figura 4A). El nivel de inducción fue similar para SirA y CysH, mientras que CysK1 y CysE también mostraron niveles similares de sobreexpresación intracelular. Esto está de acuerdo con el hecho de que SirA y CysH están localizados dentro del mismo operón en el genoma de *M. tuberculosis* ((Cole, 1998 #225) mientras que CysK1 y CysE están adyacentes en el genoma ((Cole, 1998 #225; Schnell, 2007 #87). También determinamos que estas proteínas son reconocidas en ratones infectados con *M. tuberculosis*, ya que todas las proteínas indujeron células T secretoras de IFN- γ a las 8 semanas después de la infección (Figura 4B). Al igual que CysDNC (Figura 2C), ensayos de proliferación de linfocitos en PBMCs humanos revelaron que todas las enzimas SAP estudiadas se reconocieron durante la infección por *M. tuberculosis* humana (figura 4C).

20 Como la expresión de todas las enzimas SAP se sobreexpresaba in vivo y las proteínas se reconocían en ratones y humanos, se evaluó si podían mejorar la eficacia protectora proporcionada por ADN-CysDNC. Cuando los ratones fueron vacunados con ADN-CysDNC junto con ADN que codifica cysH, sirA, cysK1 y cysE, no observamos aumentos en la eficacia protectora en comparación con solo ADN-CysDNC, tanto en el pulmón (Figura 5A) como en el bazo (Figura 5B). Por lo tanto, si bien todos los miembros de SAP fueron reconocidos por la respuesta inmune en humanos y ratones infectados con *M. Tuberculosis*, CysDNC solo proporcionó la máxima eficacia protectora en el modelo de ratón utilizado aquí.

El refuerzo de ratones vacunados con BCG con ATP sulfurilasa mejora la protección proporcionada por BCG en el pulmón frente a la exposición con *M. tuberculosis*.

25 Teniendo en cuenta el fuerte reconocimiento de C ATP sulfurilasa por parte de los pacientes con TB y su efecto protector en ratones, determinamos si este complejo proteico puede ser un candidato adecuado para reforzar el efecto protector de BCG sobre la exposición a *M. tuberculosis*. Después de una dosis baja, la administración por aerosol de *M. tuberculosis*, ratones bloqueados genéticamente demostraron un crecimiento bacteriano sustancial en los pulmones y se detectó diseminación a los bazo (Figuras 6A y 6B). Por el contrario, la inmunización con BCG solamente, dio como resultado una protección significativa contra la exposición a *M. tuberculosis* con una reducción aproximada de $1,5\text{-log}_{10}$ en la carga de *M. tuberculosis* en el pulmón y el bazo (Figuras 6A, 6B). El refuerzo con proteína CysDNC condujo a una reducción significativa adicional en comparación con la vacunación con BCG solamente, de $0,5\text{ log}_{10}$ *M. tuberculosis* en el pulmón (Figura 6A). Mientras que la carga bacteriana se redujo en el bazo con el refuerzo, esta diferencia no alcanzó significación (Figura 6B). Por lo tanto, CysDNC es capaz de mejorar el efecto protector de la BCG contra la infección por *M. tuberculosis*, que fue más evidente en el pulmón.

Discusión

La identificación de nuevos objetivos de inmunidad del huésped ayudaría notablemente a los esfuerzos para desarrollar vacunas más efectivas contra la tuberculosis. En este informe identificamos el complejo de activación de sulfato (SAC) de *M. tuberculosis* como un componente antigénico principal del bacilo. El SAC es un complejo enzimático con 3 actividades catalíticas ((Pinto, 2004 #14; Sun, 2005 #13). Se predice que este complejo desempeñará un papel en la adaptación de *M. tuberculosis* al entorno de la célula huésped, debido a la sobreexpresión de CysDNC dentro de los macrófagos (Figura 1B) ((Schnappinger, 2003 #31), y en respuesta a varias condiciones de estrés in vitro incluyendo ayuno de nutrientes y estrés oxidativo ((Hatzios, 2011 #167; Pinto, 2004 #14). Por lo tanto es posible que el fuerte reconocimiento de CysDNC por parte de los pacientes con TB (Figura 2C) y ratones infectados por *M. tuberculosis* (Figuras 2A y B) pueda deberse a la expresión mejorada de CysDNC dentro del huésped. Curiosamente, CysDNC también mostró una sobreexpresión significativa en un modelo de crecimiento no replicativo de *M. tuberculosis* (Figura 1D). Este resultado implica que la expresión de CysDNC puede requerirse para la adaptación de *M. tuberculosis* al estado latente durante la infección crónica. Esto es respaldado por el papel de compuestos de azufre reducido en la aparición de infección crónica por *M. tuberculosis* ((Senaratne, 2006 #3) y corresponde al reconocimiento sostenido de CysDNC por células T en etapas tardías de infección por *M. tuberculosis* en ratones (figura 2B). Esto implica además que *M. tuberculosis* CysDNC puede contribuir a la supervivencia del organismo en un estado de persistencia no replicante al mantener rutas metabólicas que utilizan cisteína. La cisteína se incorpora en Acetil CoA, el bloque de construcción para los lípidos en la pared celular del organismo y un sustrato para la derivación de glioxilato, una vía requerida para que *M. tuberculosis* persista en macrófagos y en ratones ((McKinney, 2000 #211). Además, CysDNC está sobreexpresado durante la latencia baja en oxígeno ((Voskuil, 2004 #35) y desempeña un papel en la supresión de la apoptosis por los macrófagos ((Danelishvili, 2010 #116), implicando un papel para CysDNC en la evasión de la respuesta inmune del huésped. Curiosamente, se descubrió que cysD estaba sobreexpresada después de la exposición a fármacos anti TB que son bactericidas a bacterias no replicantes ((Fu, 2009, #117; Heifets, 2005, #120; Tasneen, 2008, #121).

El reconocimiento mejorado de los antígenos micobacterianos por la respuesta inmune del huésped no siempre correlaciona la protección contra la exposición con *M. tuberculosis* virulenta en modelos animales ((Gartner, 2007 #215; Kamath, 1999 #143; Skinner, 2003 #115). Nosotros por lo tanto, evaluamos si CysDNC fue protector en nuestro modelo murino de baja dosis de infección por aerosol de *M. tuberculosis*. Cuando se administraron como vacunas de ADN, CysD y CysNC fueron protectores como componentes individuales tanto en el pulmón como en el bazo, y una combinación de las dos estructuras logró un nivel de protección similar a la inducida por BCG (Figura 3). Por lo tanto, la fuerte expresión de genes que codifican CysDNC se correlaciona con el efecto protector del complejo antigénico en los modelos utilizados aquí. Sin embargo, la adición de vacunas de ADN que codifican otros componentes del SAP no mejoró el efecto protector de CysDNC, a pesar del hecho de que las proteínas fueron reconocidas por PBMCs de pacientes con TB, se sobreexpresaron dentro de los macrófagos e indujeron fuertes respuestas de IFN- γ de las células T de ratones infectados con *M. tuberculosis* (Figura 4). No está claro por qué CysDNC parece ser un miembro dominante del SAP en términos de eficacia protectora, pero puede estar relacionado con respuestas restringidas al MHC en base a la cepa de ratón utilizada en este estudio. También es interesante observar que los antígenos de SAP se proponen como proteínas intracelulares o asociadas a la membrana debido a su función en el metabolismo del azufre (de Souza, 2011, #206), y hemos confirmado esto para algunos de los miembros por inmunoprecipitación Western (no se muestra). Sin embargo, todos los antígenos de *M. tuberculosis* en ensayos clínicos son proteínas secretadas, ya que se predice que son los objetivos iniciales de la inmunidad del huésped ((Kaufmann, 2011 #196). Este estudio sugiere que las proteínas no secretadas pueden además ser componentes adecuados de nuevas formulaciones de vacunas contra TB. Además, la reciente identificación de los antígenos asociados a latencia inducidos por estrés que mejoran la protección en las últimas etapas después de la infección por *M. tuberculosis* ((Aagaard, 2011 #213) justifica pruebas adicionales de CysDNC en modelos similares, considerando la marcada inducción del complejo proteico en bacterias no replicantes y en respuesta a estrés *in vitro*.

Una propiedad importante de las vacunas de subunidades potenciales es la capacidad de "reforzar" la protección con la inmunización previa con BCG, ya que este es el papel propuesto para tales vacunas en los nuevos calendarios de vacunación contra la TB (Kaufmann, 2011 #196). Un puñado de proteínas ha demostrado una capacidad para reforzar la protección inducida por BCG en la infección experimental por *M. tuberculosis* ((Lu, 2011 #144; Dey, 2011 #145; Rouanet, 2009 #214). Ahora se puede añadir CysDNC a esta lista, ya que el complejo antígeno pudo aumentar significativamente el efecto protector de solo BCG en el pulmón, el sitio primario de infección en el modelo utilizado (Figura 6).

Además de definir el papel antigénico de las proteínas SAP, este estudio también ha ampliado nuestro conocimiento sobre la regulación de la expresión del gen SAP durante la infección. Todos los componentes del SAP probado mostraron una sobreexpresión dentro de la línea celular de macrófagos utilizada aquí. Esta adaptación al entorno del fagosoma es una indicación de la capacidad de la bacteria para suministrar cisteína a la célula de manera oportuna, que ha sido ampliamente revisada por Hatzios y Bertozzi ((Hatzios, 2011 #167). Puede ser que las enzimas en el SAP regulan la expresión de cada uno. Por ejemplo, se ha demostrado que la serina acetil transferasa se asocia y forma un complejo con la última enzima en la vía o-acetilserina sulfhidralasa (OASS) (Droux, 1998 #218). Mientras que esta interacción regula negativamente el OASS ((Mino, 2000 #222; Schnell, 2007 #87), similar a la ATP-sulfurilasa, su expresión y actividad pueden depender del requerimiento de cisteína ((Kredich, 1966 #219; Mino, 1999 #220; Mino, 2000 #221; Pinto, 2004 #14). Además, la *E. coli* ATP sulfurilasa forma un complejo apretado con OASS ((Wei, 2002 #96) y es este complejo el que puede activar el sulfato para producir APS (figura suplementaria 1). Se ha sugerido que, dadas las similitudes entre *E. coli* y *M. tuberculosis* ATP sulfurilasas, que el sistema micobacteriano también forma un complejo de orden superior, que une funciones catalíticas con otras enzimas en el SAP ((Sun, 2005 #13). Esto no ha sido probado formalmente, sin embargo, puede ser la razón por la cual todas las enzimas del SAP inducen respuestas inmunitarias robustas del huésped (Figura 2, Figura 4B & C). También destacando la regulación de los genes del metabolismo del azufre está su transcripción mejorada tras la exposición a diversos antibióticos que pueden influir en cómo *M. tuberculosis* responde a estos medicamentos ((Hatzios, 2011 #167). Presumiblemente los genes sensibles a los fármacos codifican proteínas que son relevantes para el modo de acción de los fármacos y muchas enzimas que metabolizan azufre son fármacos objetivo prometedoros ((Bhave, 2007 #1).

En resumen, hemos identificado componentes del SAP como proteínas inducidas por células huésped que son componentes antigénicos principales de *M. tuberculosis*.

Ejemplo 2

El nicho preferido dentro del hospedador de micobacterias virulentas y la cepa atenuada de vacuna BCG es el entorno intracelular del macrófago. Se ha observado que las micobacterias también tienen la capacidad de infectar y persistir dentro de las DCs y estimulan las respuestas de las células T *in vivo* [8,9].

Nuestra hipótesis es que la expresión dirigida de antígeno por (r) BCG recombinante dentro de las DCs puede influir en la generación posterior de inmunidad específica de antígeno. Consideramos que el promotor que controla la expresión del gen *hspX* de *M. tuberculosis* puede ser un candidato adecuado para dirigir la expresión de antígeno a las APCs después de la vacunación con BCG.

HspX, o la proteína α -cristalina, es un miembro de las proteínas de choque térmico de peso molecular pequeño que actúan como chaperones independientes de ATP [10, 11]. El promotor *hspX* se induce rápidamente a la entrada de

M. tuberculosis en macrófagos cultivados [12]. El gen también es sobreexpresado in vitro por hipoxia [12], durante la fase estacionaria del crecimiento de cultivos aireados de M. tuberculosis [11] y por la adición de donantes de NO [13], que todos pueden representar condiciones encontradas por M. tuberculosis dentro de células huésped. Es importante destacar que el gen hspX se sobreexpresa después de la infección de ratones con M. Tuberculosis virulenta [14].

5 En este informe, demostramos que el promotor hspX se puede utilizar para modular la expresión de antígenos expresados por rBCG, y la expresión del antígeno se induce rápidamente a la entrada de rBCG dentro de las DCs. El uso del promotor hspX para controlar la expresión del antígeno dio como resultado el cebado acelerado de células T específicas de antígeno y la generación in vivo sostenida de células T reactivas con antígeno después de la vacunación.

10 Materiales y métodos

Cepas bacterianas, medios y antígenos

15 M. tuberculosis H37Rv (ATC27294) y M. bovis BCG (cepa Pasteur) se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 (Difco, BD) complementado con glicerol al 0,5%, Tween-80 al 0,05% y ADC al 10% o en medio sólido Middlebrook 7H11 (Difco, BD) complementado con OADC. Cuando fue necesario, se añadió el antibiótico kanamicina (Km) a una concentración de 20 µg/ml.

Ratones

20 Se obtuvieron ratones C57BL/6 de seis a ocho semanas de edad del Animal Resources Centre (Perth, WA, Australia) y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos. El p25 CD4⁺ TCR transgénico (específico para los residuos 240-254 de Ag85B) se obtuvo del Prof. K. Takatsu (Universidad de Tokio, Japón) y del Prof. J. Ernst (Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York, NY) [15] y fueron retrocruzados en B6.SJL/Ptprca para obtener la línea p25⁺CD45.1⁺. Los experimentos con animales se realizaron con la aprobación del Comité de Ética y Cuidado Animal de la Universidad de Sydney.

Construcción de cepas de (r)BCG recombinantes

25 BCG que expresa GFP bajo el control del promotor hspX de M. tuberculosis (BCG:P_{hspX}-Y-GFP) se construyó por transformación del plásmido pMV306:GFP en BCG, que fue un regalo amable del Profesor Cliff Barry, Sección de Investigación de Tuberculosis, NIAID, Institutos Nacionales de Salud, Rockville, MD. Para desarrollar BCG en el que el promotor hspX dirige la expresión de la proteína Ag85B, el gen fbpB que codifica la proteína Ag85B se amplificó a partir del ADN genómico de M. tuberculosis y se usó para reemplazar el gen gfp en pMV306:GFP, dando como resultado el vector intermedio pJEX88. El fragmento P_{hspX}-fbpB se escindió por digestión con XbaI y HpaI y se ligó al vector disparador pMV261 [16] digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se transformó en BCG para producir BCG:P_{hspX}-85B. BCG control utilizado en este estudio fue BCG de cepa Pasteur o BCG Pasteur transformado con pMV261 [16]. La construcción de rBCG sobreexpresando la proteína M. tuberculosis Ag85B bajo el control del promotor hsp60 (BCG:P_{hsp60}-85B) se ha descrito anteriormente [17].

Infecciones de células dendríticas

35 Se prepararon DCs a partir de la médula ósea de ratones como se describe anteriormente [18]. Para la infección con DC, se incubaron cultivos de DC de 4 días con cepas de rBCG a una multiplicidad de infección de 5:1 o 1:1. Después de 4 horas, las bacterias extracelulares se eliminaron mediante lavado extensivo y a las 6 y 24 horas después de la infección, se lisaron las DCs y se recolectaron las bacterias para la citometría de flujo (LSR-II, Becton Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos.). El aumento doble en la fluorescencia se determinó dividiendo la fluorescencia de las poblaciones de bacterias a las 6 y 24 horas por el valor inicial (día 0). Para la visualización mediante microscopía confocal, se usaron condiciones de infección similares, excepto que se permitió que las DCs se adhirieran a cubreobjetos redondos de 25 mm (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) antes de la infección por rBCG y luego se observaron bajo el microscopio LP5 Confocal (Leica).

Ensayos de inmunogenicidad in vitro

45 Se infectaron cultivos de DC de cuatro días (1x10⁵ células) con cepas Rbcg en una MOI de 5:1. Las células T CD4 se purificaron a partir de ratones p25⁺CD45.1⁺ mediante separación autoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y 5x10⁵ células T purificadas cultivadas con DCs infectadas. Tres días después de la coincubación, el sobrenadante se ensayó para IFN-γ por ELISA como se describió previamente [19] y la proliferación de células T se midió por captación de [3H]-timidina.

50 Respuesta inmune in vivo

Para detectar la expresión de GFP in vivo, se inocularon ratones C57BL/6 con 1x10⁷ CFUs de cepas de rBCG fluorescentes por vía subcutánea en las almohadillas de las patas. Se obtuvo tejido del sitio inflamatorio local inmediatamente después de la infección o en los días 1, 3 o 7 después de la infección. Los tejidos se digirieron con colagenasa y ADNasa durante al menos 1 hora y luego se filtraron para recuperar las células. Las células se tiñeron

con CD45-APCCy7, Cod11b-APC y CD11c-PE-Cy7 (BD Pharmingen). Las células teñidas se analizaron usando el citómetro de flujo LSR-II (BD).

5 Para la determinación del cebado de células T después de la administración de rBCG, se prepararon células de nódulo linfático de ratones p25⁺CD45.1⁺ y se marcaron con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE, Molecular Probes, Invitrogen, Estados Unidos). Los ratones C57BL/6 recibieron 5x10⁵ células de ganglio linfático p25 marcadas con CFSE i.v. y al día siguiente se inmunizaron por vía subcutánea con 5x10⁵ CFU de cepas rBCG. A los 3 o 7 días después de la vacunación se procesaron los órganos y se analizó el perfil CFSE de las células en división.

10 Para la determinación de la inmunogenicidad de rBCG, los ratones C57BL/6 se vacunaron por vía subcutánea con 5 x 10⁵ CFUs de cepas de rBCG. A las 3 y 12 semanas después de la vacunación, se recuperaron los esplenocitos y se cultivaron 2 x 10⁵ esplenocitos con péptido p25 (3 µg/ml) a 37 °C en CO₂ al 5%. Dieciocho horas después de la coincubación, el número de células secretoras de IFN-γ se determinó mediante ELIspot como se describió anteriormente [19] y a las 72 horas después de la exposición con antígeno, la proliferación de células T se evaluó mediante absorción de [3H]-timidina.

Eficacia protectora

15 Para la evaluación de la eficacia protectora, se inmunizaron ratones C57BL/6 (5 por grupo) con 5 x 10⁵ CFU de cepas de BCG y 12 semanas después de la vacunación se expuso a los ratones a aerosol de *M. tuberculosis* H37Rv usando un aparato de infección aérea Middlebrook (Glas-Col, Terre Haute, IN, Estados Unidos) con una dosis infecciosa de aproximadamente 100 bacilos viables por pulmón. Cuatro semanas después de la exposición, se enumeró el número de bacterias en el pulmón y el bazo en agar Middlebrook 7H11 Bacto.

20 Analistas estadísticos.

La significancia de las diferencias para los ensayos lineales y transformados logarítmicamente se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) usando la prueba de comparación múltiple de Bonferroni para la comparación por pares de conjuntos de datos agrupados múltiples. Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron significativas.

Resultados

25 Inducción del promotor hspX de *M. tuberculosis* dentro de las células dendríticas

30 Planteamos la hipótesis que dirigir la expresión del antígeno a las DCs durante la infección micobacteriana tendría un efecto positivo en la respuesta inmune resultante dirigida hacia el antígeno. Con el fin de inducir la expresión de genes extraños dentro de las DCs, construimos cepas de BCG en las que el promotor de hspX de *M. tuberculosis* (P_{hspX}) controlaba la expresión génica. BCG:P_{hspX}-GFP, en el que se expresaba gfp usando P_{hspX}, mostraba sobreexpresión marcada de la fluorescencia de GFP solo cuando se cultivaba en cultivos no aireados, confirmando la sobreexpresión del promotor hspX bajo tensión baja de oxígeno (figura 7A). Después de la infección de DCs durante 24 horas con BCG:P_{hspX}-GFP, las bacterias aisladas exhibieron un aumento dramático de la fluorescencia en comparación con el inóculo inicial (día 0) o bacterias aisladas 6 horas después de la infección (figura 7B). La visualización de la fluorescencia de GFP mediante microscopía confocal confirmó la inducción de la expresión de GFP controlada por hspX dentro de las DCs infectadas con rBCG (Figura 7C). Estos resultados demuestran que el promotor hspX se puede usar para dirigir la inducción rápida y pronunciada de la expresión génica mediante BCG recombinante dentro de las DCs.

Inducción temprana in vivo de la expresión inducida por hspX después de la vacunación

40 Con el fin de determinar si el promotor hspX podría usarse para dirigir la expresión del antígeno in vivo, los ratones se vacunaron con BCG:P_{hspX}GFP y se determinó la presencia de células hospedadoras GFP⁺. Las células GFP⁺ se detectaron tan pronto como 1 día después de la vacunación, y fueron prominentes en los días 3 y 7 después de la vacunación (Figura 8A). La proporción de células GFP⁺ alcanzó su punto máximo el día 3 después de la vacunación, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tres puntos de tiempo examinados (figura 8B). También detectamos una afluencia de DCs CD11c^{hi}CD11b^{hi} al sitio de vacunación con rBCG, con cifras que alcanzan el máximo el día 7 después de la vacunación (Figura 9A). Las DCs GFP⁺ fueron prominentes en etapas posteriores de la infección, con un número significativo de DCs que albergaban BCG-P_{hspX}GFP en un estado inducido el día 3 y el día 7 respectivamente (Figuras 9B y C). Estos datos indican que la vacunación con BCG:P_{hspX}-GFP da como resultado la infección de las DCs y la inducción intracelular rápida del promotor hspX.

Uso del promotor hspX para dirigir la expresión de antígenos extraños en BCG

50 Para determinar si el promotor hspX podría usarse para modular la inmunidad a antígenos definidos, expresamos el gen que codifica el antígeno inmunodominante *M. tuberculosis* Ag85B bajo el control de este promotor. Aunque un homólogo de esta proteína se expresa mediante BCG, la inmunidad anti-Ag85B mejorada se confiere sobre BCG mediante la sobreexpresión constitutiva del antígeno [17]. La cepa BCG:P_{hspX}-85B mostró sobreexpresión de la expresión de Ag85B en cultivos desarrollados bajo condiciones de aireación limitada (datos no mostrados). Para determinar si la expresión mediada por hspX influye en la presentación de Ag85B por las DCs, las DCs cultivadas in

vitro de médula ósea de ratón se infectaron con BCG:P_{hspX}-85B, BCG solo o BCG:P_{hsp60}-85B, en el que Ag85B se expresa constitutivamente bajo el control de el fuerte promotor hsp60 [17]. Las células infectadas se cultivaron con células T CD4⁺ específicas de Ag85B transgénicas (células T p25 [15]) y se examinaron la proliferación y las citocinas liberadas. Las DCs infectadas con las 3 cepas indujeron la proliferación de las células T p25 (figura 10A) y la secreción de IFN-γ (figura 10B), que no se observó en las células no infectadas. Las respuestas fueron más prominentes en las DCs infectadas con BCG:P_{hspX}-85B, y esta diferencia alcanzó significación en los ensayos de proliferación de células T (Figura 10A). Por lo tanto, el promotor hspX puede usarse para dirigir la expresión de antígenos extraños en BCG, y la inducción dentro de las DCs da como resultado una proliferación de células T mejorada in vitro.

Inmunidad de las células T aumentada in vivo inducida por la vacunación con BCG:P_{hspX}-85B

Los experimentos de inmunogenicidad in vitro sugirieron que el uso del promotor hspX podría ser capaz de modificar la inmunidad inducida por BCG in vivo. Teniendo en cuenta la rápida inducción de la expresión dirigida por el promotor hspX después de la vacunación (figura 8), primero determinamos si la vacunación con BCG:P_{hspX}-85B conducía a un cebado temprano mejorado de las células T reactivas Ag85B en comparación con solo BCG o BCG:P_{hsp60}-85B. Para hacer esto, las células T p25 marcadas con CFSE se transfirieron a receptores de tipo salvaje y la activación y proliferación de las células transferidas se examinaron después de la vacunación con cepas de BCG. En el día 3 después de la infección, la vacuna con BCG:P_{hspX}-85B indujo proliferación de células T p25, con la mayoría de las células divididas mostrando un CFSE intermedio o de bajo perfil, mientras que la vacunación con BCG solo o BCG:P_{hsp60}-85B no produjo una proliferación apreciable (Figuras 11A y B). En el día 7 después de la infección, todas las cepas de BCG indujeron la proliferación de la mayoría de las células T p25 transferidas según lo determinado por el perfil de CSFE de las células T CD4⁺ p25 (Figura 11A) con aproximadamente un 90% de células T25 CD4 mostrando un perfil bajo de CSFE después de la vacunación con BCG, BCG:P_{hsp60}-85B o BCG:P_{hspX}-85B (Figura 11B). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la inducción de Ag85B en BCG:P_{hspX}-85B acelera el cebado inicial de las células T p25, sin embargo, tanto BCG como BCG:P_{hsp60}-85B produjeron suficiente antígeno para dar lugar a la proliferación de células T p25 en puntos de tiempo posteriores.

Posteriormente evaluamos las respuestas de células T a largo plazo vacunando ratones con las tres cepas de BCG y examinando la generación de células T específicas de Ag85B a las 3 o 12 semanas después de la vacunación. A las 3 semanas después de la vacunación, tanto BCG:P_{hsp60}-85B como BCG:P_{hspX}-85B condujeron a la generación incrementada de células secretoras de IFN-γ específicas de Ag85B en comparación con BCG solo, con BCG:P_{hspX}-85B en particular aumentando el número de las células que responden aproximadamente 5 veces en comparación con la BCG control (Figura 12A). A las 12 semanas después de la vacunación, tanto BCG como BCG:P_{hsp60}-85B mostraron niveles equivalentes de células secretoras de IFN-γ que respondían a Ag85B, que eran significativamente mayores que las observadas en ratones no vacunados (Figura 12B). Sin embargo, en ratones vacunados con BCG:P_{hspX}-85B, el número de células secretoras de IFN-γ específicas del antígeno fue aproximadamente 6 veces mayor que el inducido por BCG solo y más de 3 veces la respuesta observada después de la vacunación con BCG:P_{hsp60}-85B (Figura 12B). Estos resultados indican que la capacidad para inducir la expresión de Ag85B dentro de las células hospedadoras da como resultado un patrón de inmunidad incrementada de células T in vivo, que es más evidente en puntos de tiempo extendidos después de la vacunación.

Dado que Ag85B es un antígeno inmunodominante de *M. tuberculosis*, determinamos si rBCG que expresa Ag85B bajo el control del promotor hspX puede mejorar el efecto protector de BCG contra la infección por *M. tuberculosis*. Doce semanas después de la vacunación, los ratones se expusieron a una dosis baja de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* a través de la ruta de aerosol. La carga bacteriana tanto en los pulmones (Figura 12C) como en el bazo (Figura 12D) a las 4 semanas después de la infección por *M. tuberculosis* se redujo significativamente en todos los ratones vacunados con cepas de BCG en comparación con los ratones no vacunados. Sin embargo, el efecto protector fue similar en ratones vacunados con BCG solo, BCG:P_{hspX}-85B; BCG:P_{hsp60}-85B, lo que indica que en este modelo la sobreexpresión de Ag85B no mejoró la eficacia protectora.

Discusión

La vacuna BCG muestra una eficacia protectora variable contra la tuberculosis, sin embargo, la vacuna puede ser manipulada genéticamente para expresar moléculas extrañas en una forma funcional, y esto ha impulsado el desarrollo de BCG como un vector recombinante para proteger contra enfermedades infecciosas y tumores malignos como el cáncer [20]. Es fundamental para el éxito de tales enfoques la capacidad de modular la inmunidad inducida por BCG para generar la respuesta inmune deseada. En este informe, mostramos que el promotor de *M. tuberculosis* hspX puede usarse para modular la expresión de antígenos recombinantes producidos en BCG. Demostramos que el promotor hspX se induce rápidamente in vitro dentro de las DCs (Figura 6), que complementa la literatura existente sobre la expresión de hspX dentro de los macrófagos [21] y la absorción de BCG por las DCs después de la infección de los ratones [8]. Esta rápida y pronunciada inducción in vivo del promotor hspX dentro de las DCs es importante para el uso de este sistema portador de antígeno debido al papel crítico de las DCs en la iniciación de la respuesta inmune micobacteriana [8,22,23]. También demostramos que la actividad del promotor hspX es evidente dentro de las DCs de ratones vacunados con rBCG tan pronto como 24 horas después de la infección (Figura 8). Esta inducción rápida del promotor parece contradecir los niveles de transcripción de hspX después de la infección por *M. tuberculosis* en aerosol a dosis bajas, con ARNm de hspX detectado solo aproximadamente 15 días después de la infección y más prevalente en etapas posteriores [14]. Esto sugiere que la acumulación de hspX in vivo en *M. tuberculosis* puede ser

un proceso lento, o también podría relacionarse con la administración de una dosis elevada de rBCG utilizada en el presente estudio y el sistema de notificación de GFP sensible que facilita la detección de la actividad del promotor hspX.

5 Para determinar los efectos específicos del antígeno de la expresión dirigida por P_{hspX} , usamos el promotor hspX para modular la expresión de *M. tuberculosis* Ag85B, una proteína micobacteriana secretada que es un componente de una serie de vacunas candidatas contra la tuberculosis [24]. Observamos que el reclutamiento temprano de DCs al sitio de infección y la fagocitosis rápida de BCG (Figura 9) se correlacionaban con cebado mejorado y activación de células T reactivas con Ag85B después de la vacunación con BCG: P_{hspX} -85B (Figuras 10 y 11). Además, este cebado de células T mejorado dió como resultado la generación sostenida de células secretoras de IFN- γ que reconocen Ag85B hasta 3 meses después de la vacunación. Curiosamente, la expresión del gen que codifica Ag85B está subregulada durante la infección crónica por *M. tuberculosis* en ratones [14], y sería de interés determinar si las vacunas que usan el promotor Ag85B nativo para dirigir la expresión de antígenos en BCG pueden mantener inmunidad protectora a largo plazo en humanos [25]. También utilizamos un modelo murino de infección por aerosol de *M. tuberculosis* para determinar si la inducción in vivo de Ag85B podría mejorar el efecto protector de la vacuna BCG. Sin embargo, no observamos un efecto protector mejorado en comparación con BCG solo (Figura 12). En un estudio previo, observamos de manera similar que la sobreexpresión de Ag85B en BCG no mejora el efecto protector de BCG, a pesar del aumento de la inmunidad anti-Ag85B en ratones vacunados [17]. Esto sugiere que es necesario evaluar otros antígenos en este sistema para determinar el efecto de la expresión dirigida por P_{hspX} en BCG para proteger contra la infección por *M. tuberculosis*, o alternativamente, BCG: P_{hspX} -85B debe evaluarse en otros modelos preclínicos de tuberculosis donde la expresión de Ag85B proporciona cierto nivel de eficacia protectora mejorada cuando se expresa en rBCG [25].

El mecanismo de inmunidad mejorada y sostenida debido a la sobreexpresión del antígeno a través del promotor hspX no está claro. La sobreexpresión constitutiva de Ag85B usando el promotor hsp60 micobacteriano conduce a niveles de expresión muy fuertes en rBCG como los detectados por inmunoprecipitación Western [17] y es superior a solo BCG en la estimulación de la inmunidad de células T específicas de antígeno, temprano después de la vacunación, sin embargo este efecto no es sostenido a largo plazo (Figuras 12A y 12B). Es posible que la transcripción de P_{hsp60} sea subregulada en etapas posteriores de la infección con BCG, lo que resulta en niveles reducidos de antígeno en puntos de tiempo extendidos, o la inestabilidad del promotor in vivo reduce la inmunogenicidad [26]. Por el contrario, la actividad de P_{hspX} parece ser máxima en puntos de tiempo más largos después de la infección [14], lo que indica que este enfoque puede dar como resultado niveles elevados y sostenidos de expresión de antígeno por BCG: P_{hspX} -85B. Se ha informado previamente que la sobreexpresión de Ag85B en BCG conlleva a una mejor autofagia y mejora la capacidad de la cepa rBCG para estimular las respuestas de células T específicas de antígeno [27]. Cuando inhibimos la autofagia en DCs infectadas con rBCG usando 3-metiladenina y determinamos el grado de activación de células T específicas de Ag85B, observamos una tendencia de activación de células T reducida en DCs tratadas infectadas con BCG: P_{hspX} -85B, sin embargo, este efecto no alcanzó significación estadística en todos los experimentos (datos no mostrados).

Los resultados presentados en el estudio actual demuestran que la capacidad de inducir la expresión del antígeno utilizando rBCG como portador conduce a la generación significativa y sostenida de respuestas inmunes celulares. Esto tiene implicaciones claras para las enfermedades que requieren respuestas tipo "Th1" para su control, como tuberculosis.

Ejemplo 3

Métodos

Ratones C57BL/6 ($n = 5$) se inmunizaron 3 veces mediante inyección s.c. con adyuvante (MPL/DDA), proteína de fusión Ag85B-CysD (10 mg) o Ag85B (10 mg). En el momento de la primera inyección de vacunas de proteínas, los ratones se inmunizaron una vez mediante inyección s.c. con 5×10^5 CFU de BCG. Cuatro semanas después de la tercera inmunización, se expuso a los ratones a *M. tuberculosis* en aerosol con una dosis infecciosa de ~100 bacilos viables por pulmón.

Resultados

La carga bacteriana se determinó en el pulmón (Figura 14A) y el bazo (Figura 14B) 4 semanas después de que los ratones inmunizados se expusieron al aerosol *M. tuberculosis*. Los datos se muestran como la CFU media (\pm SEM) por órgano. La significancia de las diferencias entre los grupos se evaluó mediante ANOVA de una vía con una comparación por pares de conjuntos de datos múltiples agrupados mediante la prueba post hoc de Bonferroni.

La vacunación con Ag85B-CysD dió como resultado una protección equivalente a la vacuna BCG existente. Este es un resultado notable considerando que la BCG expresa una gran cantidad de objetivos antigénicos, aunque nuestra fusión de dos antígenos es igualmente protectora (Figura 14).

ES 2 655 190 T3

Tabla complementaria 1: cebador y clones para purificación de proteínas utilizados en este estudio

Para PCR en tiempo real			
Anotación de genes	nombre del gen	cebador sentido	cebador antisentido
<i>cysDN</i>	ATP sulfurilasa	5'- agt cat cgc cga aac tgc -3'	5'- ttg cca tcg tcg acg gaa -3'
<i>cysH</i>	APS reductasa	5'- gac atc gcg ggt gga ca -3'	5'- gac gga ctc gat cgc atc tc -3'
<i>sirA</i>	Sulfato reductasa	5'- gtt cga gca cag cat ttg gt -3'	5'- gtc cgt cgt cga tca tct gt -3'
<i>cysK1</i>	O-Acetil-serina Sulfidralasa	5'- ttc tcg aac cca cga gcg -3'	5'- ccc gga gtg agg atg agt tc-3'
<i>cysE</i>	Serina Acetilsulfidralasa	5'- ttc atc gac cac gcg acc -3'	5'- gat cgg acc gag gac ctt g -3'
<i>rrs</i>	16s ARNr	5'-agg cag cag tgg gga ata-3'	5'-cta ccg tca atc cga gag aa-3'
Para la clonación de vacunas de ADN: todos los genes clonados en pcADN3. El sitio de restricción de la enzima utilizado en la clonación está resaltado.			
	Cebador sentido	cebador antisentido	
ADN- <i>cysD</i>	<i>Se cortó cysD de un vector pET22b (Novagen) usando enzimas de restricción BamHI y XhoI y se clonó en pcADN3 cortado con las mismas enzimas.</i>		
ADN- <i>cysN</i>	<i>Se cortó cysN de un vector pET22b usando enzimas de restricción BamHI y NotI y se clonó en pcADN3 cortado con las mismas enzimas</i>		
ADN- <i>cysH</i>	5'-acg aaa get tat gag egg cga gac a-3'	5'-ggc ggg ate ccg agg cgt gca acc c-3'	
ADN- <i>sirA</i>	5'-tag gaa gct tat gtc cgc gaa gga g-3'	5'-tcg cgg tac ctc gca ggt cgt cct c-3'	
ADN- <i>cysK1</i>	5'- ggc gaa gct tat gag cat cgc cga g-3'	5'- gca tgg atc cgt cag cca cgt cgg c-3'	
ADN- <i>cysE</i>	5'- tga caa gct tat gct gac ggc cat g -3'	5'- tat tgg tac cga tcg aga agt cct c-3'	
Para purificación de proteína			
	Descripción	Referencia	
CysDN	Descrito anteriormente	((Pinto, 2004; Sun, 2005)	
CysH	Descrito anteriormente	((Sun, 2006)	
SirA	Descrito anteriormente	((Pinto, 2007)	

Para purificación de proteína		
	Descripción	Referencia
CysK1	Se clonó en pET-23A (Noavagen) usando enzimas de restricción Nde I y BamH I y se purificó tal como se describió anteriormente.	((Hara, 1990;Wei, 2002)
CysE	Se clonó en un vector de expresión de doble etiqueta derivado del vector pGEX ((Andreassi, 2004 #98) usando enzimas de restricción Nde I y Not I y se purificó tal como se describió anteriormente.	((Sun, 2005)
Ag85B	Se clonó en el vector de expresión pET19b (Noavagen) con las enzimas de restricción NdeI y BamHI y la purificación de esta proteína se llevó a cabo a través de protocolos de purificación estándar de His-tag (Qiagen).	

SEQ ID No: 1 (secuencia CysD nucleica)

ATGGCAATAACCATAAATATGGTCAATCCTACCGATTATCAGGTATGAGGACGTGGAACAG
 GAAGCCATGACCAGCGATGTGACGGTGGGCCCGCACCCGGCCAGTACCAACTGAGCCATCTG
 CGCTTGCTGGAGGCCGAAGCCATCCACGTCATCCGGGAGGTGGCCGCCGAGTTCGAGCGGCCA
 GTGCTGTTGTTCTCGGGGGGCAAGGACTCCATCGTCATGCTGCACCTGGCGCTGAAGGCGTTT
 CGGCCCGGGCGACTGCCGTTCCCGGTTCATGCACGTCGACACCGGTCACTTTCGACGAAGTT
 ATCGCTACCCGAGACGAGTTGGTCGCCCGCGCCGGGGTGC GGCTGGTGGTGGCGTTCGGTGCAG
 GACGATATCGATGCCGGTCCGGTTCGTGAGACCATCCCGTCGCGAAATCCGATACAGACCGTG
 ACGCTGCTGCGGGCCATCCGGGAGAACCAATTCGACCGGCATTTCGGGGAGCCCGGCGCGAC
 GAGGAGAAGGCCCGCGCAAGGAGCGGGTGTTCAGCTTCCGCGACGAGTTCGGCCAGTGGGAC
 CCGAAGGCTCAGCGGCCGGAACCTGTGGAACCTCTACAACGGACGGCACCACAAGGGCGAGCAC
 ATCCGGGTCTTCCCGCTGTCCAACCTGGACCGAATTCGACATCTGGTCTTACATCGGCGCCGAG
 CAGGTGAGGCTGCCGTCATCTATTTGCGCCACCGGCGCAAGGTGTTTCAGCGCGACGGCATG
 TTGCTGGCCGTGCACCGGCACATGCAACCGCGAGCCGACGAGCCGGTGTTCGAGGCCACGGTG
 CGATTCCGCACCGTCCGGGATGTTACCTGCACCGGGTTCGTTCGAGTCGTCCGCATCGACGGTC
 GCGGAAGTCATCGCCGAAACTGCCGTTGGCCCGCTTGACGGAGCGCGGGGCGACCAGGGCTGAC
 GACCGGATCTCGGAGGCTGGAATGGAAGACCGCAAGCGGCAGGGATACTTCTGA

SEQ ID No. 2 (Secuencia de aminoácidos CysD)

MAITINMVNPTGFIRYEDVEQEAMTSDVTVGPAPGQYQLSHLRLLEAEAIHVIREVAAEFERF
 VLLFSGGKDSIVMLHLALKAFRPGRLPFPVMHVDTGHNDFEVIATRDELVAAGVRLVVASVQ
 DDIDAGRVTETIPSRNPIQTVTLLRAIRENQFDAAF GGARRDEEKARAKERVFSFRDFGQWD
 PKAQRPELWNLNGRHHKGEHIRVFP LSNWTEFDIWSYIGAEQVRLPSIYFAHRRKVFQRDGM
 LLAVHRMQPRADEPVFEATVRFRTVGDVCTGCVESASTVAEVIAETAVALRTERGATRAD
 DRISEAGMEDRKRQGYF

ES 2 655 190 T3

SEQ ID No: 3 (secuencia CysNC de ADN)

ATGACGACGCTATTGCGGCTGGCGACAGCGGGTTCCGTCGACGATGGCAAGTCCACGCTGATT
GGGCGGCTACTCTACGACTCCAAGGCTGTGATGGAAGACCAGTGGGCGTCGGTGGAGCAAACG
TCCAAGGACCGGGGCCACGACTACACCGACCTGGCTCTGGTCACCGACGGCCTGCGGGCCGAG
CGGGAACAGGGCATCACCATCGACGTTGCCTACCGCTACTTCGCCACTCCAAGCGGAAATTC
ATCATTGCCGACACCCCGGGACACATCCAATACACCCGCAACATGGTGACCGGTGCGTCCACC
GCCCAACTGGTGATCGTACTGGTGGATGCCCGGCACGGCTTGCTGGAGCAATCCCGCCGGCAC
GCCTTCCTGGCGTCGCTGCTGGGCATCCGCCACCTGGTGCTCGCGGTCAACAAGATGGACTTG
CTTGGCTGGGACCAAGAGAAATTCGACGCGATTTCGAGACGAATTCACGCCTTCGCGGCCCGC
CTCGACGTGCAGGACGTCACCTCCATCCAATCTCCGCGCTGCACGGCGACAACGTGGTGACC
AAATCCGACCAGACGCCCTGGTACGAGGGACCGTCGCTGCTGTTCGATCTCGAAGACGTCTAC
ATCGCCGGTGACCGCAACATGGTCGACGTGCGATTCCCGGTCCAGTACGTATCCGGCCGCAC
ACCCTCGAGCATCAAGACCACCGCAGCTACGCGGGCACCGTGGCCAGTGGGGTAATGCGTTCA
GGCGACGAAGTTGTGCTGCTGCCGATCGGTAAGACCACCCGGATCACCGCGATCGACGGCCCG
AACGGCCCGGTGGCAGAAGCGTTTCCGCCGATGGCGGTTTCGGTGC GGCTCGCCGACGACATC
GATATCTCGCGTGGTGACATGATCGCTCGCACCACAACCAGCCCAGGATCACACAAGAATTC
GACGCGACCGTGTGCTGGATGGCCGACAACGCGGTGCTAGAGCCCGCCGCGACTACGTTGTC
AAGCACACCACCCGAACCGTCCGCGCGAGGATAGCCGGGCTGGATTACCGGCTCGATGTCAAC
ACCCTGCATCGCGACAAGACCGCAACGGCGTTGAAACTCAACGAACTGGGCCGTGTTTCGCTG
CGCACCCAGGTGCCGTTGCTGCTTGACGAGTACACCCGCAACGCTAGCACCGGCTCGTTCATC
CTCATTGACCCCGACACCAACGGAACGGTGGCGGGCGGCATGGTGTTACGCGACGTCTCGGCC
CGCACGCCTAGCCCGAACACGGTGC GGACAGATCGCTCGTCACTGCGCAAGATCGGCCGCC
AGGGGCAAGACGGTGTGGTTTACCGGACTGTCCGGCTCCGGCAAGTCGTCCGGTGGCCATGCTG
GTTGAGCGGAAGCTACTCGAAAAGGGCATCTCCGCTTACGTTCTGGACGGCGACAACCTACGG
CATGGCCTCAACGCCGACCTGGGCTTTTCCATGGCCGACCGCGCGGAGAACCTGCGCCGGCTG
TCGCATGTGGCCACACTGCTCGCCGATTGTGGCCACCTGGTGCTGGTGCCCGGATCAGCCCC
CTTGCTGAGCACCGTGCCTGGCTCGTAAAGTGCACGCTGATGCGGGAATCGACTTTTTTCGAG
GTGTTCTGTGACACCCCGCTGCAGGACTGTGAGAGGCGTGATCCCAAAGGGTTGTACGCCAAA
GCGCGTGCGGGTGAGATCACGCACCTCACCGGGATCGACAGCCATATCAGCGGCCCAAGAAC
CCAGACCTACGGCTTACGCCGATCGCAGCATAGACGAGCAGGCGCAGGAGGTTATCGACCTG
TTGGAGTCATCGTCTTAG

SEQ ID No: 4 (secuencia CysNC de aminoácidos)

ES 2 655 190 T3

MTTLLRLATAGSVDDGKSTLIGRLLYDSKAVMEDQWASVEQTSKDRGHDYTDLALVTDGLRAR
EQGITIDVAYRYFATPKRKFIIADTPGHIQYTRNMVTGASTAQLVIVLVDARHGLLEQSRRA
FLASLLGIRHLVLAVNKMDLLGWDQEKFDAIRDEFHAFARLDVQDVTSIPISALHGDNVVTK
SDQTPWYEGPSLLSHLEDVYIAGDRNMVDVRFVQYVIRPHTLEHQDHRSYAGTVASGVMRSG
DEVVVLPIGKTTRITAIIDGPNPVAEAFPPMAVSVRLADDIDISRGDMIARTHNPRIQTQEFD
ATVCWMADNAVLEPGRDYVVKHTTRTVRARIAGLDYRLDVNTLHRDKTATALKLNELGRVSLR
TQVPLLLDEYTRNASTGSFILIDPDTNGTVAAGMVLRDVSARTPSPNTVHRSLVTAQDRPPR
GKTVWFGLSGSGKSSVAMLVERKLEKGISAYVLDGDNLRHGLNADLGFSMADRAENLRRLS
HVATLLADCGHLVLPAISPLAEHRALARKVHADAGIDFFEVFCDTPLQDCERRDPKGLYAKA
RAGEITHFTGIDSPYQRPKNPDLRLTPDRSIDEQAQEVIDLLESSS

SEQ ID No: 5 (secuencia Ag85B de ácido nucleico)

ATGACAGACGTGAGCCGAAAGATTCGAGCTTGGGGACGCCGATTGATGATCGGCACGGCAGCG
GCTGTAGTCCTTCCGGGCCTGGTGGGGCTTGCCGGCGGAGCGGCAACCGGGCGCGTTCTCC
CGGCCGGGGCTGCCGGTCGAGTACCTGCAGGTGCCGTGCCGTGATGGGCCGCGACATCAAG
GTTTCAGTTCAGAGCGGTGGGAACAACCTCACCTGCGGTTTATCTGCTCGACGGCCTGCGCGCC
CAAGACGACTACAACGGCTGGGATATCAACACCCCGCGTTTCGAGTGGTACTACCAGTCGGGA
CTGTTCGATAGTCATGCCGGTCGGCGGGCAGTCCAGCTTCTACAGCGACTGGTACAGCCCGGCC
TGCGGTAAGGCTGGCTGCCAGACTTACAAGTGGGAAACCTTCCTGACCAGCGAGCTGCCGCAA
TGGTTGTCCGCCAACAGGGCCGTGAAGCCCACCGGCAGCGCTGCAATCGGCTTGTTCGATGGCC
GGCTCGTCGGCAATGATCTTGGCCGCCTACCACCCCGAGCAGTTCATCTACGCCGGCTCGCTG
TCGGCCCTGCTGGACCCCTCTCAGGGGATGGGGCCTAGCCTGATCGGCCTCGCGATGGGTGAC
GCCGGCGGTTACAAGGCCGAGACATGTGGGGTCCCTCGAGTGACCCGGCATGGGAGCGCAAC
GACCCCTACGCAGCAGATCCCAAGCTGGTTCGAAACAACACCCGGCTATGGGTTTATTGCGGG
AACGGCACCCCGAACGAGTTGGGCGGTGCCAACATACCCGCGGAGTTCCTGGAGAACTTCGTT
CGTAGCAGCAACCTGAAGTTCAGGATGCGTACAACGCCCGGGCGGGCACAACGCCGTGTTTC
AACTTCCCGCCCAACGGCACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGCGCTCAGCTCAACGCCATGAAG
GGTGACCTGCAGAGTTCGTTAGGCGCCGGCTGA

SEQ ID No: 6 (secuencia Ag85B de aminoácidos)

ES 2 655 190 T3

MTDVSRKIRAWGRRMLIGTAAAVVLPGLVGLAGGAATAGAFSRPGLPVEYLQVPSPSMGRDIK
VQFQSGGNNSPAVYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSFYSDWYSPA
CGKAGCQTYKWETFLTSELPOWLSANRAVKPTGSAAIGLSMAGSSAMILAAYHPQQFIYAGSL
SALLDPSQGMGPSLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNDPTQQIIPKLVANNTLWVYCG
NGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNAAGGHNAVFNFPPNGTHSWEYWGAQLNAMK
GDLQSSLGAG

SEQ ID No: 7 (promotor HspX)

CTGCACCGCGCTCTTGATGACATCGGTGGTCACCATGGTGTCCGGCATGATCAACCTCCGCTG
TTCGATATCACCCCGATCTTTCTGAACGGCGGTTGGCAGACAACAGGGTCAATGGTCCCCAAG
TGGATCACCGACGGGCGCGGACAAATGGCCCCGCTTCGGGGACTTCTGTCCCTAGCCCTGGC
CACGATGGGCTGGTCCGATCAAAGGCATCCGTTCCATCGATTAGGAGG

SEQ ID No: 8 (secuencia Ag85BCysD de aminoácidos)

MTDVSRKIRAWGRRMLIGTAAAVVLPGLVGLAGGAATAGAFSRPGLPVEYLQVPSPSMGRDIK
VQFQSGGNNSPAVYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSFYSDWYSPA
CGKAGCQTYKWETFLTSELPOWLSANRAVKPTGSAAIGLSMAGSSAMILAAYHPQQFIYAGSL
SALLDPSQGMGPSLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNDPTQQIIPKLVANNTLWVYCG
NGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNAAGGHNAVFNFPPNGTHSWEYWGAQLNAMK
GDLQSSLGAGGFMAITINMVNPTGFI RYEDVEQEAMTSDVTVGPAPGQYQLSHLRLLEAEAIH
VIREVAAEFERPVLLFSGGKDSIVMLHLALKAFRPGRLPFPVMHVDTGHNFDEVIATRDELVA
AAGVRLVVASVQDDIDAGR VVETIPSRNPIQTVTLRAIRENQFDAAFGGARRDEEKARAKER
VFSFRDEFGQWDPKAQRPELWNL YNGRHHKGEHIRVFPLSNWTEFDIWSYIGAEQVRLPSIYF
AHRKVFQRDGM LLAVHRHMQPRADEPVFEATVRFRTVGDVTCTGCVESSASTVAEVIAETAV
5 ARLTERGATRADDRI SEAGMEDRKRQGYF

SEQ ID No: 9 (secuencia pHspX85BCysD de ácido nucleico)

CTAGACGCCACCCTCCGGGCCGTTGCTTCGCAACGTTCAAATCCGCTCCCGGCGGATTTGTCC
TACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGCCTTTTCGACTGAG
CCTTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTCGCATGGGGAGACCCACACTACCA
TCGGCGCTAGAGCCGACTAGACCTGCACCGCGCTCTTGATGACATCGGTGGTCACCATGGTGT
CCGGCATGATCAACCTCCGCTGTTTCGATATCACCCCGATCTTTCTGAACGGCGGTTGGCAGAC
AACAGGGTCAATGGTCCCAAGTGGATCACCGACGGGCGCGGACAAATGGCCCGCGCTTCGGG
GACTTCTGTCCCTAGCCCTGGCCACGATGGGCTGGTTCGGATCAAAGGCATCCGTTTCCATCGA
TTAGGAGGAAGCTTATGACAGACGTGAGCCGAAAGATTTCGAGCTTGGGGACGCCGATTGATGA
TCGGCACGGCAGCGGCTGTAGTCCTTCCGGGCCTGGTGGGGCTTGCCGGCGGAGCGGCAACCG
CGGGCGCGTTCTCCCGGCCGGGGCTGCCGGTCGAGTACCTGCAGGTGCCGTCCCGTCGATGG
GCCGCGACATCAAGGTTAGTTCCAGAGCGGTGGGAACAACCTCACCTGCGGTTTATCTGCTCG
ACGGCCTGCGCGCCCAAGACGACTACAACGGCTGGGATATCAACACCCCGGCGTTTCGAGTGGT
ACTACCAGTCGGGACTGTTCGATAGTCATGCCGGTCGGCGGGCAGTCCAGCTTCTACAGCGACT
GGTACAGCCCGGCTGCGGTAAGGCTGGCTGCCAGACTTACAAGTGGGAAACCTTCTGACCA
GCGAGCTGCCGCAATGGTTGTCCGCCAACAGGGCCGTGAAGCCCACCGGCAGCGCTGCAATCG
GCTTGTTCGATGGCCGGCTCGTCGGCAATGATCTTGGCCGCTACCACCCCGAGCAGTTCATCT
ACGCCGGCTCGCTGTCGGCCCTGCTGGACCCCTCTCAGGGGATGGGGCCTAGCCTGATCGGCC
TCGCGATGGGTGACGCCGGCGGTTACAAGGCCGAGACATGTGGGGTCCCTCGAGTGACCCGG
CATGGGAGCGCAACGACCCTACGCAGCAGATCCCCAAGCTGGTCGCAAACAACACCCGGCTAT
GGGTTTATTGCGGGAACGGCACCCCGAACGAGTTGGGCGGTGCCAACATAACCGCCGAGTCT
TGGAGAACTTCGTTTCGTAGCAGCAACCTGAAGTTCCAGGATGCGTACAACGCCGCGGGCGGGC
ACAACGCCGTGTTCAACTTCCCGCCCAACGGCACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGCGCTCAGC
TCAACGCCATGAAGGGTGACCTGCAGAGTTTCGTTAGGCGCCGGCGGATCCATGGCAATAACCA
TAAATATGGTCAATCCTACCGATTTATCAGGTATGAGGACGTGGAACAGGAAGCCATGACCA
GCGATGTGACGGTGGGCCCCGACCCGGCCAGTACCAACTGAGCCATCTGCGCTTGCTGGAGG
CCGAAGCCATCCACGTCATCCGGGAGGTGGCCGCGGAGTTTCGAGCGGCCAGTGCTGTTGTTCT

CGGGGGCAAGGACTCCATCGTCATGCTGCACCTGGCGCTGAAGGCGTTTCGGCCCGGGCGAC
 TGCCGTTCCCGGTCATGCACGTCGACACCGGTCACAACCTTCGACGAAGTTATCGCTACCCGAG
 ACGAGTTGGTCGCCGCGCCGGGGTGC GGCTGGTGGTGGCGTCGGTGCAGGACGATATCGATG
 CCGGTCGGGTCGTCGAGACCATCCCGTCGCGAAATCCGATACAGACCGTGACGCTGCTGCGGG
 CCATCCGGGAGAACCAATTCGACGCGGCATTTCGGGGGAGCCCGGCGCGACGAGGAGAAGGCC
 GCGCCAAGGAGCGGGTGTTCAGCTTCCGCGACGAGTTCGGCCAGTGGGACCCGAAGGCTCAGC
 GGCCGGAACGTGTGGAACCTCTACAACGGACGGCACCACAAGGGCGAGCACATCCGGGTCTTCC
 CGCTGTCCAACGTGACCGAATTCGACATCTGGTCTACATCGGCGCCGAGCAGGTGAGGCTGC
 CGTCCATCTATTTTCGCCACCGGCGCAAGGTGTTTCAGCGCGACGGCATGTTGCTGGCCGTGC
 ACCGGCACATGCAACCGCGAGCCGACGAGCCGGTGTTCGAGGCCACGGTGCATTCCGCACCG
 TCGGGGATGTTACCTGCACCGGGTGCCTCGAGTCGTGCGCATCGACGGTCGCGGAAGTCATCG
 CCGAAACTGCGGTGGCCCGCTTGACGGAGCGCGGGGCGACCAGGGCTGACGACCGGATCTCGG
 AGGCTGGAATGGAAGACCGCAAGCGGCAGGGATACTTCCAGCTGCACCACCACCACCACCT
 GAGTTAACTAGCGTACGATCGACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGAC
 TGGGCCTTTCGTTTTATGCCATCATGGCCGCGGTGATCAGCTAGCCACCTGACGTCGGGGGGG
 GGGGAAAGCGACGTTGTGTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAATATATCAT
 CATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATAACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTC
 AACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGT
 ATAAATGGGCTCGCGATAATGTGCGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGC
 CCCATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATG
 AGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCC
 GTA CTCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTAT
 TAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGT
 TGCATTCGATTCCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGG
 CGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGTGACGAGCGTAATGGCT
 GGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAATCTTTTGCCATTCTCACC GGATT CAGTCG
 TCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTA

TTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACTGCC
 TCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAATAATGGTATTGATAATCCTG
 ATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATT
 GGTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGGCTTTGTTGAATAAATCG
 AACTTTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGC
 AAAGCAAAAGTTCAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTC
 CCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTACAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTC
 ACGAGGCAGACCTCACTAGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTC
 TTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGC
 GGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAG
 AGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTC
 TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGA
 TAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTCCGG
 CTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATA
 CCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAAGCGCCAGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
 GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
 TCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC
 AGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTG
 CTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
 CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAACGCGTGAGCCCA
 CCAGCTCCGTAAGTTCGGGTGCTGTGTGGCTCGTACCCGCGCATTACAGGCGGCAGGGGGTCTA
 ACGGTCTAAGGCGGCGTGTACGGCCGCCACAGCGGCTCTTAGCGGCCCGAAACGTCCTCGA
 AACGACGCATGTGTTCTCCTGGTTGGTACAGGTGGTTGGGGGTGCTCGGCTGTGCTGGTGT
 TTCATCATCAGGGCTCGACGGGAGAGCGGGGAGTGTGCAGTTGTGGGGTGGCCCTCAGCGA
 AATATCTGACTTGGAGCTCGTGTCCGACCATAACCGGTGATTAATCGTGGTTTATTATCAAG
 CGTGAGCCACGTCGCCGACGAATTTGAGCAGCTCTGGCTGCCGTAAGTCCCTGGCAAGCGA
 CGATCTGCTCGAGGGGATCTACCGCCAAAGCCGCGCTCGGCCCTAGGCCCGCGGTACATCGA

ES 2 655 190 T3

GGCGAACCCAACAGCGCTGGCAAACCTGCTGGTGGTGGACGTAGACCATCCAGACGCAGCGCT
CCGAGCGCTCAGCGCCCGGGGTCCCATCCGCTGCCAACGCGATCGTGGGCAATCGCGCCAA
CGGCCACGCACACGCAGTGTGGGCACTCAACGCCCTGTTCCACGCACCGAATACGCGCGGCG
TAAGCCGCTCGCATAACATGGCGGGCGTGCGCCGAAGGCCTTCGGCGCGCCGTTCGATGGCGACCG
CAGTTACTCAGGCCTCATGACCAAAAACCCCGGCCACATCGCCTGGGAAACGGAATGGCTCCA
CTCAGATCTCTACACACTCAGCCACATCGAGGCCGAGCTCGGCGCGAACATGCCACCGCCGCG
CTGGCGTCAGCAGACCACGTACAAAGCGGCTCCGACGCCGCTAGGGCGGAATTGCGCACTGTT
CGATTCCGTCAGGTTGTGGGCCTATCTTCCCGCCCTCATGCGGATCTACCTGCCGACCCGGAA
CGTGGACGGACTCGGCCGCGGATCTATGCCGAGTGCCACGCGCGAAACGCCGAATTTCCGTG
CAACGACGTGTGTCCCGACCGCTACCGGACAGCGAGGTCGCGCCATCGCCAACAGCATTTG
GCGTTGGATCACAACCAAGTCGCGCATTTGGGCGGACGGGATCGTGGTCTACGAGGCCACACT
CAGTGC GCGCCATGCGGCCATCTCGCGGAAGGGCGCAGCAGCGCGCACGGCGGCGAGCACAGT
TGCGCGGCGCGCAAAGTCCGCGTCAGCCATGGAGGCATTTGCTATGAGCGACGGCTACAGCGAC
GGCTACAGCGACGGCTACAACCTGGCAGCCGACTGTCCGCAAAAAGCGGCGCGTGACCGCCGCC
GAAGGCGCTCGAATCACCGGACTATCCGAACGCCACGTCGTCGGGCTCGTGGCGCAGGAACGC
AGCGAGTGGTTCGCCGAGCAGGCTGCACGCCGCGAACGCATCCGCGCCTATCACGACGACGAG
GGCCACTCTTGCCCGCAAACGGCCAAACATTTCCGGGCTGCATCTGGACACCGTTAAGCGACTC
GGCTATCGGGCGAGGAAAGAGCGTGCGGCAGAACAGGAAGCGGCTCAAAGGCCCAACAACGAA
GCCGACAATCCACCGCTGTTCTAACGCAATTTGGGGAGCGGGTGTTCGCGGGGGTTCCGTGGGGG
GTTCCGTTGCAACGGGTTCGGACAGGTAAGTCTTGGTAGACGCTAGTTTTCTGGTTTGGGCC
ATGCCTGTCTCGTTGCGTGTTCGTTGCGTCCGTTTTGAATACCAGCCAGACGAGACGGGGTT
CTACGAATCTTGGTCGATACCAAGCCATTTCCGCTGAATATCGTGGAGCTCACCGCCAGAATC
GGTGGTTGTGGTGTATGTACGTGGCGAACTCCGTTGTAGTGCTTGTGGTGGCATCCGTGGCGCG
GCCGCGGTACCAGATCTTTAAAT

Resultado= secuencia del promotor hspX

Resultado y subrayado = sitios de clonación

Cursiva= gen Ag85B-CysD

5 Subrayado= etiqueta de histidina 6

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> La Universidad de Sydney

Instituto Centenario de Medicina contra el Cancer y Biología Celular

<120> Prevención y tratamiento de infección por Mycobacterium

10 <130> 50016554TPG

<150> US61/579166

<151> 2011-12-22

ES 2 655 190 T3

<160> 29

<170> Patenteln versión 3,5

<210> 1

<211> 999

5 <212> ADN

<213> Mycobacterium SPP

<400> 1

```

atggcaataa ccataaatat ggtcaatcct accggattta tcaggtatga ggacgtggaa      60
caggaagcca tgaccagcga tgtgacggtg ggccccgcac ccggccagta ccaactgagc     120
catctgcgct tgctggaggc cgaagccatc cacgctcatcc gggaggtggc cgccgagttc     180
gagcggccag tgctgttggt ctcggggggc aaggactcca tcgtcatgct gcacctggcg     240
ctgaaggcgt ttcggcccgg gcgactgccg ttcccgggtca tgcacgtcga caccggtcac     300
aacttcgacg aagttatcgc taccgagac gagttggtcg ccgcgccggg ggtgctggctg     360
gtggtggcgt cggtgacagga cgatatcgat gccggtcggg tcgtcgagac catcccgtcg     420
cgaaatccga tacagaccgt gacgctgctg cgggccatcc gggagaacca attcgacgcg     480
gcattcgggg gagcccggcg cgacgaggag aaggcccgcg ccaaggagcg ggtgttcagc     540
ttccgcgacg agttcggcca gtgggacccg aaggtcagc ggccggaact gtggaacctc     600
tacaacggac ggcaccacaa gggcgagcac atccgggtct tcccgtgct caactggacc     660
gaattcgaca tctggtccta catcggcgcc gagcaggtca ggctgcccgtc catctatttc     720
gccaccggc gcaaggtggt tcagcgcgac ggcattgttc tggccgtgca ccggcacatg     780
caaccgcgag ccgacgagcc ggtgttcgag gccacggtgc gattccgcac cgtcggggat     840
gttacctgca ccgggtgctg cgagtcgtcg gcatcgacgg tcgcggaagt catcgccgaa     900
actgcggtgg cccgcttgac ggagcgcggg gcgaccaggg ctgacgaccg gatctcggag     960
gctggaatgg aagaccgcaa gcggcagggg tactttctga      999
    
```

<210> 2

10 <211> 332

<212> PRT

<213> Mycobacterium SPP

<400> 2

```

Met Ala Ile Thr Ile Asn Met Val Asn Pro Thr Gly Phe Ile Arg Tyr
1           5           10           15
    
```

ES 2 655 190 T3

Glu Asp Val Glu Gln Glu Ala Met Thr Ser Asp Val Thr Val Gly Pro
 20 25 30
 Ala Pro Gly Gln Tyr Gln Leu Ser His Leu Arg Leu Leu Glu Ala Glu
 35 40 45
 Ala Ile His Val Ile Arg Glu Val Ala Ala Glu Phe Glu Arg Pro Val
 50 55 60
 Leu Leu Phe Ser Gly Gly Lys Asp Ser Ile Val Met Leu His Leu Ala
 65 70 75 80
 Leu Lys Ala Phe Arg Pro Gly Arg Leu Pro Phe Pro Val Met His Val
 85 90 95
 Asp Thr Gly His Asn Phe Asp Glu Val Ile Ala Thr Arg Asp Glu Leu
 100 105 110
 Val Ala Ala Ala Gly Val Arg Leu Val Val Ala Ser Val Gln Asp Asp
 115 120 125
 Ile Asp Ala Gly Arg Val Val Glu Thr Ile Pro Ser Arg Asn Pro Ile
 130 135 140
 Gln Thr Val Thr Leu Leu Arg Ala Ile Arg Glu Asn Gln Phe Asp Ala
 145 150 155 160
 Ala Phe Gly Gly Ala Arg Arg Asp Glu Glu Lys Ala Arg Ala Lys Glu
 165 170 175
 Arg Val Phe Ser Phe Arg Asp Glu Phe Gly Gln Trp Asp Pro Lys Ala
 180 185 190
 Gln Arg Pro Glu Leu Trp Asn Leu Tyr Asn Gly Arg His His Lys Gly
 195 200 205
 Glu His Ile Arg Val Phe Pro Leu Ser Asn Trp Thr Glu Phe Asp Ile
 210 215 220
 Trp Ser Tyr Ile Gly Ala Glu Gln Val Arg Leu Pro Ser Ile Tyr Phe
 225 230 235 240
 Ala His Arg Arg Lys Val Phe Gln Arg Asp Gly Met Leu Leu Ala Val
 245 250 255
 His Arg His Met Gln Pro Arg Ala Asp Glu Pro Val Phe Glu Ala Thr
 260 265 270
 Val Arg Phe Arg Thr Val Gly Asp Val Thr Cys Thr Gly Cys Val Glu
 275 280 285
 Ser Ser Ala Ser Thr Val Ala Glu Val Ile Ala Glu Thr Ala Val Ala
 290 295 300
 Arg Leu Thr Glu Arg Gly Ala Thr Arg Ala Asp Asp Arg Ile Ser Glu
 305 310 315 320
 Ala Gly Met Glu Asp Arg Lys Arg Gln Gly Tyr Phe
 325 330

<210> 3

<211> 1845

ES 2 655 190 T3

<212> ADN

<213> Mycobacterium SPP

<400> 3

```

atgacgacgc tattgcggct ggcgacagcg ggttccgtcg acgatggcaa gtccacgctg      60
attgggcggc tactctacga ctccaaggct gtgatggaag accagtgggc gtcggtggag      120
caaacgtcca aggaccgggg ccacgactac accgacctgg ctctggtcac cgacggcctg      180
cgggccgagc gggaacaggg catcaccatc gacgttgccct accgctactt cgccactccc      240
aagcggaaat tcatcattgc cgacaccccg ggacacatcc aatacaccg caacatggtg      300
accggtgctg ccaccgcca actggtgatc gtactggtgg atgcccggca cggcttgctg      360
gagcaatccc gccggcacgc cttcctggcg tcgctgctgg gcacccgcca cctggtgctc      420
gcggtcaaca agatggactt gcttggtctg gaccaagaga aattcgacgc gattcgagac      480
gaattccacg cttcgcggc ccgcctcgac gtgcaggacg tcacctccat cccaatctcc      540
gcgctgcacg gcgacaacgt ggtgacaaa tccgaccaga cgccctggtg cgagggaccg      600
tcgctgctgt cgcattctga agacgtctac atcgccggcg accgcaacat ggtcgacgtg      660
cgattcccgg tccagtactg catccggccg cacaccctcg agcatcaaga ccaccgcagc      720
tacgcgggca ccgtggccag tggggtaatg cgttcaggcg acgaagttgt cgtgctgccg      780
atcggtaaag ccaccggat caccgcgatc gacggcccga acggcccggg ggcagaagcg      840
tttccgccga tggcggtttc ggtgcggctc gccgacgaca tcgatatctc gcgtggtgac      900
atgatcgctc gcaccacaa ccagcccagg atcacacaag aattcgacgc gaccgtgtgc      960
tggatggccg acaacgcggt gctagagccc ggcgcgact acgttgtaa gcacaccacc     1020
cgaaccgtcc gcgcgaggat agccgggctg gattaccggc tcgatgtcaa cacctgcat     1080
cgcgacaaga ccgcaacggc gttgaaactc aacgaactgg gccgtgtttc gctgcgcacc     1140
caggtgccgt tgtgcttga cgagtacacc cgaaacgcta gcaccggctc gttcatcctc     1200
attgaccccg acaccaacgg aacggtggcg gcgggcatgg tgttacgcga cgtctcggcc     1260
cgcacgccta gcccaaacac ggtgcggcac agatcgctcg tctactgcga agatcggccg     1320
cccaggggca agacggtgtg gtttaccgga ctgtccggct ccggcaagtc gtcggtggcc     1380
atgctggttg agcggaaagt actcgaaaag ggcattctcg cttacgttct ggacggcgac     1440
aacctacggc atggcctcaa cgccgacctg ggtttttcca tggccgaccg cgcggagaac     1500
ctgcgccggc tgtcgcatgt ggccacactg ctgcgccgatt gtggccacct ggtgctggtg     1560
cccgcgatca gcccccttgc tgagcaccgt gccctggctc gtaaagtgca cgctgatgcg     1620
ggaatcgact ttttcgaggt gttctgtgac accccgctgc aggactgtga gaggcgtgat     1680
cccaaagggt tgtacgcaa agcgcgtgcg ggtgagatca cgcacttcac cgggatcgac     1740
agcccatatc agcggcccaa gaaccagac ctacggctta cgccggatcg cagcatagac     1800
5 gagcaggcgc aggaggttat cgacctgtg gagtcatcgt cttag      1845

```

<210> 4

<211> 613

<212> PRT

<213> Mycobacterium SPP

10 <400> 4

ES 2 655 190 T3

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

Lys Ser Thr Leu Ile Gly Arg Leu Leu Tyr Asp Ser Lys Ala Val Met
 20 25 30

Glu Asp Gln Trp Ala Ser Val Glu Gln Thr Ser Lys Asp Arg Gly His
 35 40 45

Asp Tyr Thr Asp Leu Ala Leu Val Thr Asp Gly Leu Arg Ala Arg Glu
 50 55 60

Gln Gly Ile Thr Ile Asp Val Ala Tyr Arg Tyr Phe Ala Thr Pro Lys
 65 70 75 80

Arg Lys Phe Ile Ile Ala Asp Thr Pro Gly His Ile Gln Tyr Thr Arg
 85 90 95

Asn Met Val Thr Gly Ala Ser Thr Ala Gln Leu Val Ile Val Leu Val
 100 105 110

Asp Ala Arg His Gly Leu Leu Glu Gln Ser Arg Arg His Ala Phe Leu
 115 120 125

Ala Ser Leu Leu Gly Ile Arg His Leu Val Leu Ala Val Asn Lys Met
 130 135 140

Asp Leu Leu Gly Trp Asp Gln Glu Lys Phe Asp Ala Ile Arg Asp Glu
 145 150 155 160

Phe His Ala Phe Ala Ala Arg Leu Asp Val Gln Asp Val Thr Ser Ile
 165 170 175

Pro Ile Ser Ala Leu His Gly Asp Asn Val Val Thr Lys Ser Asp Gln
 180 185 190

ES 2 655 190 T3

Thr Pro Trp Tyr Glu Gly Pro Ser Leu Leu Ser His Leu Glu Asp Val
 195 200 205
 Tyr Ile Ala Gly Asp Arg Asn Met Val Asp Val Arg Phe Pro Val Gln
 210 215 220
 Tyr Val Ile Arg Pro His Thr Leu Glu His Gln Asp His Arg Ser Tyr
 225 230 235 240
 Ala Gly Thr Val Ala Ser Gly Val Met Arg Ser Gly Asp Glu Val Val
 245 250 255
 Val Leu Pro Ile Gly Lys Thr Thr Arg Ile Thr Ala Ile Asp Gly Pro
 260 265 270
 Asn Gly Pro Val Ala Glu Ala Phe Pro Pro Met Ala Val Ser Val Arg
 275 280 285
 Leu Ala Asp Asp Ile Asp Ile Ser Arg Gly Asp Met Ile Ala Arg Thr
 290 295 300
 His Asn Gln Pro Arg Ile Thr Gln Glu Phe Asp Ala Thr Val Cys Trp
 305 310 315 320
 Met Ala Asp Asn Ala Val Leu Glu Pro Gly Arg Asp Tyr Val Val Lys
 325 330 335
 His Thr Thr Arg Thr Val Arg Ala Arg Ile Ala Gly Leu Asp Tyr Arg
 340 345 350
 Leu Asp Val Asn Thr Leu His Arg Asp Lys Thr Ala Thr Ala Leu Lys
 355 360 365
 Leu Asn Glu Leu Gly Arg Val Ser Leu Arg Thr Gln Val Pro Leu Leu
 370 375 380
 Leu Asp Glu Tyr Thr Arg Asn Ala Ser Thr Gly Ser Phe Ile Leu Ile
 385 390 395 400
 Asp Pro Asp Thr Asn Gly Thr Val Ala Ala Gly Met Val Leu Arg Asp
 405 410 415
 Val Ser Ala Arg Thr Pro Ser Pro Asn Thr Val Arg His Arg Ser Leu
 420 425 430
 Val Thr Ala Gln Asp Arg Pro Pro Arg Gly Lys Thr Val Trp Phe Thr
 435 440 445
 Gly Leu Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Val Ala Met Leu Val Glu Arg
 450 455 460

ES 2 655 190 T3

Lys Leu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Ala Tyr Val Leu Asp Gly Asp Asn
 465 470 475 480

Leu Arg His Gly Leu Asn Ala Asp Leu Gly Phe Ser Met Ala Asp Arg
 485 490 495

Ala Glu Asn Leu Arg Arg Leu Ser His Val Ala Thr Leu Leu Ala Asp
 500 505 510

Cys Gly His Leu Val Leu Val Pro Ala Ile Ser Pro Leu Ala Glu His
 515 520 525

Arg Ala Leu Ala Arg Lys Val His Ala Asp Ala Gly Ile Asp Phe Phe
 530 535 540

Glu Val Phe Cys Asp Thr Pro Leu Gln Asp Cys Glu Arg Arg Asp Pro
 545 550 555 560

Lys Gly Leu Tyr Ala Lys Ala Arg Ala Gly Glu Ile Thr His Phe Thr
 565 570 575

Gly Ile Asp Ser Pro Tyr Gln Arg Pro Lys Asn Pro Asp Leu Arg Leu
 580 585 590

Thr Pro Asp Arg Ser Ile Asp Glu Gln Ala Gln Glu Val Ile Asp Leu
 595 600 605

Leu Glu Ser Ser Ser
 610

<210> 5

<211> 978

<212> ADN

5 <213> Mycobacterium SPP

<400> 5

```

atgacagacg tgagccgaaa gattcgagct tggggacgcc gattgatgat cggcacggca 60
gcggtctgtag tccttccggg cctggtgggg cttgccggcg gagcggcaac cgcgggctcg 120
ttctcccggc cggggctgcc ggtcgagtac ctgcaggtgc cgtcgccgtc gatgggccgc 180
gacatcaagg ttcagttcca gagcgggtggg aacaactcac ctgcggttta tctgctcgac 240
ggcctgctcg cccaagacga ctacaacggc tgggatatca acaccccggc gttcgagtgg 300
tactaccagt cgggactgtc gatagtcatg ccggtcggcg ggcagtccag cttctacagc 360
gactggtaca gcccggcctg cggttaaggct ggctgccaga cttacaagtg ggaaaccttc 420
ctgaccagcg agctgccgca atggttgctc gccaacaggg ccgtgaagcc caccggcagc 480
gctgcaatcg gcttgctgat ggccggctcg tcggcaatga tcttgccgc ctaccaccc 540
cagcagttca tctacgccgg ctcgctgtcg gccctgctgg acccctctca ggggatgggg 600
cctagcctga tcggcctcgc gatgggtgac gccggcgggtt acaaggccgc agacatgtgg 660
  
```

ES 2 655 190 T3

ggtcctcga gtagccggc atgggagcgc aacgacccta cgcagcagat cccaagctg 720
 gtcgcaaaca acaccggct atgggtttat tgcgggaacg gcaccccgaa cgagttggg 780
 ggtgccaaca taccgccga gttcttgag aacttcgttc gtagcagcaa cctgaagttc 840
 caggatgctg acaacgccgc gggcgggcac aacgccgtgt tcaacttccc gcccaacggc 900
 acgcacagct gggagtactg gggcgctcag ctcaacgcca tgaaggggta cctgcagagt 960
 tcgttaggcg ccggctga 978

<210> 6

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium SPP

<400> 6

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

ES 2 655 190 T3

Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met
195 200 205

Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser
210 215 220

Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu
225 230 235 240

Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro
245 250 255

Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe
260 265 270

Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly
275 280 285

Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp
290 295 300

Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser
305 310 315 320

Ser Leu Gly Ala Gly
325

<210> 7

<211> 238

<212> ADN

5 <213> Mycobacterium SPP

<400> 7

ctgcaccgcg ctcttgatga catcgggtgt caccatggtg tccggcatga tcaacctccg	60
ctgttcgata tcaccccgat ctttctgaac ggcggttggc agacaacagg gtcaatggc	120
cccaagtgga tcaccgacgg gcgcggacaa atggcccgcg cttcggggac ttctgtcctt	180
agccctggcc acgatgggct ggtcggatca aaggcatccg tttccatcga ttaggagg	238

<210> 8

<211> 659

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácido Ag85BCysD

<400> 8

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

15 Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
20 25 30

ES 2 655 190 T3

Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val
 35 40 45
 Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val
 50 55 60
 Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp
 65 70 75 80
 Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro
 85 90 95
 Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val
 100 105 110
 Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly
 115 120 125
 Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu
 130 135 140
 Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser
 145 150 155 160
 Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala
 165 170 175
 Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu
 180 185 190
 Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met
 195 200 205
 Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser
 210 215 220
 Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro
 245 250 255
 Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe
 260 265 270
 Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly
 275 280 285
 Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp
 290 295 300

ES 2 655 190 T3

Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser
 305 310 315 320
 Ser Leu Gly Ala Gly Gly Phe Met Ala Ile Thr Ile Asn Met Val Asn
 325 330 335
 Pro Thr Gly Phe Ile Arg Tyr Glu Asp Val Glu Gln Glu Ala Met Thr
 340 345 350
 Ser Asp Val Thr Val Gly Pro Ala Pro Gly Gln Tyr Gln Leu Ser His
 355 360 365
 Leu Arg Leu Leu Glu Ala Glu Ala Ile His Val Ile Arg Glu Val Ala
 370 375 380
 Ala Glu Phe Glu Arg Pro Val Leu Leu Phe Ser Gly Gly Lys Asp Ser
 385 390 395 400
 Ile Val Met Leu His Leu Ala Leu Lys Ala Phe Arg Pro Gly Arg Leu
 405 410 415
 Pro Phe Pro Val Met His Val Asp Thr Gly His Asn Phe Asp Glu Val
 420 425 430
 Ile Ala Thr Arg Asp Glu Leu Val Ala Ala Ala Gly Val Arg Leu Val
 435 440 445
 Val Ala Ser Val Gln Asp Asp Ile Asp Ala Gly Arg Val Val Glu Thr
 450 455 460
 Ile Pro Ser Arg Asn Pro Ile Gln Thr Val Thr Leu Leu Arg Ala Ile
 465 470 475 480
 Arg Glu Asn Gln Phe Asp Ala Ala Phe Gly Gly Ala Arg Arg Asp Glu
 485 490 495
 Glu Lys Ala Arg Ala Lys Glu Arg Val Phe Ser Phe Arg Asp Glu Phe
 500 505 510
 Gly Gln Trp Asp Pro Lys Ala Gln Arg Pro Glu Leu Trp Asn Leu Tyr
 515 520 525
 Asn Gly Arg His His Lys Gly Glu His Ile Arg Val Phe Pro Leu Ser
 530 535 540
 Asn Trp Thr Glu Phe Asp Ile Trp Ser Tyr Ile Gly Ala Glu Gln Val
 545 550 555 560
 Arg Leu Pro Ser Ile Tyr Phe Ala His Arg Arg Lys Val Phe Gln Arg
 565 570 575

ES 2 655 190 T3

Asp Gly Met Leu Leu Ala Val His Arg His Met Gln Pro Arg Ala Asp
 580 585 590
 Glu Pro Val Phe Glu Ala Thr Val Arg Phe Arg Thr Val Gly Asp Val
 595 600 605
 Thr Cys Thr Gly Cys Val Glu Ser Ser Ala Ser Thr Val Ala Glu Val
 610 615 620
 Ile Ala Glu Thr Ala Val Ala Arg Leu Thr Glu Arg Gly Ala Thr Arg
 625 630 635 640
 Ala Asp Asp Arg Ile Ser Glu Ala Gly Met Glu Asp Arg Lys Arg Gln
 645 650 655

Gly Tyr Phe

<210> 9

<211> 6512

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico pHspX85BCysD

<400> 9

ctagacgcc	ccctccgggc	cgttgcttcg	caacgttcaa	atccgctccc	ggcggatttg	60
tcctactcag	gagagcgttc	accgacaaac	aacagataaa	acgaaaggcc	cagcctttcg	120
actgagcctt	tcgttttatt	tgatgcctgg	cagttcccta	ctctcgcattg	gggagacccc	180
aaactaccat	cggcgctaga	gccgactaga	cctgcaccgc	gctcttgatg	acatcgggtg	240
tcaccatggt	gtccggcatg	atcaacctcc	gctgttcgat	atcacccca	tctttctgaa	300
cggcggtttg	cagacaacag	ggtcaatggt	ccccagtgg	atcaccgacg	ggcgcggaca	360
aatggccccg	gcttcgggga	cttctgtccc	tagccctggc	cacgatgggc	tggtcggatc	420
aaaggcatcc	gtttccatcg	attaggagga	agcttatgac	agacgtgagc	cgaaagattc	480
gagcttgggg	acgccgattg	atgatcggca	cggcagcggc	tgtagtcctt	ccgggcctgg	540
tggggccttg	cggcggagcg	gcaaccgcgg	gcgcgttctc	ccggccgggg	ctgccggtcg	600
agtacctgca	ggtgcctg	ccgtcgatgg	gccgcgacat	caaggttcag	ttccagagcg	660
gtgggaacaa	ctcacctg	gtttatctgc	tcgacggcct	gcgcgcccc	gacgactaca	720
acggctggga	tatcaacacc	ccggcgcttc	agtggtacta	ccagtcggga	ctgtcgatag	780
tcatgccggt	cggcgggcag	tccagcttct	acagcgactg	gtacagccc	gcctgcggta	840
aggctggctg	ccagacttac	aagtgggaaa	cttctctgac	cagcgagctg	ccgcaatggt	900
tgtccgcaa	cagggccgtg	aagcccaccg	gcagcgtgc	aatcggcttg	tcgatggccg	960
gctcgtcggc	aatgatcttg	gccgcctacc	acccccagca	gttcatctac	gccggctcgc	1020

ES 2 655 190 T3

tgtcggccct gctggacccc tctcagggga tggggcctag cctgatcggc ctcgcatgg 1080
 gtgacgccgg cggttacaag gccgcagaca tgtggggctc ctcgagtgc ccggcatggg 1140
 agcgcacaag ccttacgcag cagatcccca agctggtcgc aaacaacacc cggctatggg 1200
 tttattgcgg gaacggcacc ccgaacgagt tgggcgggtg caacataccc gccgagttct 1260
 tggagaactt cgttcgtagc agcaacctga agttccagga tgcgtacaac gccgcgggcg 1320
 ggcacaacgc cgtgttcaac ttcccgcaca acggcacgca cagctgggag tactggggcg 1380
 ctcagctcaa cgccatgaag ggtgacctgc agagtctgtt aggcgccggc ggatccatgg 1440
 caataacat aaatatggtc aatectaccg gatttatcag gtatgaggac gtggaacagg 1500
 aagccatgac cagcgtatgt acgggtggcc ccgcaccggg ccagtaccaa ctgagccatc 1560
 tgcgcttgct ggaggccgaa gccatccacg tcatccggga ggtggccgcc gagttcgagc 1620
 ggccagtgtc gttgttctcg gggggcaagg actecatcgt catgctgcac ctggcgtgta 1680
 aggcgtttcg gcccgggcga ctgccgttcc cggtcatgca cgtcgacacc ggtcacaact 1740
 tcgacgaagt tatcgtctacc cgagacgagt tggtcgccgc ggccgggggtg cggctggtgg 1800
 tggcgtcggg gcaggacgat atcgatgccg gtcgggtcgt cgagaccatc ccgtcgcgaa 1860
 atccgataca gaccgtgacg ctgctgcggg ccatccggga gaaccaattc gacgcggcat 1920
 tcgggggagc ccggcgcgac gaggagaagg cccgcgccaa ggagcgggtg ttcagcttcc 1980
 gcgacgagtt cggccagtgg gacccgaagg ctcagcggcc ggaactgtgg aacctctaca 2040
 acggacggca ccacaagggc gagcacatcc gggcttccc gctgtccaac tggaccgaat 2100
 tcgacatctg gtccatcatc ggcgcccagc aggtcaggct gccgtccatc tatttcgccc 2160
 accggcgcga ggtgtttcag cgcgacggca tgttgctggc cgtgcaccgg cacatgcaac 2220
 cgcgagccga cgagccgggtg ttcgaggcca cggtcgatt ccgcaccgct ggggatgtta 2280
 cctgcaccgg gtgcgtcgag tcgtcggcat cgacggtcgc ggaagtcac cccgaaactg 2340
 cgggtgcccg cttgacggag cgcggggcga ccagggtga cgaccggatc tcggaggctg 2400
 gaatggaaga ccgcaagcgg cagggatact tccagctgca ccaccaccac caccactgag 2460
 ttaactagcg tacgatcgac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac 2520
 tgggccttcc gttttatgcc atcatggccg cggtgatcag ctagccacct gacgtcgggg 2580
 gggggggaaa gcgacgttgt gtctcaaaat ctctgatggt acattgcaca agataaaata 2640
 tatcatcatg aacaataaaa ctgtctgctt acataaacag taatacaagg ggtgttatga 2700
 gccatattca acgggaaacg tcttgctcga ggccgcgatt aaattccaac atggatgctg 2760
 atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata atgtcgggca atcagggtgcg acaatctatc 2820
 gcttgatagg gaagcccat gcgccagagt tgtttctgaa acatggcaaa ggtagcgttg 2880
 ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac taaactggct gacggaattt atgcctcttc 2940
 cgaccatcaa gcattttatc cgtactcctg atgatgcatg gttactcacc actgcgatcc 3000
 ccgggaaaac agcattccag gtattagaag aatatactga ttcagggtgaa aatattgttg 3060

ES 2 655 190 T3

atgCGctggc agtGttcctg cgccggttgc attcgattcc tgtttgtaat tgccttttta 3120
 acagcgatcg cgtatttcgt ctgctcagg cgcaatcacg aatgaataac ggtttggtg 3180
 atgCGagtga ttttgatgac gagcgtaatg gctggcctgt tgaacaagtc tggaaagaaa 3240
 tgcataatct tttgccattc tcaccggatt cagtcgtcac tcatggtgat ttctcactg 3300
 ataaccttat ttttgacgag gggaaattaa taggttgtat tgatggtgga cgagtcggaa 3360
 tcgCagaccg ataccaggat cttgccatcc tatggaactg cctcggtgag tttctcctt 3420
 cattacagaa acggcttttt caaaaatatg gtattgataa tcctgatatg aataaattgc 3480
 agtttcattt gatgctcgat gagtttttct aatcagaatt ggtaattgg ttgtaacct 3540
 ggcagagcat tacgctgact tgacgggacg gcggctttgt tgaataaatc gaacttttgc 3600
 tgagtgaag gatcagatca cgcatcttcc cgacaacgca gaccgttccg tggcaaagca 3660
 aaagttcaaa atcaccaact ggtccaccta caacaaagct ctcatcaacc gtggctccct 3720
 cactttctg ctggatgatg gggcgattca ggctggtat gagtcagcaa caccttctt 3780
 acgaggcaga cctcactagt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 3840
 ttcttgagat ctttttttct tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 3900
 accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 3960
 cttcagcaga gcgCagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca 4020
 cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 4080
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 4140
 taaggcgCag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 4200
 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga 4260
 agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 4320
 ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtctt gtcgggtttc gccacctctg 4380
 acttgacgct cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag 4440
 caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 4500
 tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc 4560
 tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcaacgc gtgagcccac cagctccgta agttcgggtg 4620
 ctgtgtggct cgtaccgcg cattcaggcg gcagggggtc taacgggtct aaggcggcgt 4680
 gtacggccgc cacagcggct cttagcggcc cggaaacgtc ctcgaaacga cgatgtgtt 4740
 cctcctggtt ggtacaggtg gttgggggtg ctcggctgtc gctggtgtt catcatcagg 4800
 gctcgcaggg agagcggggg agtgtgcagt tgtgggggtg cccctcagcg aaatatctga 4860
 cttggagctc gtgtcggacc atacaccggt gattaatcgt ggtttattat caagcgtgag 4920
 ccacgtcgc gacgaattg agcagctctg gctgccgtac tggtccttg caagcgacga 4980
 tctgctcgag gggatctacc gccaaagccg cgcgtcggcc ctaggccgcc ggtacatcga 5040
 ggcgaaccca acagcgtg caaacctgct ggtcgtggac gtagaccatc cagacgcagc 5100

ES 2 655 190 T3

gctccgagcg ctcagcgcgc ggggggtccca tccgctgccc aacgcgatcg tgggcaatcg 5160
 cgccaacggc cacgcacacg cagtgtgggc actcaacgcc cctgttccac gcaccgaata 5220
 cgcgcggcgt aagccgctcg catacatggc ggcgtgccc gaaggccttc ggcgcgccgt 5280
 cgatggcgac cgcagttact caggcctcat gaccaaaaac cccggccaca tcgcctggga 5340
 aacggaatgg ctccactcag atctctacac actcagccac atcgaggccg agctcggcgc 5400
 gaacatgccca ccgcccgcgt ggcgtcagca gaccacgtac aaagcggctc cgacgccgct 5460
 agggcggaat tgcgcaactgt tcgattccgt caggttgtgg gcctatcttc ccgccctcat 5520
 gcggatctac ctgcccaccc ggaacgtgga cggactcggc cgcgcgatct atgccgagtg 5580
 ccacgcgcga aacgccgaat ttccgtgcaa cgacgtgtgt cccggaccgc taccggacag 5640
 cgaggctccg gccatcgcca acagcatttg gcgttggatc acaaccaagt cgcgcatttg 5700
 ggcggacggg atcgtggtct acgagccac actcagtgcg cgccatgcgg ccatctcgg 5760
 gaagggcgca gcagcgcgca cggcggcgag cacagttgca cggcgcgcaa agtcccgctc 5820
 agccatggag gcattgctat gagcgacggc tacagcgacg gctacagcga cggctacaac 5880
 tggcagccga ctgtccgcaa aaagcggcgc gtgaccgccg ccgaaggcgc tcgaatcacc 5940
 ggactatccg aacgccacgt cgtccggctc gtggcgcagg aacgcagcga gtgggtcggc 6000
 gagcaggctg cacgccgca acgcatccgc gcctatcacg acgacgaggg ccaactttgg 6060
 ccgcaaacgg ccaaacattt cgggctgcat ctggacaccg ttaagcgact cggctatcgg 6120
 gcgaggaaag agcgtgcggc agaacaggaa gcggctcaa aggcccacaa cgaagccgac 6180
 aatccaccgc tgttctaacg caattgggga gcgggtgctc cgggggttcc gtggggggtt 6240
 ccgttgcaac gggtcggaca ggtaaaagtc ctggtagacg ctagttttct ggtttgggcc 6300
 atgcctgtct cgttgcgtgt ttcgttgcgt ccgtttttaa taccagccag acgagacggg 6360
 gttctacgaa tcttggtcga taccaagcca tttccgctga atatcgtgga gctcaccgcc 6420
 agaatcggtg gttgtggtga tgtacgtggc gaactccgtt gtagtgcttg tggtgccatc 6480
 cgtggcgcgg ccgcgggtacc agatctttaa at 6512

<210> 10

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cysDN cebador sentido

<400> 10

agtcacgcc gaaactgc 18

10 <210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213>. Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cysDN cebador antisentido

<400> 11

ttgccatcgt cgacggaa 18
 <210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cysH cebador sentido
 <400> 12
 gacatcgagg gtggaca 17
 10 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> cysH cebador antisentido
 <400> 13
 gacggactcg atcgcattc 20
 <210> 14
 <211> 20
 20 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> sirA cebador sentido
 <400> 14
 25 gttcgagcac agcatttgg 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> sirA cebador antisentido
 <400> 15
 gtccgtcgtc gatcattgt 20
 <210> 16
 35 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cysK1 cebador sentido
 <400> 16
 ttctcgaacc cacgagcg 18
 5 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> cysK1 cebador antisentido
 <400> 17
 cccggagtga ggatgagttc 20
 <210> 18
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cysE cebador sentido
 <400> 18
 20 ttcacgacc acgcgacc 18
 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> cysE cebador antisentido
 <400> 19
 gatcggaccg aggaccttg 19
 <210> 20
 30 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> 16S ARN cebador sentido
 35 <400> 20
 aggcagcagt ggggaata 18
 <210> 21

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> 16S ARN cebador antisentido
 <400> 21
 ctaccgtcaa tccgagagaa 20
 <210> 22
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN-cysH cebador sentido
 <400> 22
 15 acgaaagctt atgagcggcg agaca 25
 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> ADN-cysH cebador antisentido
 <400> 23
 ggcgggatcc cgaggcgtgc aacctt 25
 <210> 24
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN-sirA cebador sentido
 30 <400> 24
 taggaagctt atgtccgca aggag 25
 <210> 25
 <211> 25
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN-sirA cebador antisentido

<400> 25
 tcgcggtacc tcgcaggctg tcctc 25
 <210> 26
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN-cysK1 cebador sentido
 <400> 26
 10 ggccaagctt agagcatcgc cgag 24
 <210> 27
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> ADN-cysK1 cebador antisentido
 <400> 27
 gcatggatcc gtcagccacg tcggc 25
 <210> 28
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN-cysE cebador sentido
 25 <400> 28
 tgacaagctt atgctgacgg ccatg 25
 <210> 29
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ADN-cysE cebador antisentido
 <400> 29
 tattgtacc gatcgagaag tcctc 25
 35 Referencias

1. Dye, C. and B.G. Williams, The population dynamics and control of tuberculosis. Science, 2010. 328(5980): p. 856-61.

2. Kaufmann, S.H., Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. *The Lancet infectious diseases*, 2011. 11(8): p. 633-40.
4. Timm, J., et al., Differential expression of iron-, carbon-, and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(24): p. 14321-6.
- 5 5. Pinto, R., et al., The *Mycobacterium tuberculosis* *cysD* and *cysNC* genes form a stress-induced operon that encodes a tri-functional sulfate-activating complex. *Microbiology*, 2004. 150(Pt 6): p. 1681-6.
6. Banaiee, N., W.R. Jacobs, Jr., and J.D. Ernst, Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* *whiB3* in the mouse lung and macrophages. *Infect Immun*, 2006. 74(11): p. 6449-57.
- 10 7. Muttucumar, D.G., et al., Gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* in a non-replicating state. *Tuberculosis (Edinb)*, 2004. 84(3-4): p. 239-46.
8. Manganelli, R., et al., Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol*, 2002. 45(2): p. 365-74.
9. Hampshire, T., et al., Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms? *Tuberculosis (Edinb)*, 2004. 84(3-4): p. 228-38.
- 15 10. Betts, J.C., et al., Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol*, 2002. 43(3): p. 717-31.
11. Schnappinger, D., et al., Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med*, 2003. 198(5): p. 693-704.
- 20 12. Rhee, K.Y., et al., S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(2): p. 467-72.
13. Fan, F., et al., Structures and mechanisms of the mycothiol biosynthetic enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 2009. 13(4): p. 451-9.
14. Rawat, M., et al., Mycothiol-deficient *Mycobacterium smegmatis* mutants are hypersensitive to alkylating agents, free radicals, and antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(11): p. 3348-55.
- 25 15. Buchmeier, N.A., et al., Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. *Mol Microbiol.*, 2003. 47(6): p. 1723-32.
16. Sareen, D., et al., Mycothiol is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. *J Bacteriol*, 2003. 185(22): p. 6736-40.
- 30 17. Buchmeier, N. and R.C. Fahey, The *mshA* gene encoding the glycosyltransferase of mycothiol biosynthesis is essential in *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. *FEMS Microbiol Lett*, 2006. 264(1): p. 74-9.
18. Newton, G.L. and R.C. Fahey, Mycothiol biochemistry. *Arch Microbiol*, 2002. 178(6): p. 388-94.
19. Senaratne, R.H., et al., 5'-Adenosinephosphosulphate reductase (CysH) protects *Mycobacterium tuberculosis* against free radicals during chronic infection phase in mice. *Mol Microbiol*, 2006. 59(6): p. 1744-53.
- 35 20. Andersen, P., et al., Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scandinavian journal of immunology*, 1992. 36(6): p. 823-31.
21. Roberts, A.D., et al., Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, 1995. 85(3): p. 502-8.
22. de Souza, G.A., et al., Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. *Journal of proteomics*, 2011.
- 40 23. Bhave, D.P., W.B. Muse, 3rd, and K.S. Carroll, Drug targets in mycobacterial sulfur metabolism. *Infectious disorders drug targets*, 2007. 7(2): p. 140-58.
24. Schelle, M.W. and C.R. Bertozzi, Sulfate metabolism in mycobacteria. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2006. 7(10): p. 1516-24.
- 45 25. Jackson, M., et al., Persistency and protective efficacy, of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infection and immunity*, 1999. 67(6): p. 2867-73.
26. Bryk, R., et al., Selective killing of nonreplicating mycobacteria. *Cell Host Microbe*, 2008. 3(3): p. 137-45.

27. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
28. Palendira, U., et al., Coexpression of interleukin-12 chains by a self-splicing vector increases the protective cellular immune response of DNA and *Mycobacterium bovis* BCG vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*, 2002. 70(4): p. 1949-56.
29. Cole, S.T., et al., Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998. 393(6685): p. 537-44.
30. Schnell, R., et al., Structural insights into catalysis and inhibition of O-acetylserine sulfhydrylase from *Mycobacterium tuberculosis*. Crystal structures of the enzyme alpha-aminoacrylate intermediate and an enzyme-inhibitor complex. *J Biol Chem*, 2007. 282(32): p. 23473-81.
31. Sun, M., et al., The trifunctional sulfate-activating complex (SAC) of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 2005. 280(9): p. 7861-6.
32. Hatzios, S.K. and C.R. Bertozzi, The regulation of sulfur metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 2011. 7(7): p. e1002036.
33. McKinney, J.D., et al., Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 2000. 406(6797): p. 735-8.
34. Voskuil, M.I., K.C. Visconti, and G.K. Schoolnik, *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy *Tuberculosis (Edinb)*, 2004. 84(3-4): p.218-27.
35. Danelishvili, L., et al., Secreted *Mycobacterium tuberculosis* Rv3654c and Rv3655c proteins participate in the suppression of macrophage apoptosis. *PLoS One*, 2010. 5(5): p. e10474.
37. Heifets, L., J. Simon, and V. Pham, Capreomycin is active against non-replicating *M. tuberculosis*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2005. 4: p. 6.
38. Tasneen, R., et al., Enhanced bactericidal activity of rifampin and/or pyrazinamide when combined with PA-824 in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. 52(10): p. 3664-8.
39. Gartner, T., et al., Mucosal prime-boost vaccination for tuberculosis based on TLR triggering OprL lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa* fused to mycolyl-transferase Ag85A. *Immunology letters*, 2007. 111(1): p. 26-35.
40. Kamath, A.T., et al., Co-immunization with DNA vaccines expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and mycobacterial secreted proteins enhances T-cell immunity, but not protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, 1999. 96(4): p. 511-6.
41. Skinner, M.A., et al., A DNA prime-live vaccine boost strategy in mice can augment IFN-gamma responses to mycobacterial antigens but does not increase the protective efficacy of two attenuated strains of *Mycobacterium bovis* against bovine tuberculosis. *Immunology*, 2003. 108(4): p. 548-55.
42. Aagaard, C., et al., A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nature medicine*, 2011. 17(2): p. 189-94.
43. Lu, J., et al., Immunogenicity and Protective Efficacy against Murine Tuberculosis of a Prime-Boost Regimen with BCG and a DNA Vaccine Expressing ESAT-6 and Ag85A Fusion Protein. *Clin Dev Immunol*, 2011. 2011: p. 617892.
44. Dey, B., et al., Latency Antigen alpha-Crystallin Based Vaccination Imparts a Robust Protection against TB by Modulating the Dynamics of Pulmonary Cytokines. *PLoS One*, 2011. 6(4): p. e18773.
45. Rouanet, C., et al., Subcutaneous boosting with heparin binding haemagglutinin increases BCG-induced protection against tuberculosis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2009. 11(13): p.995-1001.
47. Droux, M., et al., Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants- structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *European journal of biochemistry / FEBS*, 1998. 255(1): p. 235-45.
48. Mino, K., et al., Characteristics of serine acetyltransferase from *Escherichia coli* deleting different lengths of amino acid residues from the C-terminus. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2000. 64(9): p. 1874-80.
49. Kredich, N.M. and G.M. Tomkins, The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *The Journal of biological chemistry*, 1966. 241(21): p. 4955-65.
50. Mino, K., et al., Purification and characterization of serine acetyltransferase from *Escherichia coli* partially truncated at the C-terminal region. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1999. 63(1): p.168-79.

51. Wei, J., et al., Cysteine biosynthetic enzymes are the pieces of a metabolic energy pump. *Biochemistry*, 2002. 41(26): p. 8493-8.
- [1] Nchinda G, Kuroiwa J, Oks M, Trumfheller C, Park CG, Huang Y, et al. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J Clin Invest* 2008 Apr;118(4):1427-36.
- 5 [2] Ryan AA, Wozniak TM, Shklovskaya E, O'Donnell MA, Fazekas de St Groth B, Britton WJ, et al. Improved protection against disseminated tuberculosis by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin secreting murine GM-CSF is associated with expansion and activation of APCs. *J Immunol* 2007;179(December (12)):8418-24.
- [3] Lozza L, Rivino L, Guarda G, Jarrossay D, Rinaldi A, Bertoni F, et al. The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4(+)IL-7R(hi) T cells. *Eur J Immunol* 2008;38(January (1)):30--9.
- 10 [4] Ohara N, Yamada T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 2001;19(30):4089-98.
- [5] Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 1999;353(9165):1689-94.
- [6] Ristori G, Buzzi MG, Sabatini U, Giugni E, Bastianello S, Viselli F, et al. Use of Bacille Calmette-Guerin (BCG) in multiple sclerosis. *Neurology* 1999;53(October (7)):1588-9.
- 15 [7] Kodama S, Davis M, Faustman DL. The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(August (16)):1850-62.
- [8] Jiao X, Lo-Man R, Guernonprez P, Fiette L, Deriaud E, Burgaud S, et al. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol* 2002; 168(February (3)):1294-301.
- 20 [9] Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nunez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol* 2007;179(August (4)):2509-19.
- [10] Chang Z, Primm TP, Jakana J, Lee IH, Serysheva I, Chiu W, et al. *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. *J Biol Chem* 1996;271(12):7218-23.
- 25 [11] Yuan Y, Crane DD, Barry 3rd CE. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 1996; 178(15):4484-92.
- [12] Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(16):9578-83.
- 30 [13] Garbe TR, Hibler NS, Deretic V. Response to reactive nitrogen intermediates in *Mycobacterium tuberculosis*: induction of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog by exposure to nitric oxide donors. *Infect Immun* 1999;67(1):460-5.
- [14] Shi L, Jung YJ, Tyagi S, Gennaro ML, North RJ. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of non-replicating persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(1):241-6.
- 35 [15] Tamura T, Ariga H, Kinashi T, Uehara S, Kikuchi T, Nakada M, et al. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int Immunol* 2004;16(December (12)):1691-9.
- [16] Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991;351(6326):456-60.
- 40 [17] Palendira U, Spratt JM, Britton WJ, Triccas JA. Expanding the antigenic repertoire of BCG improves protective efficacy against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vaccine* 2005;23(February (14)):1680-5.
- [18] Demangel C, Bean AG, Martin E, Feng CG, Kamath AT, Britton WJ. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29(6):1972-9.
- 45 [19] Triccas JA, Sun L, Palendira U, Britton WJ. Comparative effects of plasmid-encoded interleukin 12 and interleukin 18 on the protective efficacy of DNA vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Cell Biol* 2002 Aug;80(4):346-50.
- [20] Triccas JA. Recombinant BCG as a vaccine vehicle to protect against tuberculosis. *Bioeng Bugs* 2001;1(2):1-6.
- [21] Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(16):9578-83.

- [22] Hickman SP, Chan J, Salgame P. Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol* 2002;168(May (9)):4636-42.
- 5 [23] Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* 2001;166(June (12)):7033-41.
- [24] Dietrich J, Lundberg CV, Andersen P. TB vaccine strategies-what is needed to solve a complex problem? *Tuberculosis (Edinb)* 2006;86(May-July (3-4)):163-8.
- 10 [25] Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(December (25)):13853-8.
- 15 [26] Al-Zarouni M, Dale JW. Expression of foreign genes in Mycobacterium bovis BCG strains using different promoters reveals instability of the hsp60 promoter for expression of foreign genes in Mycobacterium bovis BCG strains. *Tuberculosis (Edinb)* 2002;82(6):283-91.
- [27] Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter Jr RL, Eissa NT. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med* 2009;15(March (3)):267-76.
- [28] Hohmann EL, Oletta CA, Loomis WP, Miller SI. Macrophage-inducible expression of a model antigen in Salmonella typhimurium enhances immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(March (7)):2904-8.
- 20 [29] Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated Salmonella enterica var Typhimurium. *Infect Immun* 1999;67(October (10)):5133-41.
- [30] Londono LP, Chatfield S, Tindle RW, Herd K, Gao XM, Frazer I, et al. Immunisation of mice using Salmonella typhimurium expressing human papillomavirus type 16 E7 epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. *Vaccine* 1996;14(April (6)):545-52.
- 25 Pinto R., Harrison JS, Hsu T, et al. Sulfite reduction in mycobacteria. *J Bacteriol* 2007; 189: 6714-22.
- Hara S, Payne MA, Schnackerz KD, et al A rapid purification procedure and computer-assisted sulfide ion selective electrode assay for O-acetylserine sulfhydrylase from Salmonella typhimurium. *Protein Expr Purif* 1990; 1:70-6
- Sun M, Leyh, T. S. Channeling in sulfate activating complexes. *Biochemistry* 2006; 45:11304-11.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante o sintética que incluye:
 - una primera región que tiene una secuencia codificada por un gen que codifica un componente de una vía de asimilación de sulfato de Mycobacterium (SAP), en la que el gen es un gen Mycobacterium CysD que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 1; y
 - una región adicional que tiene una secuencia codificada por un gen de Mycobacterium Ag85B que tiene una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 5.
2. La proteína recombinante o sintética de la reivindicación 1, en la que la proteína tiene una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 8.
3. Un ácido nucleico que codifica una proteína de la reivindicación 1 o 2, en el que la primera región está codificada por una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1.
4. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3, y un promotor de Mycobacterium HspX operativamente unido a dicho ácido nucleico.
5. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 que tiene una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 9.
6. Una vacuna acelular o composición inmunoestimulante para proporcionar una respuesta inmune a Mycobacterium en un individuo que incluya:
 - una proteína recombinante o sintética de la reivindicación 1 o 2; y
 - un compuesto para potenciar una respuesta inmune a la proteína recombinante o sintética.
7. Una vacuna o composición de la reivindicación 6, en la que la proteína recombinante o sintética incluye al menos un antígeno de Mycobacterium adicional.
8. La vacuna o composición de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en la que el compuesto para potenciar una respuesta inmune al componente de Mycobacterium SAP incluye un adyuvante en forma de lípido A monofosforilo (MPL).
9. La vacuna o composición de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en la que el compuesto para potenciar una respuesta inmune al componente de Mycobacterium SAP incluye un adyuvante en la forma de bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA).
10. Una proteína, vacuna o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o 6 a 9 para minimizar la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en un individuo,
- en el que la proteína, vacuna o composición forma una respuesta inmune a un componente de un Mycobacterium SAP en un individuo;
- minimizando así la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en el individuo.
11. La proteína, vacuna o composición para minimizar la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en un individuo de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el individuo no tiene una infección de Mycobacterium detectable.
12. La proteína, vacuna o composición para minimizar la probabilidad de desarrollo de una infección por Mycobacterium en un individuo de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el individuo tiene uno o más síntomas de infección por Mycobacterium.

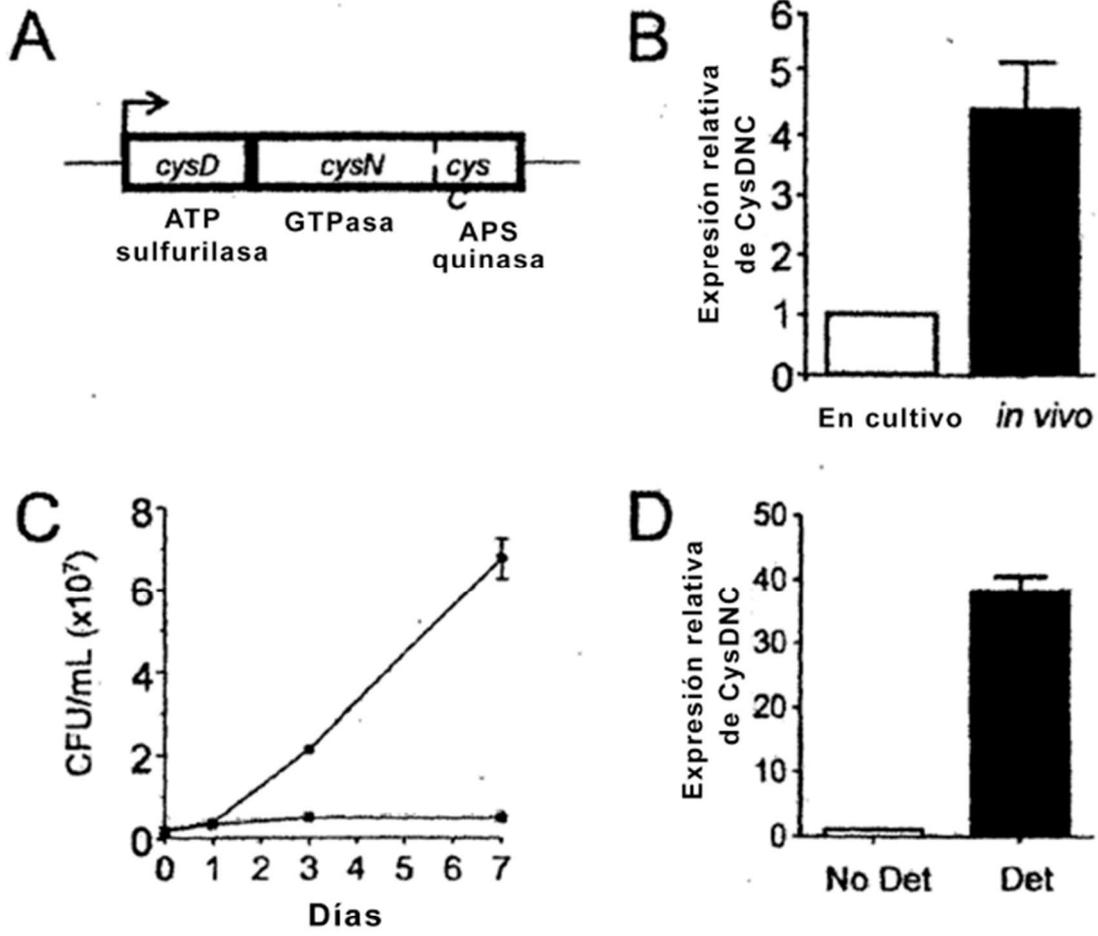


Figura 1

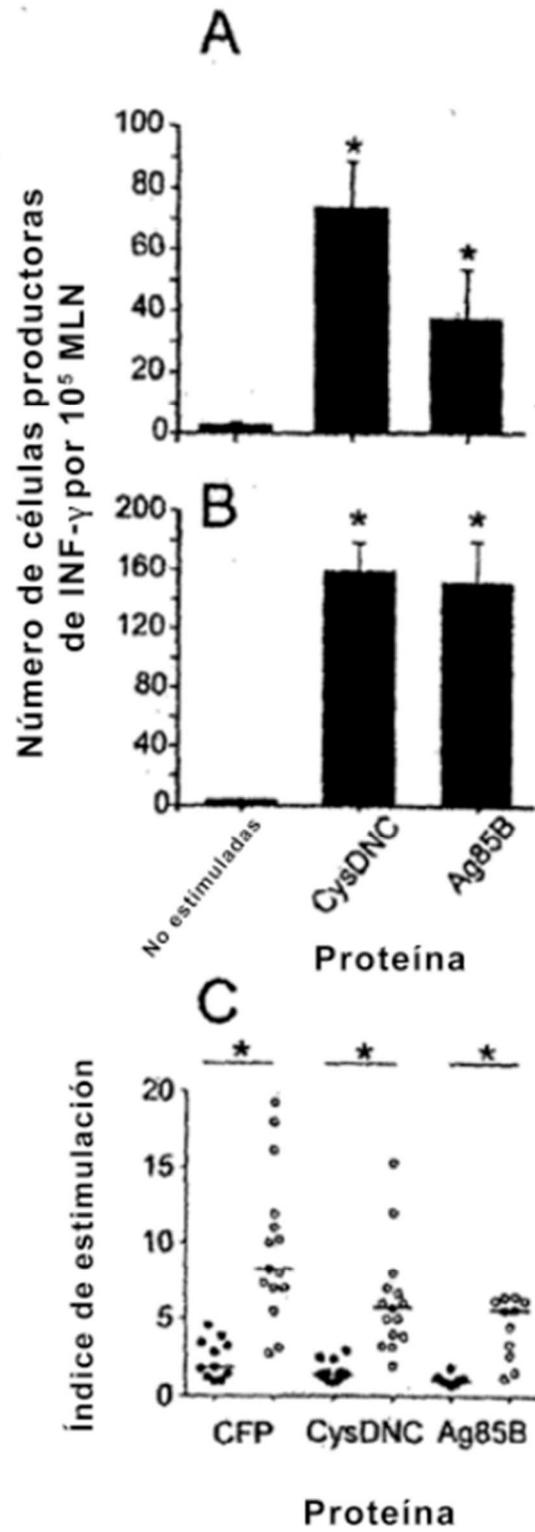


Figura 2

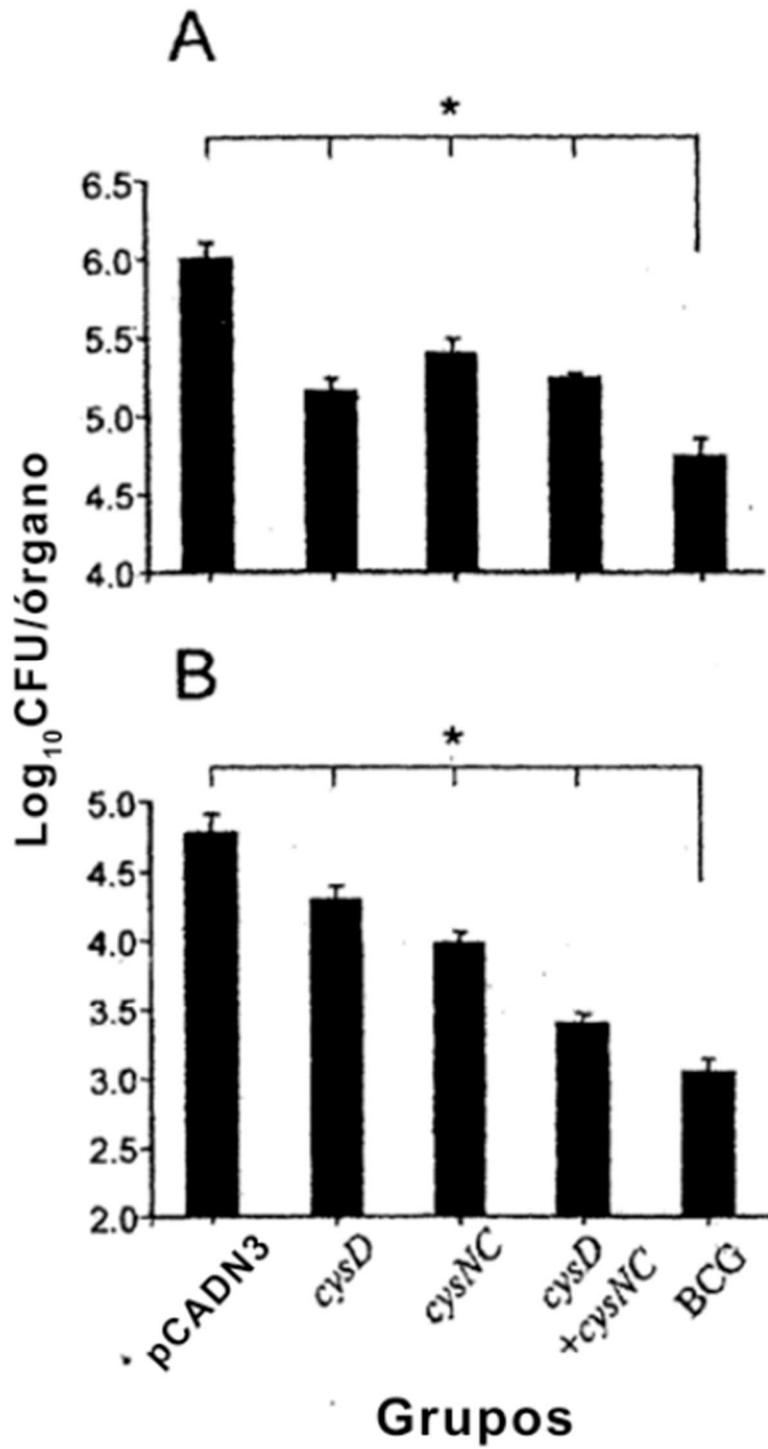


Figura 3

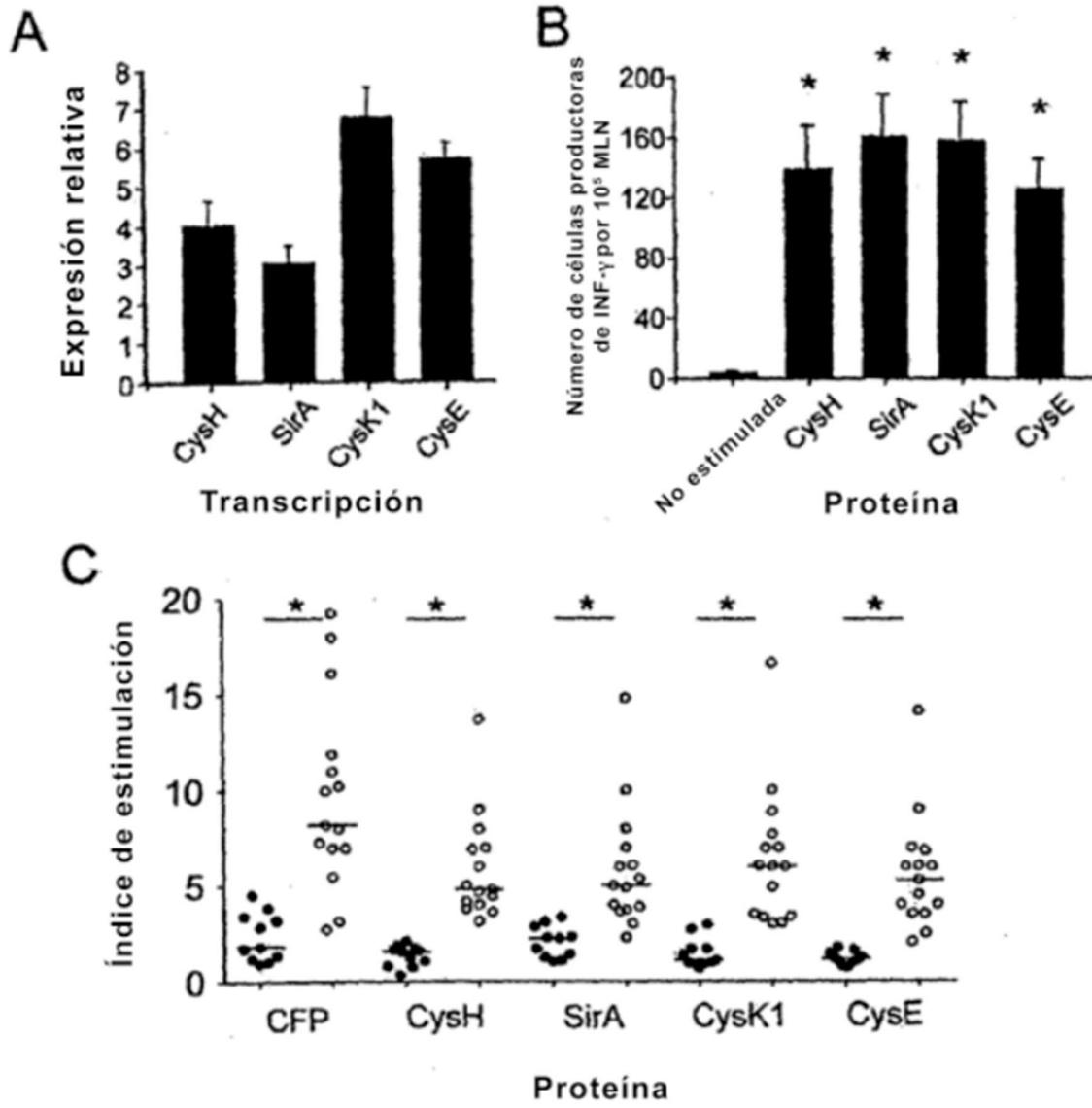


Figura 4

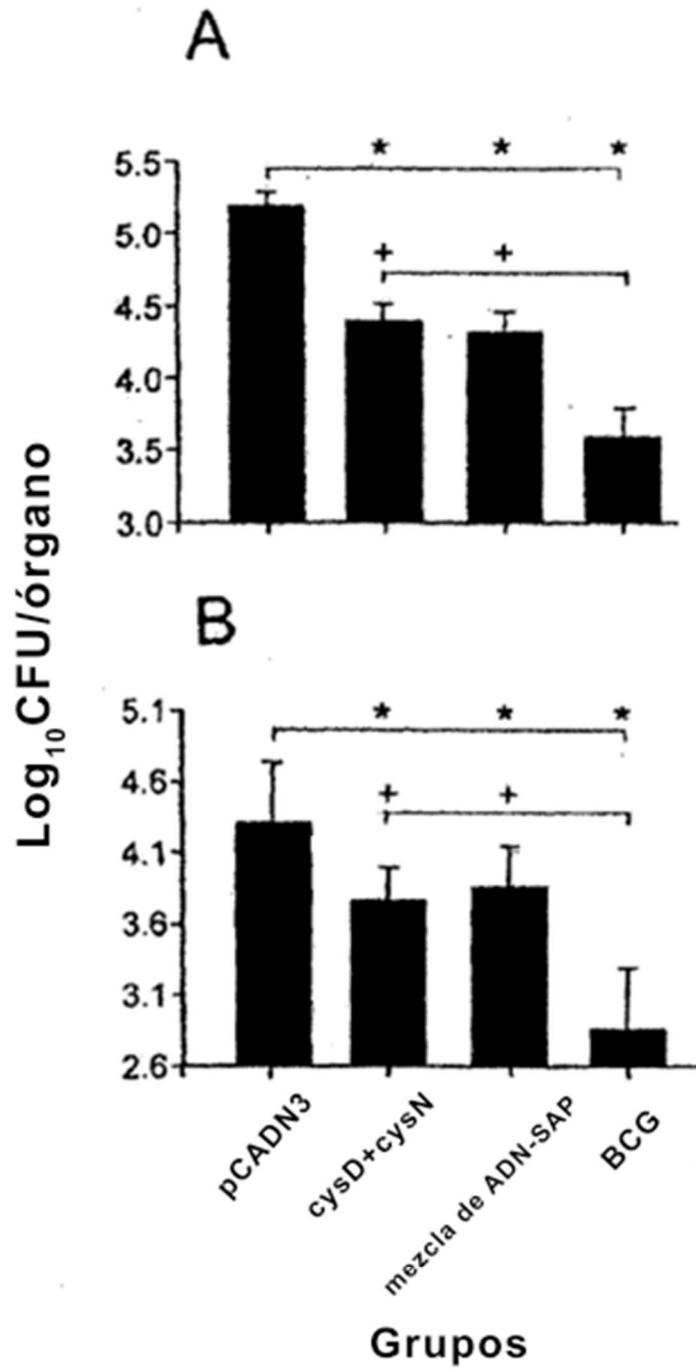


Figura 5

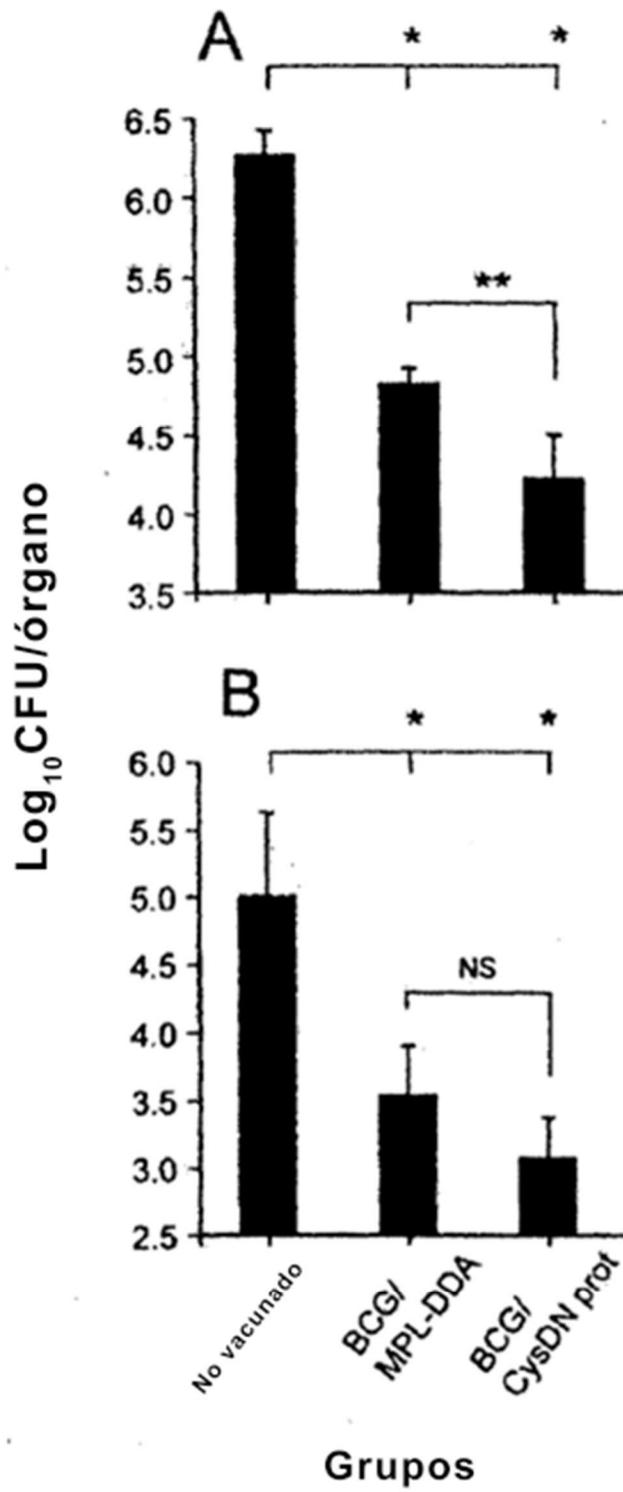


Figura 6

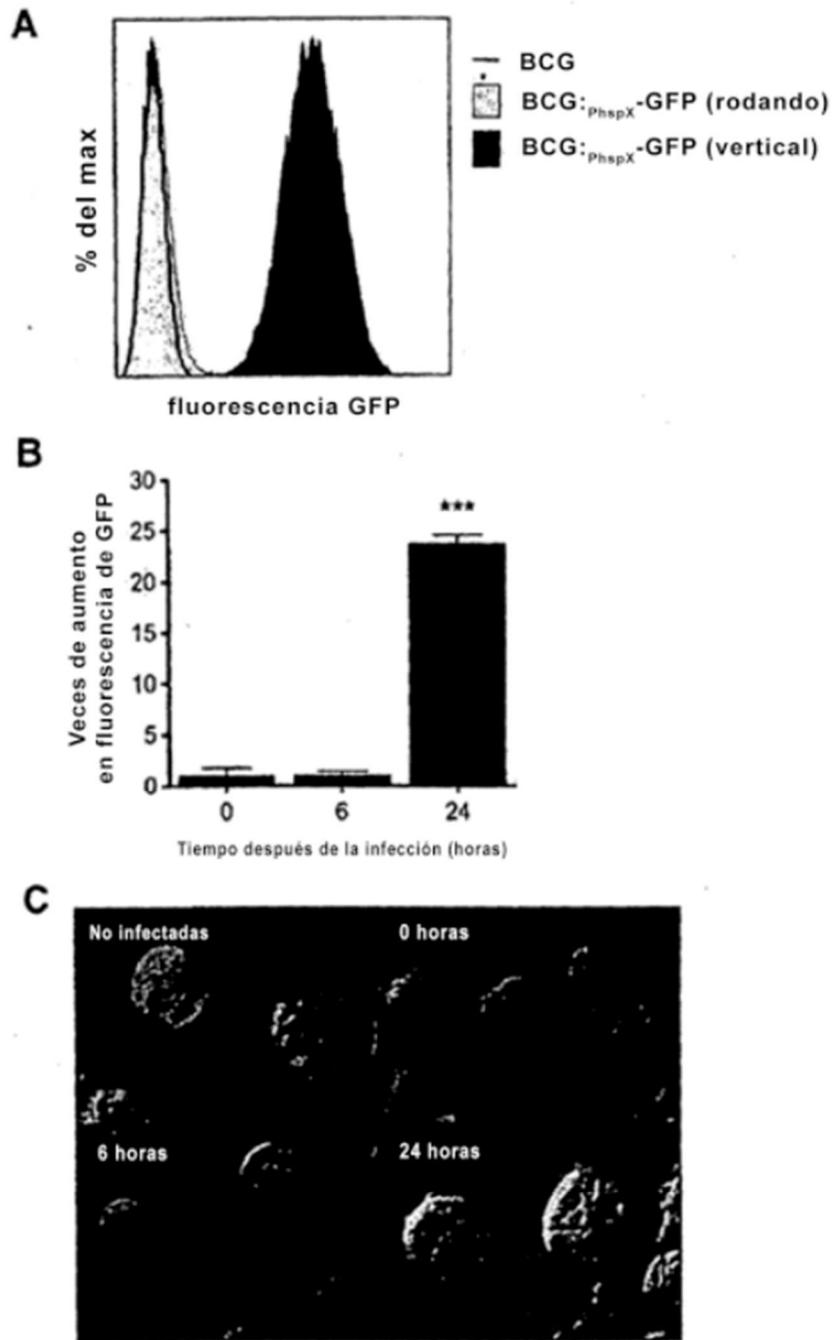


Figura 7

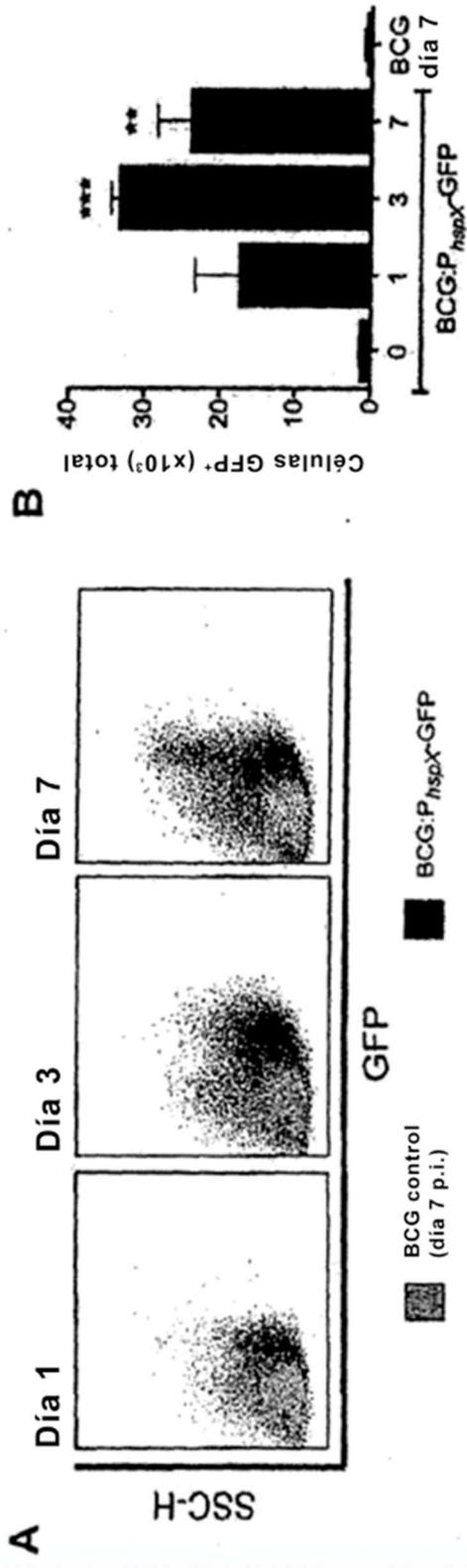


Figura 8

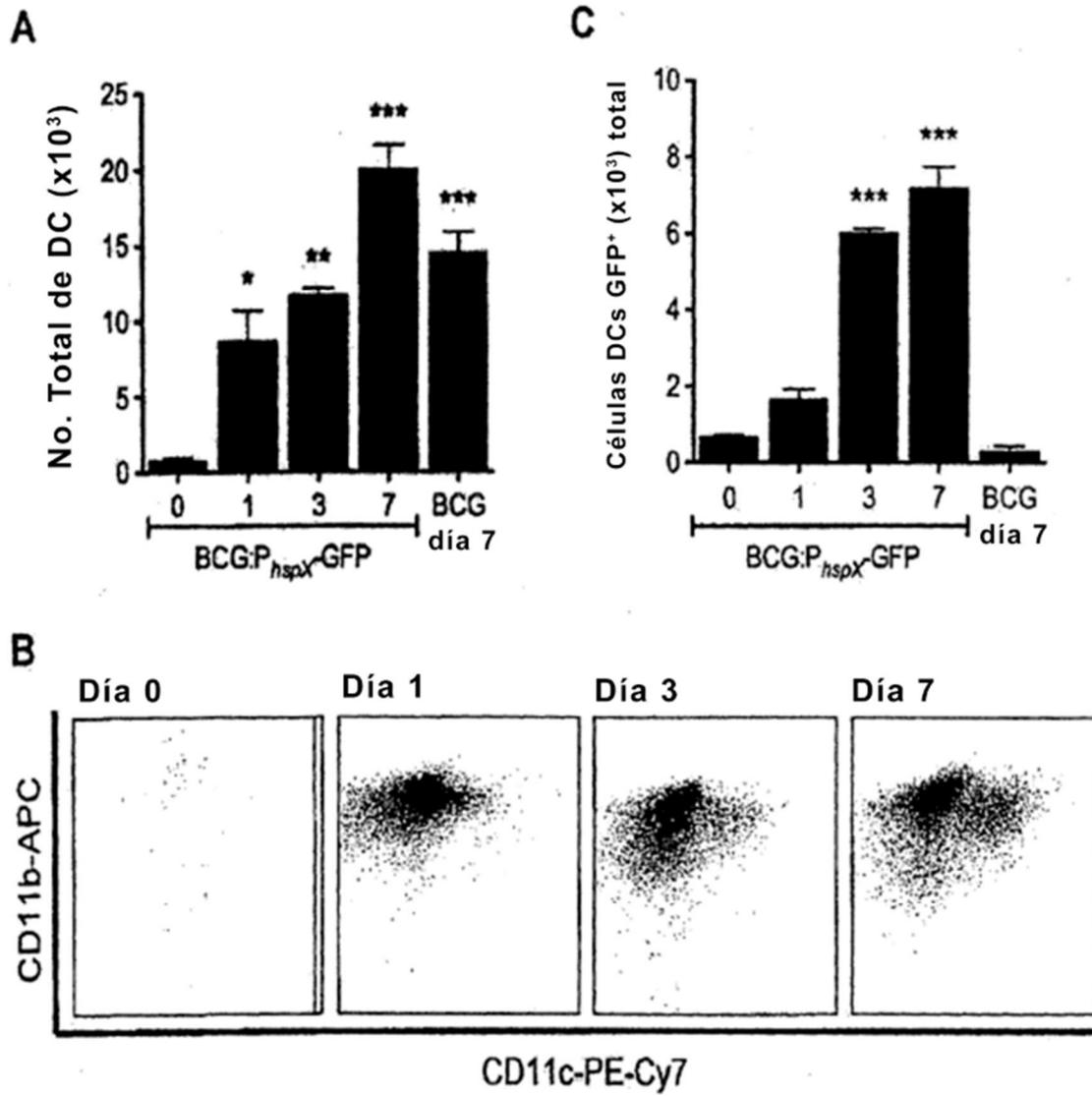


Figura 9

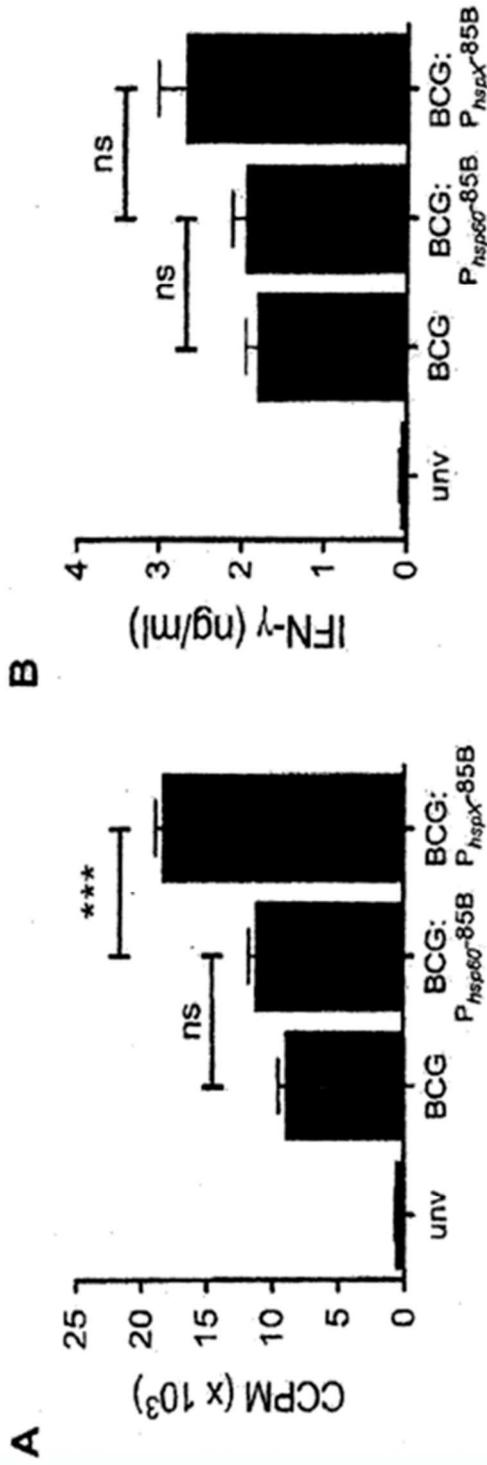


Figura 10

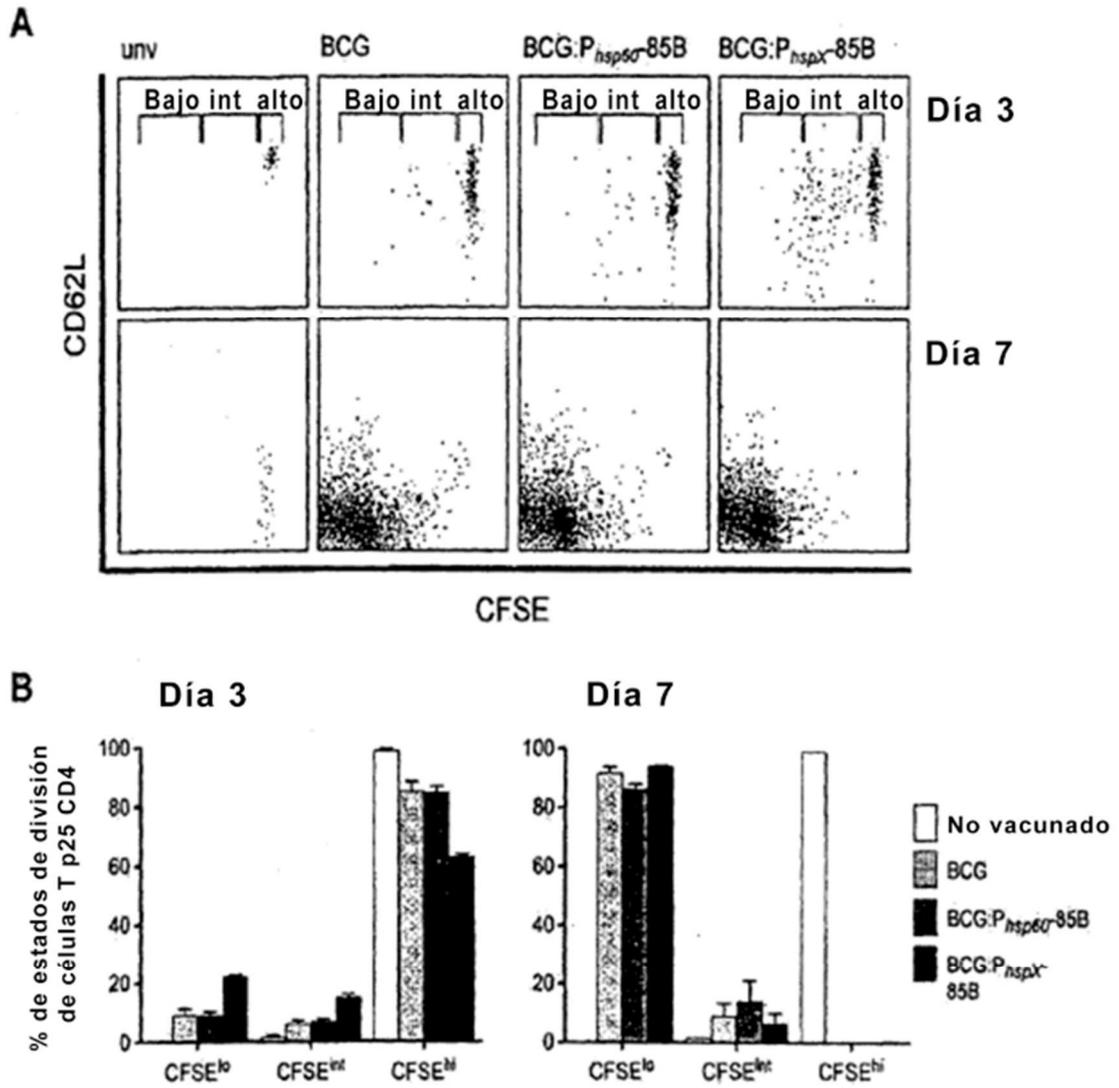


Figura 11

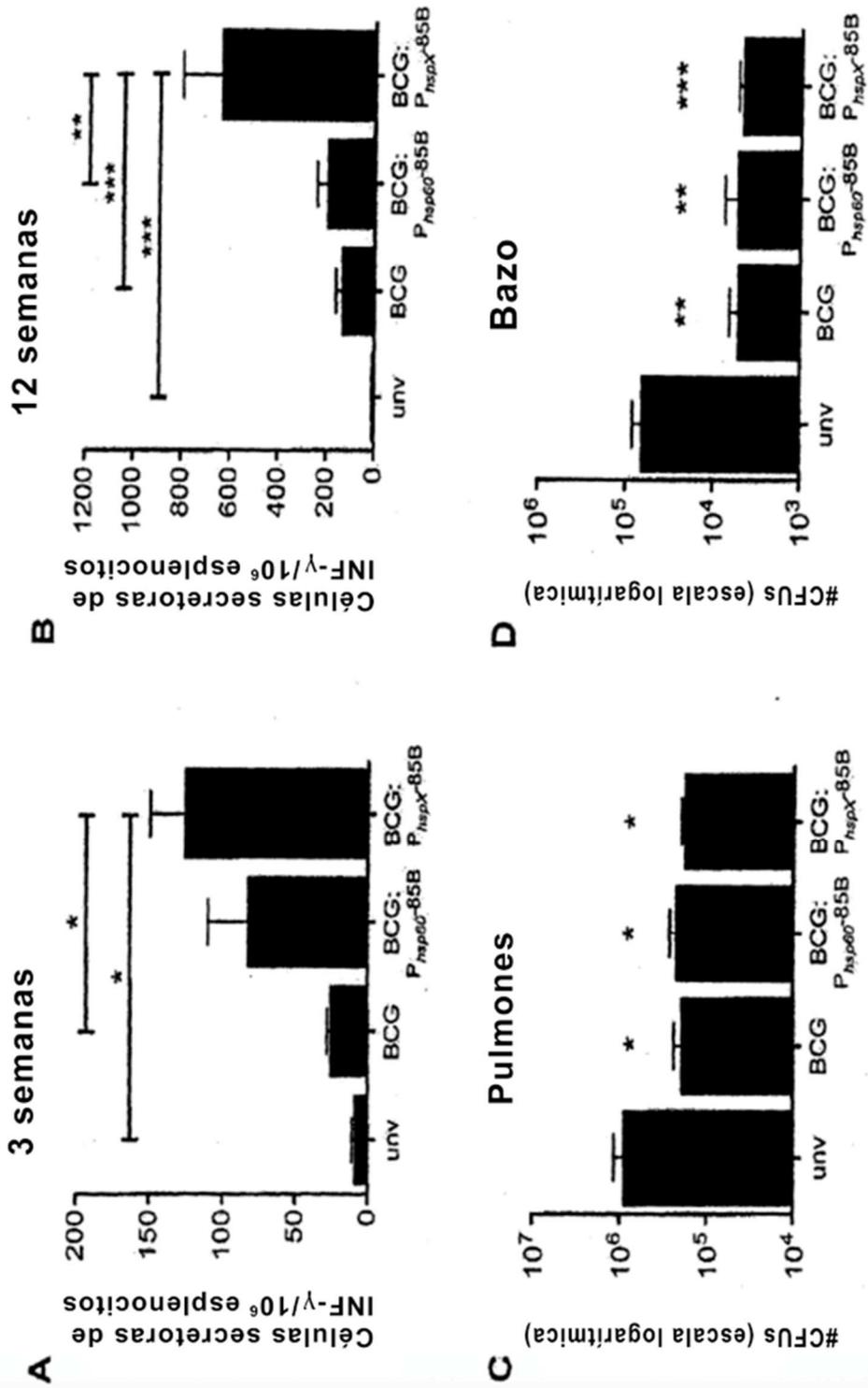
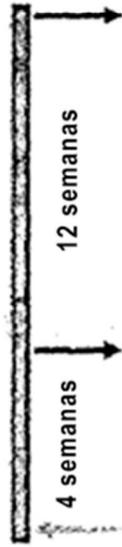


Figura 12

Inmunogenicidad de BCG-CYS



Ratones vacunados con rBCG(5×10^5 CFU) respuesta inmune: evocación de ELISPOT a Ags
 respuesta inmune: evocación de ELISPOT a Ags

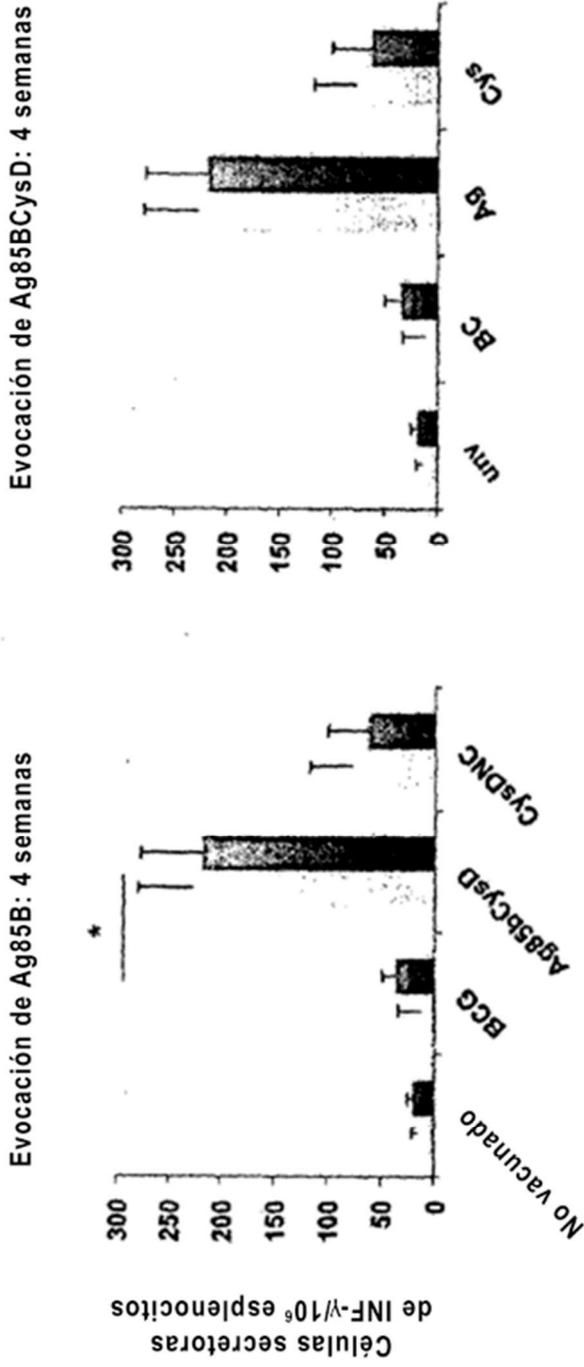


Figura 13

Inmunidad inducida por BCG:Ag85BCysD

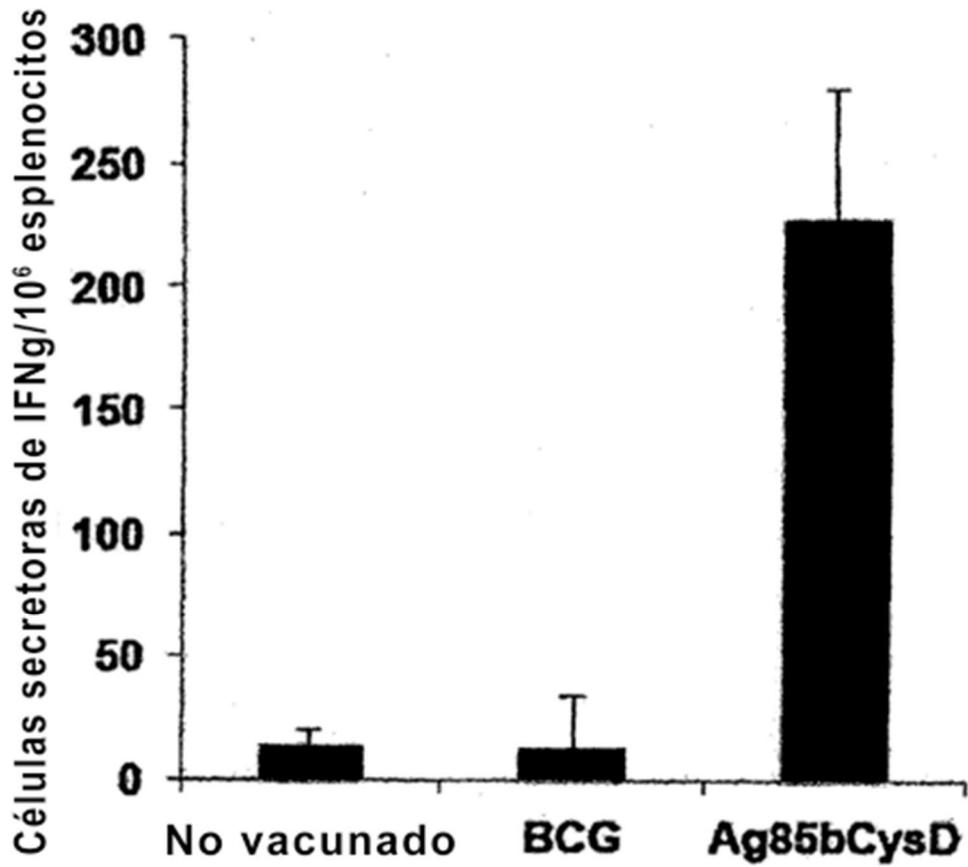


Figura 13 cont.

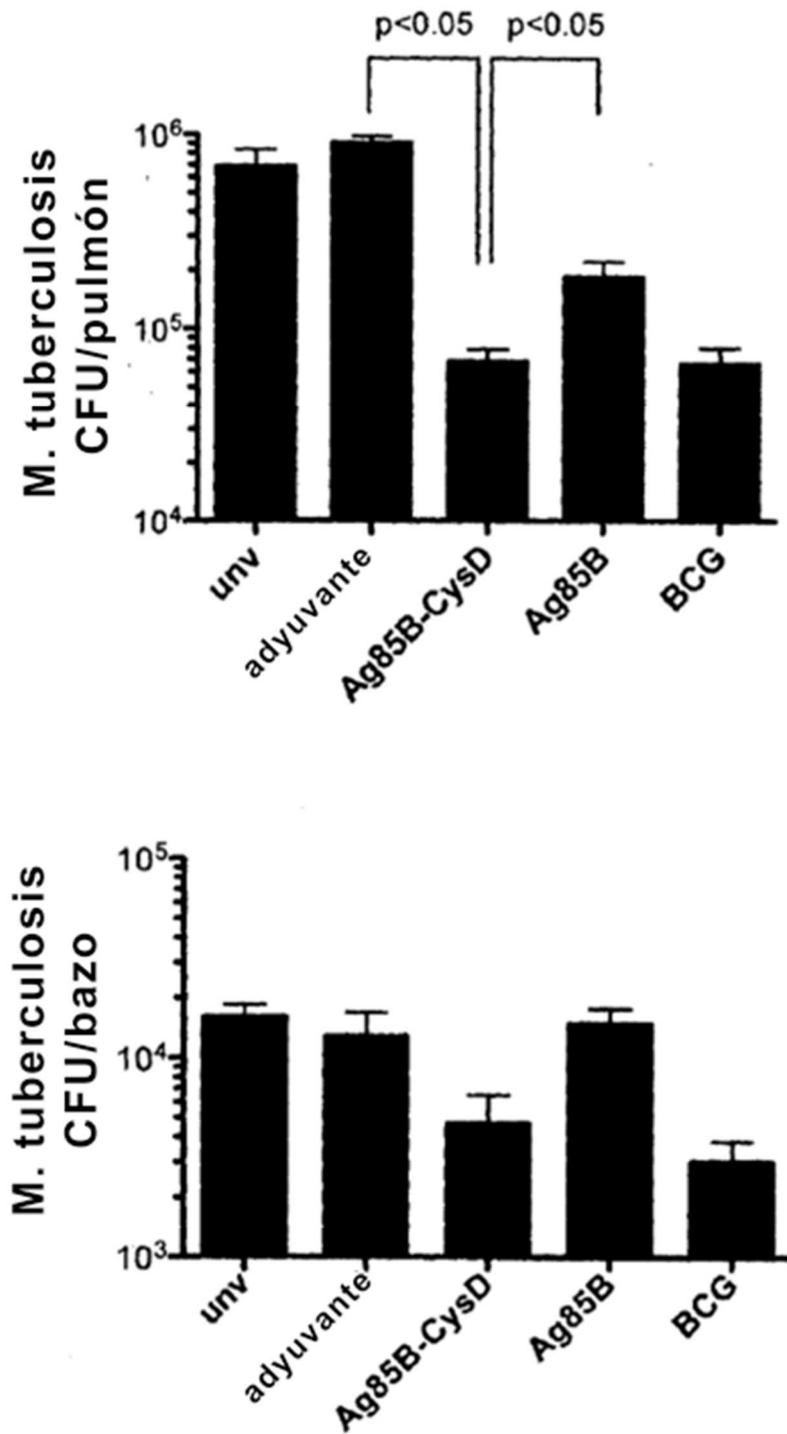


Figura 14