

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 383**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/04** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

**C07K 14/35** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2010 PCT/DK2010/000054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO10121618**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10766664 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2421557**

54 Título: **Vacuna TB contra la tuberculosis para impedir la reactivación**

30 Prioridad:

**24.04.2009 DK 200900539**

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

**28.05.2019**

73 Titular/es:

**STATENS SERUM INSTITUT (100.0%)  
Artillerivej 5  
2300 Copenhagen S , DK**

72 Inventor/es:

**DIETRICH, JES;  
ANDERSEN, PETER;  
LUNDBERG, CARINA, VINGSBO y  
HOANG, TRUC, THI, KIM, THAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 714 383 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

Vacuna TB contra la tuberculosis para impedir la reactivación

5 **Campo de la invención**

La presente invención da a conocer una vacuna que puede administrarse en individuos con infección latente para impedir la reactivación de la infección latente de tuberculosis causada por una especie del complejo tuberculosis de microorganismos (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*) utilizando como diana antígenos expresados constitutivamente, tales como ESAT6, CFP10 y otros antígenos del sistema de excreción ESX-1.

**Antecedentes generales**

15 La tuberculosis humana es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) es un problema sanitario global grave, responsable de aproximadamente 3 millones de muertes al año, según la OMS. La incidencia mundial de nuevos casos de tuberculosis (TB) ha caído durante la década de los 1960 y 1970, aunque durante las últimas décadas está tendencia ha cambiado marcadamente en parte debido a la aparición del SIDA y las cepas resistentes a múltiples fármacos de *M. tuberculosis*.

20 Los organismos del complejo tuberculosis pueden causar una diversidad de enfermedades, aunque la vía de invasión más común es mediante inhalación de las bacterias. Esto inicia una infección en el pulmón, que finalmente puede extenderse a otras partes del cuerpo. Normalmente, esta infección presenta un crecimiento restringido por el sistema inmunológico, por lo que la mayoría de individuos infectados muestra pocos indicios, aparte de la tos y la fiebre, que finalmente disminuye. Aproximadamente el 30% de los individuos no pueden contener la infección y desarrollan la enfermedad primaria, que en muchos casos finalmente demostrará ser fatal. Sin embargo, se cree que incluso aquellos individuos que aparentemente controlan la infección siguen infectados, probablemente durante el resto de su vida. Ciertamente los individuos que se han mantenido sanos durante años o incluso décadas pueden desarrollar súbitamente tuberculosis, que ha demostrado estar causada por el mismo organismo por el que fueron infectados hace muchos años anteriormente. *M. tuberculosis* y otros organismos del complejo TB son únicos en que las micobacterias pueden evitar la respuesta inmunológica y sobrevivir durante periodos prolongados de un estadio refractario no replicante o de replicación lenta. A esto se denomina TB latente y actualmente es un problema sanitario global muy significativo que se estima que afecta a aproximadamente 1/3 de la población mundial (Anon., 2001).

35 La única vacuna actualmente disponible para el uso clínico es la BCG, una vacuna cuya eficacia sigue siendo controvertida. Aunque la BCG funciona consistentemente bien en modelos animales de infección primaria, claramente no ha conseguido controlar la epidemia de TB. En coherencia con ello, la vacunación de BCG aparentemente proporciona protección frente a la TB pediátrica (que se debe a infección primaria), ofreciendo simultáneamente poca o ninguna protección frente a la enfermedad adulta (que con frecuencia es la reactivación de la infección latente adquirida en la infancia). También se ha demostrado que la vacunación de los individuos actualmente sensibilizados a micobacterias o con infección latente resulta ineficaz.

45 El curso de una infección por *M. tuberculosis* transcurre esencialmente en 3 fases, tal como se ilustra en la figura 1. Durante la etapa aguda, las bacterias proliferan en los órganos, hasta que la respuesta inmunológica se incrementa hasta el punto en que puede controlar la infección, después de lo cual la carga bacteriana alcanza un pico y empieza a declinar. Después de lo anterior, se establece una etapa latente en que la carga bacteriana se mantiene estable a un nivel bajo. En esta etapa actualmente se cree que *M. tuberculosis* pasa de la multiplicación activa a un estado de latencia, convirtiéndose esencialmente en no replicante y permaneciendo en el interior del granuloma.

50 Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto que incluso en el estadio de infección caracterizado por un número bacteriano constantemente bajo, por lo menos parte de la población bacteriana se mantiene en un estado de metabolismo activo (Talaat A.M. et al., 2007). Por lo tanto, estas bacterias sobreviven, mantienen un metabolismo activo y se replican frente a una fuerte respuesta inmunológica. Por lo tanto, en el individuo infectado existe un equilibrio entre las bacterias no replicantes (que puede resultar muy difícil de detectar por el sistema inmunológico, ya que se localizan intracelularmente) y las bacterias lentamente replicantes que presentan un perfil de expresión activo aunque modificado, en un intento de adaptación al medio hostil del huésped inmune. Las bacterias en este estadio típicamente no son la diana de la mayoría de las vacunas preventivas que actualmente se están desarrollando en el campo de la TB, tal como ejemplifica la falta de actividad al administrar vacunas preventivas clásicas en animales experimentales infectados latentemente (Turner, 2000).

60 En algunos casos, el equilibrio se inclina en favor del patógeno y la infección entra en la etapa de reactivación, en la que las bacterias empiezan a replicarse rápidamente y se incrementa el número de bacterias en el individuo infectado. Las bacterias que se replican en individuos infectados latentemente bajo una presión inmunológica muy fuerte son la diana para la estrategia de vacunación en la presente invención. Las bacterias en este estadio infectivo latente típicamente no son la diana de la mayoría de las vacunas preventivas que actualmente se están desarrollando en el campo de la TB, tal como ejemplifica la falta de actividad al administrar vacunas preventivas clásicas en animales experimentales infectados latentemente (Turner, 2000). Lo anterior no resulta inesperado, ya que actualmente es

conocido que una respuesta inmunológica fuerte del huésped resulta en la regulación negativa de muchos antígenos, tal como el antígeno de vacuna preventiva mayor Ag85 y PstS (Rogerson B.J. et al., 2006). Para Ag85B se ha demostrado que después de la infección se produce un incremento transitorio inicial de la expresión de Ag85B aunque ya dos semanas después de la infección, el nivel de expresión bacteriana de Ag85B ha caído de 0,3 transcritos por UFC de *M. tb.* durante el periodo del máximo a 0,02 transcritos por UFC, y este nivel bajo se mantiene por lo menos hasta 100 días después de la infección. De esta manera, en cualquier punto temporal después de la semana 2 de infección, menos de 2% de las bacterias expresan activamente Ag85B (*ibid.*). La baja expresión de Ag85B está soportada por una rápida caída del número de células T capaz de generar IFN- $\gamma$  en respuesta a Ag85B en el pulmón 3 semanas después de la infección o posteriormente.

En contraste, algunos antígenos se expresan más establemente (constitutivamente) durante todas las diferentes etapas de la infección y un ejemplo de ello es ESAT6. Tras la etapa inicial de infección, el nivel de expresión de ESAT-6 se estabiliza en 0,8 transcritos por UFC de *M. tuberculosis*. Éste es un nivel de transcripción mucho más elevado que para Ag85B y este nivel se mantiene establemente durante por lo menos 100 días después de la infección (Rogerson B.J. et al., 2006). Nuevamente los datos de transcripción están apoyados por datos inmunológicos que muestran un reconocimiento fuerte por parte de las células T de ESAT-6 en los estadios posteriores de infección en el sitio de la infección (*ibid.*). Este patrón de expresión constitutiva es una característica importante que ilustra que estas moléculas satisfacen funciones esenciales de crucial importancia para el patógeno, funciones que dependen de genes que necesitan expresarse constitutivamente para que el patógeno sobreviva en el huésped inmunológico. Estas moléculas son la base para la presente invención y son antígenos particularmente importantes para vacunas administradas en individuos con infección latente, ya que presentan como dianas todos los estadios del ciclo de vida bacteriano y, por lo tanto, presentan la base más amplia posible de actividad. Lo anterior es diferente del pensamiento actual, que se ha centrado en identificar los antígenos regulados positivamente por las micobacterias durante la persistencia no replicante (Andersen, P. 2007, WO02048391, WO04006952, Lin MY y Ottenhoff TH, 2008; Leyten EM. et al. 2006). Aunque tales antígenos se encuentran regulados positivamente durante la persistencia no replicante, pueden no encontrarse disponibles para el reconocimiento inmunológico, ya que las cantidades disponibles de las bacterias no replicantes son inferiores a un umbral razonable para la detección o para la inducción de funciones efectoras inmunológicas protectoras.

En contraste, varias proteínas del sistema de secreción de ESX-1 se ha demostrado que son altamente inmunogénicas y se expresan a niveles elevados. ESX-1 se encuentra conservado en varias micobacterias patogénicas e implicado en la virulencia de bacilos tuberculosos. La contribución de las proteínas ESX-1 individuales en la secreción de ESAT-6, CFP10 y EspA ha sido bien documentada (Pym A.S. et al., 2003; Guinn K.I. et al., 2004; Stanley, S.A. et al., 2003; Brodin, P. et al. 2006; MacGurn JA et al. 2005; Raghavan, S. et al. 2008) y la función de las moléculas efectoras se ha demostrado que es la lisis membranal, el escape del fagosoma y la expansión bacteriana (Gao L.Y. et al., 2004; Smith J. et al., 2008).

La naturaleza total de la respuesta inmunológica que controla la infección latente y los factores que conducen a la reactivación en gran medida se desconocen. Sin embargo, existe cierta evidencia de un desplazamiento en los tipos celulares dominantes responsables. Aunque las células T CD4 son esenciales y suficientes para el control de la infección durante la etapa aguda, los estudios sugieren que las respuestas de las células T CD8 son más importantes en la etapa latente (van Pinxteren L.A. et al., 2000).

Tal como apreciará fácilmente el experto en la materia, la expresión de un gen no resulta suficiente para convertirlo en un buen candidato a vacuna. La única manera de determinar si una proteína resulta reconocida por el sistema inmunológico durante la infección latente con *M. tuberculosis* es producir la proteína dada y someterla a ensayo en un ensayo apropiado tal como se indica en la presente memoria. A este respecto, el grupo de los presentes inventores ha demostrado que los antígenos expresados fuertemente por micobacterias, tales como ESAT-6 (por sus siglas en inglés, diana antigénica secretoria temprana-6), son reconocidas en individuos en todos los estadios de infección y, de hecho, en particular en individuos con infección latente (Boesen, Ravn y Doherty, 2002). Sin embargo, las células T específicas de ESAT-6 durante la infección natural son, aunque pueden encontrarse presentes en un gran número, prácticamente en exclusividad del fenotipo denominado efector, que son células T diferenciadas terminalmente con un periodo de vida muy limitado y de baja actividad como células T protectoras frente a enfermedades infecciosas (Seder R. et al., 2008). Lo anterior es marcadamente diferente de las denominadas células T polifuncionales de alta calidad que son estimuladas por la vacuna que se demuestra en el presente estudio que protege frente a la reactivación de la TB.

Es muy diferente de las proteínas altamente expresadas e inmunogénicas que resultan útiles como vacunas postexposición debido a que muchas provocan reacciones de hipersensibilidad y, de esta manera, agravan la situación. Esto se ha demostrado claramente en el ensayo clínico de vacuna original de la tuberculina de Koch. La vacuna se administró como vacuna postexposición en pacientes que sufrían de diferentes formas de la enfermedad, incluyendo TB cutánea y pulmonar. El ensayo fue totalmente fallido y varios de los pacientes incluidos murieron debido a reacciones severas de hipersensibilidad (Guttstadt, 1891). De los varios cientos de antígenos que es conocido que se expresan durante la infección primaria y sometidas a ensayo como vacunas, menos de media docena han demostrado un potencial significativo. Hasta el momento sólo se ha demostrado algún potencial como vacuna postexposición de un solo antígeno (Lowrie, 1999). Sin embargo, esta vacuna sólo funcionó si se administraba como vacuna de ADN, una técnica experimental hasta ahora no aprobada para el uso humano. Además, la técnica ha

demostrado ser controvertida, y otros grupos afirman que la vacunación mediante este protocolo induce protección no específica o incluso agrava la enfermedad (Turner, 2000).

El documento nº WO 2004/006952 A1 da a conocer una vacuna terapéutica contra la infección latente o activa de tuberculosis, que comprende un antígeno polipeptídico inducido bajo condiciones de poco oxígeno.

Henao-Tamayo et al., Tuberculosis 89:142-148, 2009, describe un estudio de vacunación postexposición en cobayas contra *Mycobacterium tuberculosis*. Se concluyó que la vacunación del presente estudio podía retrasar inicialmente el proceso de la enfermedad, aunque el efecto fue transitorio.

Por lo tanto, una estrategia de vacunación postexposición eficaz para proteger individuos infectados frente a la reactivación de la enfermedad resulta altamente deseable.

### Descripción resumida de la invención

La invención se refiere a tratar las infecciones causadas por especies del complejo tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) por una vacuna que puede administrarse en individuos con infección latente para evitar la reactivación de la infección latente de tuberculosis causada por especies de los microorganismos del complejo tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), al utilizar como diana antígenos expresados constitutivamente, tales como ESAT6 y CFP10. ESAT6 y CFP10 se requieren todas interdependientemente para la secreción y todos pertenecen al sistema de secreción ESX-1, que es conocido que resulta esencial para la virulencia. Estos antígenos secretados resultan cruciales para la diseminación bacteriana y lisis de las membranas celulares. ESAT6 Y CFP10 también son antígenos que se expresan constitutivamente en los diferentes estadios de la enfermedad, mientras que, p.ej., la expresión de Ag85 se regula negativamente poco después de la infección. Inesperadamente, los antígenos expresados constitutivamente inmunogénicos evitan la reactivación de la infección latente de tuberculosis al administrarlos como vacuna postexposición, manteniendo de esta manera la infección en estado latente.

### Exposición detallada de la invención

La invención da a conocer una vacuna o composición inmunogénica que se administra postexposición en individuos con infección latente, que evita la reactivación de la tuberculosis, que comprende un antígeno que se expresa constitutivamente durante la infección por *M. tuberculosis* o un ácido nucleico codificante de dicho antígeno.

La invención se refiere en particular a una vacuna para la utilización en el bloqueo de la reactivación de la tuberculosis en individuos con infección latente por *M. tuberculosis*, que comprende un antígeno que se expresa constitutivamente durante la infección por *M. tuberculosis* o un ácido nucleico codificante de dicho antígeno, en el que el antígeno, perteneciente al sistema de excreción ESX-1, se selecciona del grupo que consiste en:

- i) ESAT6, CFP10, Rv3614c, Rv3615c, EspR, Rv3868, Rv3869, Rv3870, Rv3871, Rv3872, Rv3873, Rv3876, Rv3877, Rv3878, Rv3879c, Rv3880c, Rv3881c, Rv3882c, Rv3883c y Rv3865,
- ii) una parte inmunogénica que comprende un epítipo de una célula B o célula T de cualquiera de las secuencias en (i), y
- iii) un análogo de secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a cualquiera de las secuencias en (i) o (ii) y siendo simultáneamente inmunogénica mediante el bloqueo de la reactivación de la infección latente de tuberculosis al administrarla como vacuna terapéutica.

Preferentemente, la composición comprende antígenos expresados constitutivamente, pertenecientes al sistema de excreción ESX-1, ESAT6, CFP10, Rv3614c, Rv3615c, EspR, Rv3868, Rv3869, Rv3870, Rv3871, Rv3872, Rv3873, Rv3876, Rv3877, Rv3878, Rv3879c, Rv3880c, Rv3881c, Rv3882c, Rv3883c, Rv3865c o una parte inmunogénica, p.ej., un epítipo de célula T, de cualquiera de dichas secuencias o un análogo de secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a cualquiera de las secuencias, siendo simultáneamente inmunogénico.

En la presente memoria se describe además una composición que comprende una mezcla de partes inmunogénicas preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en la SEC ID nº 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31.

Otra realización de la invención es una composición en la que dichos polipéptidos se fusionan con un antígeno expresado por bacterias dentro de la familia de las micobacterias, preferentemente en donde la pareja de fusión es un antígeno que se expresa constitutivamente. Una proteína de fusión preferente comprende ESAT6 fusionado con CFP10.

La composición según la invención preferentemente comprende un sistema de administración adicional seleccionado de vacunas recombinantes vivas, es decir, organismos genéticamente modificados, tales como bacterias o virus que expresan genes micobacterianos, o sistemas de administración inmunogénicos, tales como vacunas de ADN, que son

plásmidos que expresan genes o fragmentos génicos para las proteínas indicadas anteriormente, o vacunas de proteínas, es decir, las proteínas mismas o péptidos sintéticos derivados de las proteínas mismas administradas en un sistema de administración, tal como un adyuvante. El adyuvante preferentemente se selecciona del grupo que consiste en bromuro de dimetildiocta-decilamonio (DDA), Quil A, poli I:C, hidróxido de aluminio, adyuvante incompleto de Freund, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), dibehenato de trehalosa y dipéptido muramilo (DPM), todavía más preferentemente un adyuvante que estimula una respuesta de células T polifuncionales, tales como DDA/TDB y IC31.

El adyuvante más preferente comprende DDA/TDB y/o poli I:C. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos se lipida de manera que produzca un efecto autoadyuvante del polipéptido.

La invención da a conocer además antígenos descritos anteriormente para la utilización en el tratamiento de la tuberculosis latente y el bloqueo de la reactivación de la infección.

Un método se da a conocer además para tratar un animal, incluyendo un ser humano, contra la reactivación de la infección de tuberculosis causado por micobacterias virulentas, p.ej., por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* o *Mycobacterium bovis*, que comprende administrar en el animal la vacuna o composición inmunogénica indicada anteriormente, en el que dicha vacuna o composición inmunogénica se administra postinfección, tal como durante o después de la infección de estadio agudo y/o durante la infección de estadio latente.

El método puede comprender una etapa de identificación de un sujeto con infección latente con una micobacteria virulenta, p.ej., mediante un procedimiento diagnóstico, tal como la prueba cutánea de tuberculina de Mantoux (TST), el ensayo QuantiFERON, la detección in vitro de respuestas a HBHA o la detección de IP10 tras la estimulación con un antígeno expresado constitutivamente.

Se da a conocer además la utilización de un antígeno indicado anteriormente para la fabricación de una vacuna postexposición o composición inmunogénica contra la reactivación de infecciones latentes causadas por especies del complejo tuberculosis, p.ej., *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*, en el que dicha vacuna o composición inmunogénica es para la administración postinfección, tal como durante o después de la infección de estadio aguda y/o durante el estadio latente, que comprende una o más partes inmunogénicas indicadas anteriormente.

El éxito de *Mycobacterium* como patógeno se debe al modo complejo en que interactúa con su huésped: un proceso controlado en parte por el sistema bacteriano especializado de secreción de proteínas ESX-1. El sistema ESX-1 administra proteínas bacterianas (p.ej., ESAT-6, CFP10 y EspA) en células huésped y resulta crucial para la virulencia. Tras ser secretada a partir de los bacilos, la proteína ESAT-6 forma poros en la membrana fagosómica, permitiendo que los bacilos escapen al interior del citosol desde su confinamiento en el fagosoma y facilita de esta manera la expansión célula a célula.

Este patrón de expresión constitutiva es una característica importante que ilustra que estas moléculas satisfacen funciones esenciales de crucial importancia para el patógeno, funciones que dependen de genes que necesitan expresarse constitutivamente para que el patógeno sobreviva en el huésped inmunológico. Estas moléculas son la base para la presente invención y son antígenos particularmente importantes para vacunas administradas en individuos con infección latente, ya que presentan como dianas todos los estadios del ciclo de vida bacteriano y, por lo tanto, presentan la base más amplia posible de actividad.

ESAT6, CFP10 y EspA resultan necesarios interdependientemente para la secreción y todos pertenecen al sistema de secreción ESX-1, que es conocido que resulta esencial para la virulencia. Estos antígenos secretados resultan cruciales para la diseminación bacteriana y lisis de las membranas celulares. ESAT6, CFP10 y EspA también son antígenos que se expresan constitutivamente en los diferentes estadios de la enfermedad, mientras que, p.ej., la expresión de Ag85 se regula negativamente poco después de la infección. Los antígenos expresados constitutivamente inmunogénicos evitan la reactivación de la infección latente de tuberculosis al administrarlos como vacuna terapéutica, manteniendo de esta manera la infección en estado latente.

#### Definiciones

##### *Células T polifuncionales*

La expresión células T polifuncionales se refiere a células T que expresan simultáneamente la totalidad de las citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-2, y TNF- $\alpha$ , o IL-2 más por lo menos una de las dos otras citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

##### *Polipéptidos*

El término "polipéptido" en la presente invención presenta su significado habitual. Es decir, una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo una proteína de longitud completa, oligopéptidos, péptidos cortos y fragmentos de los mismos, en la que los residuos aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes.

El polipéptido puede modificarse químicamente mediante glucosilación, lipidación (p.ej., mediante lipidación química con palmitoiloxi succinimida, tal como indican Mowat et al., 1991 o con cloruro de dodecanoilo, tal como indican Lustig et al., 1976), comprendiendo grupos prostéticos, o al contener aminoácidos adicionales, tales como, p.ej., una etiqueta de His o un péptido de señal.

Cada polipéptido puede, de esta manera, caracterizarse por aminoácidos específicos y estar codificado por secuencias de ácido nucleico específicas. Se entenderá que entre tales secuencias se incluyen análogos y variantes producidos mediante métodos recombinantes o sintéticos, en las que tales secuencias polipeptídicas han sido modificadas mediante sustitución, inserción, adición o delección de uno o más residuos aminoácidos en el polipéptido recombinante y todavía ser inmunogénicas en cualquiera de los ensayos biológicos descritos en la presente memoria. Las sustituciones preferentemente son "conservadoras". Se definen de acuerdo con la tabla a continuación. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse entre sí. Los aminoácidos en la tercera columna se indican en código de una letra.

ALIFÁTICOS	No polares	GAP
		ILV
	Polares no cargados	CSTM
		NQ
	Polares-cargados	DE
		KR
Aromático		HFVY

Un polipéptido preferente en la presente invención es un antígeno inmunogénico de *M. tuberculosis* producido al someter el organismo a las tensiones asociadas a la infección latente. Dicho antígeno también puede derivarse, por ejemplo, de las células de *M. tuberculosis* y/o el filtrado del cultivo de *M. tuberculosis*. De esta manera, un polipéptido que comprende una parte inmunogénica de uno de los antígenos anteriormente indicados puede consistir enteramente de la parte inmunogénica, o puede contener secuencias adicionales. Las secuencias adicionales pueden derivarse del antígeno nativo de *m. tuberculosis* o ser heterólogas y tales secuencias pueden ser inmunogénicas, aunque ello no resulta necesario.

Cada polipéptido está codificado por una secuencia específica de ácido nucleico. Se entenderá que entre tales secuencias se incluyen análogos y variantes de las mismas, en las que tales secuencias de ácido nucleico han sido modificadas por sustitución, inserción, adición o delección de uno o más ácidos nucleicos. Las sustituciones preferentemente son sustituciones silenciosas en el uso de codones que no conducirá a ningún cambio en la secuencia de aminoácidos, pero pueden introducirse para potenciar la expresión de la proteína.

En el presente contexto, la expresión "fragmento polipeptídico sustancialmente puro" se refiere a una preparación de polipéptidos que contiene como máximo 5% en peso de otro material polipeptídico con el que se encuentra nativamente asociado (resultan preferentes porcentajes inferiores de otro material polipeptídico, p.ej. Como máximo 4%, como máximo 3%, como máximo 2%, como máximo 1% y como máximo 1/2%). Resulta preferente que el polipéptido sustancialmente puro sea por lo menos 96% puro, es decir, que el polipéptido constituya por lo menos 96% en peso del material polipeptídico total presente en la preparación y resultan preferentes porcentajes más altos, tales como por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%, por lo menos 99,2%, por lo menos 99,5% y por lo menos 99,75%. Resulta especialmente preferente que el fragmento polipeptídico se encuentra en "forma esencialmente pura", es decir, que el fragmento polipeptídico se encuentra esencialmente libre de cualquier otro antígeno con el que se encuentra asociado nativamente, es decir, libre de cualquier otro antígeno procedente de bacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis o una micobacteria virulenta. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la preparación del fragmento polipeptídico mediante métodos recombinantes en una célula huésped no micobacteriana, tal como se escribe en detalle posteriormente, o mediante la síntesis del fragmento polipeptídico mediante métodos bien conocidos de síntesis peptídica en fase sólida o líquida, p.ej., mediante el método descrito por Merrifield o variaciones del mismo. Para el propósito de la presente invención, se entenderá que la definición anterior de "polipéptido o fragmento polipeptídico sustancialmente puro" no excluye tales polipéptidos o fragmentos polipeptídicos en caso de hallarse presentes en combinación con otros antígenos purificados o sintéticos de origen micobacteriano o no micobacteriano.

Por la expresión "micobacteria virulenta" se entiende que una bacteria capaz de causar la enfermedad tuberculosa en un animal o en un ser humano. Entre los ejemplos de micobacterias virulentas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis*. Son ejemplos de animales relevantes, vacas, comadreas, tejonos y canguros.

Por "un individuo infectado" se entiende un individuo con una infección demostrada por cultivo o microscopía por micobacterias virulentas y/o un individuo diagnosticado clínicamente con TB y que es responsable de la quimioterapia anti-TB. El cultivo, la microscopía y el diagnóstico clínico de la TB son bien conocidos por cualquier experto en la materia.

Por la expresión "individuo positivo para DPP" se entiende un individuo con una prueba de Mantoux positiva o un individuo en que el DPP (derivado de proteína purificada) induce una respuesta de recuerdo in vitro positiva determinada por la liberación de IFN- $\gamma$ .

Por la expresión "individuo con infección latente" se entiende un individuo que ha sido infectado por una micobacteria virulenta, p.ej., *M. tuberculosis*, pero no muestra ningún indicio de tuberculosis activa. Es probable que los individuos que han sido vacunados, p.ej. por BCG, o tratados para TB, todavía retengan las micobacterias dentro de sus cuerpos, aunque ello actualmente resulta imposible de demostrar ya que tales individuos se esperaría que fuesen positivos si se sometieran a ensayo para reactividad de DPP Sin embargo, en su sentido más exacto, "con infección latente" puede utilizarse para describir cualquier individuo que presenta *M. tuberculosis* que reside en sus tejidos pero que no se encuentra clínicamente enfermo. Un individuo con infección latente puede identificarse mediante varios métodos en uso clínico actualmente, tales como la prueba cutánea de la tuberculina de Mantoux (TST), el ensayo QuantiFERON y en el futuro podrían existir medios todavía más sensibles de diagnóstico de este estadio particular de la infección, tales como la detección in vitro recientemente sugerida de respuestas a HBHA (Hougardy, 2007) o la detección de IP10 tras la estimulación in vitro con ESAT6 (Ruhwald, 2008).

Por el término "reactivación" se entiende la situación en que el equilibrio entre bacterias no replicantes (que pueden resultar muy difíciles de detectar por el sistema inmunológico, ya que se localizan intracelularmente) y bacterias en replicación lenta, que presentan un perfil de expresión activo aunque modificado en un intento por adaptarse al medio hostil en el que se encuentran en el huésped inmunológico, se inclina en favor del patógeno y la infección entra en la etapa en que las bacterias nuevamente empiezan a replicarse rápidamente y el número de bacterias en el individuo infectado se incrementa. Las bacterias que se replican en individuos con infección latente bajo una presión inmunológica muy fuerte son la diana para la estrategia de vacunación en la presente invención.

Por el término "IFN- $\gamma$ " se entiende interferón-gamma. La medición de IFN- $\gamma$  se utiliza como indicación de una respuesta inmunológica.

Por las expresiones "fragmento de ácido nucleico" y "secuencia de ácido nucleico" se entiende cualquier molécula de ácido nucleico que incluye ADN, ARN, ANB (ácidos nucleicos bloqueados), APN, ARN, ARNdc e híbridos de ARN-ADN. Se incluyen además moléculas de ácidos nucleicos que comprenden nucleósidos no naturales. La expresión incluye moléculas de ácidos nucleicos de cualquier longitud, p.ej., de 10 a 10.000 nucleótidos, dependiendo de la utilización. En el caso de que la molécula de ácidos nucleicos esté destinada a la utilización como farmacéutico, p.ej., en la terapia de ADN, o para la utilización en un método para producir un polipéptido según la invención, preferentemente se utiliza una molécula codificante de por lo menos un epítipo, con una longitud de aproximadamente 18 a aproximadamente 1.000 nucleótidos, insertando opcionalmente la molécula en un vector.

A lo largo de la presente especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, el término "comprende", o variaciones del mismo, tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o grupo de números enteros indicado, aunque sin excluir ningún otro número entero o grupo de elementos o números enteros.

Los genes expresados constitutivamente se definen como genes que, después de un análisis detallado del ARNm a nivel poblacional, se expresan igualmente bien in vivo en el pulmón en puntos temporales posteriores a las tres semanas postinfección, tras correlacionarse con el número de UFC de *M. tb.* en el pulmón. A partir de dicha definición se infiere que un gen constitutivo puede expresarse diferencialmente en un único nivel bacteriano. El método para cuantificar la expresión génica es la PCR cuantitativa. La expresión "igualmente bien" se define como dentro de +/- 5 veces el nivel de la medición anterior. La comparación en todos los casos es respecto al punto temporal inmediatamente anterior al presente. El tiempo entre mediciones no puede ser mayor que el tiempo entre la infección y la medición anterior. P.ej., en el caso de que la expresión de un gen se mida en una primera ocasión en la semana 3 postinfección, la segunda medición no puede realizarse después de 6 semanas postinfección y la tercera, 12 semanas postinfección, etc.

Los antígenos expresados constitutivamente son polipéptidos o partes de estos polipéptidos que son productos de genes expresados constitutivamente.

#### *Identidad de secuencias*

La expresión "identidad de secuencias" indica una medición cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos de igual longitud o entre dos secuencias de nucleótidos de longitud igual. Las dos secuencias que deben compararse deben alinearse hasta el mejor ajuste posible, permitiendo la inserción de huecos o, alternativamente, el truncado en los extremos de las secuencias de las proteínas. La identidad de las secuencias puede calcularse como:

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

5 en la que  $N_{dif}$  es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias tras alinearlas y en la que  $N_{ref}$  es el número de residuos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC presentará una identidad de secuencia de 75% respecto a la secuencia AATCAATC ( $N_{dif}=2$  y  $N_{ref}=8$ ). Un hueco se cuenta como no identidad del residuo o residuos específicos, es decir, la secuencia de ADN AGTGTC presentará una identidad de secuencia de 75% respecto a la secuencia de ADN AGTCAGTC ( $N_{dif}=2$  y  $N_{ref}=8$ ). La identidad de secuencia puede calcularse  
10 alternativamente con el programa BLAST, p.ej., el programa BLASTP (Pearson, 1988, o [www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)). En un aspecto de la invención, la alineación se lleva a cabo con el método de alineación de secuencias ClustalW con parámetros por defecto tal como indican Thompson J. et al., 1994, disponible en <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>.

15 Un porcentaje mínimo preferente de identidad de secuencia es de por lo menos 80%, tal como de por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%, y por lo menos 99,5%.

#### *Parte inmunogénica*

20 En una realización preferente de la invención, el polipéptido comprende una parte inmunogénica del polipéptido, tal como un epítipo para una célula B o célula T.

La parte inmunogénica de un polipéptido es una parte del polipéptido que induce una respuesta inmunológica en un animal o en un ser humano, y/o en una muestra biológica determinada mediante cualquiera de los ensayos biológicos indicados en la presente memoria. La parte inmunogénica de un polipéptido puede ser un epítipo de célula T o un  
25 epítipo de célula B. Las partes inmunogénicas pueden relacionarse con una o unas pocas partes relativamente pequeñas del polipéptido; pueden encontrarse dispersas en toda la secuencia polipeptídica o situarse en partes específicas del polipéptido. Para unos cuantos polipéptidos, se ha demostrado que los epítopos se encuentran dispersos en todo el polipéptido cubriendo la secuencia completa (Rawn et al., 1999). Con el fin de identificar los epítopos de células T relevantes que son reconocidos durante una respuesta inmunológica, resulta posible utilizar oligopéptidos solapantes para la detección de epítopos del CMH de clase II, preferentemente sintéticos, con una  
30 longitud de, p.ej., 20 residuos aminoácidos derivados del polipéptido. Estos péptidos pueden someterse a ensayo en ensayos biológicos (p.ej., el ensayo de IFN- $\gamma$  tal como se indica en la presente memoria) y algunos de ellos proporcionará una respuesta positiva (y, de esta manera, ser inmunogénica) como evidencia de la presencia de un epítipo de célula T en el péptido. Para ESAT-6 y CFP10, tales estudios han demostrado que todas las partes del antígeno contienen epítopos de células T (Mustafa et al., 2000; Arend S.M. et al., 2000). Para la detección de epítopos del CMH de clase I resulta posible predecir los péptidos que se unirán (Stryhn et al., 1996) y seguidamente producir estos péptidos sintéticamente y someterlas a ensayo en ensayos biológicos relevantes, p.ej., el ensayo de IFN- $\gamma$  tal como se describe en la presente memoria. Los péptidos que preferentemente presentan una longitud de, p.ej., 8 a 11  
35 residuos aminoácidos derivados del polipéptido. Pueden determinarse los epítopos de célula B mediante el análisis del reconocimiento por células B de péptidos solapantes que cubren el polipéptido de interés, tal como describen, p.ej., Harboe et al., 1998. En consistencia con esta definición, puede identificarse una parte inmunogénica de un polipéptido tal como se describe en la presente memoria como parte que induce una respuesta inmunológica, ver la definición de "respuesta inmunológica" posteriormente en la presente memoria.

45 Aunque la longitud mínima de un epítipo de célula T se ha demostrado que es de por lo menos 6 aminoácidos, resulta normal que tales epítopos estén constituidos de tramos más largos de aminoácidos. Por lo tanto, resulta preferente que el fragmento polipeptídico de la invención presente una longitud de por lo menos 7 residuos aminoácidos, tales como por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 12, por lo menos 14, por lo menos 16, por lo menos 18, por lo menos 20, por lo menos 22, por lo menos 24 y por lo menos 30 residuos aminoácidos. Por lo tanto, en realizaciones importantes del método inventivo, resulta preferente que el fragmento de polipéptido presente una  
50 longitud de como máximo 50 residuos aminoácidos, tal como, como máximo, 40, 35, 30, 25 y 20 residuos aminoácidos. Se espera que los péptidos con una longitud de entre 10 y 20 residuos aminoácidos demostrarán ser más eficientes como epítopos del CMH de clase II y, por lo tanto, las longitudes especialmente preferentes del fragmento polipeptídico utilizado en el método inventivo son 18, tal como 15, 14, 13, 12 e incluso 11 residuos aminoácidos. Se espera que los péptidos con una longitud de entre 7 y 12 residuos aminoácidos demostrarán ser más eficientes como epítopos del CMH de clase I y, por lo tanto, las longitudes especialmente preferentes del fragmento polipeptídico utilizado en el  
55 método inventivo son 11, tal como 10, 9, 8 e incluso 7 residuos aminoácidos.

60 Las partes inmunogénicas de los polipéptidos pueden ser reconocidas por una amplia parte (frecuencia alta) o por una parte menor (frecuencia baja) de la población humana genéticamente heterogénea. Además, algunas partes inmunogénicas inducen respuestas inmunológicas elevadas (dominantes), mientras que otras inducen respuestas más bajas, aunque significativas (subdominantes). La frecuencia elevada > frecuencia baja puede relacionarse con la parte inmunogénica de unión a moléculas de CMH ampliamente distribuidas (tipo HLA) o incluso por múltiples moléculas del CMH (Sinigaglia, 1988; Kilgus, 1991).

En el contexto de proporcionar moléculas candidatas para una nueva vacuna contra la tuberculosis, los epítomos subdominantes son, sin embargo, tan relevantes como los epítomos dominantes, ya que se ha demostrado (Olsen, 2000) que tales epítomos pueden inducir protección con independencia del hecho de que no resultan tan fuertemente o ampliamente reconocidos.

#### *Variantes*

Una característica común de los polipéptidos de la invención es su capacidad de inducir una respuesta inmunológica, tal como se ilustra en los ejemplos. Se entiende que una variante de un polipéptido de la invención producida mediante sustitución, inserción, adición o delección también puede ser inmunogénica, según se determine mediante cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria.

#### *Individuo inmune*

Un individuo inmune se define como una persona o un animal, que ha eliminado o controlado una infección por micobacterias virulentas o que ha recibido una vacunación profiláctica, tal como la vacunación con *M. bovis* BCG.

#### *Respuesta inmunológica*

La respuesta inmunológica puede monitorizarse mediante uno de los métodos siguientes:

- una respuesta celular in vitro se determina mediante la inducción de la liberación de una citoquina relevante, tal como IFN- $\gamma$ , o la inducción de la proliferación de los linfocitos extraídos de un animal o ser humano actualmente o previamente infectado por micobacterias virulentas o inmunizados con el polipéptido relevante. La inducción se lleva a cabo mediante la adición del polipéptido o la parte inmunogénica del polipéptido a una suspensión que comprende entre  $2 \times 10^5$  células y  $4 \times 10^5$  células por pocillo. Las células que se aíslan de sangre, bazo, hígado o pulmón y la adición del polipéptido o la parte inmunogénica, resultando en una concentración no superior a 20  $\mu\text{g}$  por ml de suspensión y llevando a cabo la estimulación durante dos a cinco días. Para la monitorización de la proliferación celular, las células se pulsan con timidina marcada radioactivamente y después de 16 a 22 horas de incubación, se detecta la proliferación mediante recuento de centelleo líquido. Se define una respuesta positiva como una respuesta superior al fondo más dos desviaciones estándar. La liberación de IFN- $\gamma$  puede determinarse mediante el método de ELISA, que es bien conocido por un experto en la materia. Se define una respuesta positiva como una respuesta superior al fondo más dos desviaciones estándar. Otras citoquinas diferentes de IFN- $\gamma$  podrían ser relevantes al monitorizar la respuesta inmunológica contra el polipéptido, tal como IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6 y TGF- $\beta$ . Otro método más sensible para detectar la respuesta inmunológica es el método ELISpot, en el que se determina la frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$ . En una placa de ELISpot (MAHA, Millipore) prerrecubierta con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  murinos (PharMingen) se incubaba una gradación de número de células aisladas de sangre, bazo o pulmón (típicamente entre 1 y  $4 \times 10^5$  células/pocillo) durante 24 a 32 horas en presencia del polipéptido o la parte inmunogénica, resultando en una concentración no superior a 20  $\mu\text{g}$  por ml. A continuación, las placas se incuban con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  biotinilados, seguido de la incubación con estreptavidina-fosfatasa alcalina. Las células productoras de IFN- $\gamma$  se identifican mediante la adición de BCIP-NBT (Sigma), dando lugar el sustrato relevante a manchas. Estas manchas pueden enumerarse utilizando un microscopio de disección. También resulta posible determinar la presencia de ARNm codificante de la citoquina relevante, mediante la utilización de la técnica de PCR. Habitualmente se mide una o más citoquinas utilizando, por ejemplo, PCR, ELISPOT o ELISA. El experto en la materia apreciará que puede utilizarse un incremento o reducción significativo de la cantidad de cualquiera de dichas citoquinas inducidas por un polipéptido específico, en la evaluación de la actividad inmunológica del polipéptido.
- También puede determinarse una respuesta celular in vitro mediante la utilización de líneas de células T derivadas de un individuo inmune o de una persona infectada por *M. tuberculosis*, en donde las líneas de células T se han regulado con micobacterias vivas, extractos de las células bacterianas o filtrados de cultivo durante 10 a 20 días con la adición de IL-2. La inducción se lleva a cabo mediante la adición de no más de 20  $\mu\text{g}$  de polipéptido por ml de suspensión a las líneas de células T que contienen entre  $1 \times 10^5$  células y  $3 \times 10^5$  células por pocillo y llevando a cabo la incubación durante dos a seis días. La inducción de IFN- $\gamma$  o liberación de otra citoquina relevante se detecta mediante ELISA. La estimulación de las células T también puede monitorizarse mediante la detección de la proliferación celular utilizando timidina marcada radioactivamente tal como se ha indicado anteriormente. Para ambos ensayos se define una respuesta positiva como una respuesta superior al fondo más dos desviaciones estándar.
- Puede determinarse una respuesta celular in vivo como una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) positiva tras la inyección intradérmica o la aplicación local de un parche de como máximo 100  $\mu\text{g}$  del polipéptido o la parte inmunogénica en un individuo que se encuentra clínica o subclínicamente infectado con una micobacteria virulenta, presentando una respuesta positiva un diámetro de por lo menos 5 mm 72 a 96 horas después de la inyección o aplicación.
- Se determina una respuesta humoral in vitro por una respuesta específica de anticuerpos en un individuo inmune o infectado. La presencia de anticuerpos puede determinarse mediante una técnica de ELISA o una transferencia

western en la que el polipéptido o la parte inmunogénica se adsorbe a una membrana de nitrocelulosa o a una superficie de poliestireno. El suero preferentemente se diluye en PBS de 1:10 a 1:100 y se añade al polipéptido adsorbido y se lleva a cabo la incubación durante 1 a 12 horas. Mediante la utilización de anticuerpos secundarios marcados, puede determinarse la presencia de anticuerpos específicos mediante la medición de la DO, p.ej., mediante ELISA, en donde una respuesta positiva es una respuesta superior al fondo más dos desviaciones estándares o, alternativamente, una respuesta visual en una transferencia western.

- Otro parámetro relevante es la medición de la protección en modelos animales inducida tras la vacunación con el polipéptido en un adyuvante o después de la vacunación de ADN. Entre los modelos animales adecuados se incluyen primates, cobayas o ratones, que se retan con una infección de una micobacteria virulenta. La lectura para la protección inducida podría ser una reducción de la carga bacteriana en órganos diana en comparación con animales no vacunados, tiempos de supervivencia prolongados en comparación con los animales no vacunados y una menor pérdida de peso en comparación con los animales no vacunados.

#### Métodos de preparación

En general, los antígenos de *M. tuberculosis* y las secuencias de ADN codificantes de tales antígenos, pueden prepararse utilizando cualquiera de entre una diversidad de procedimientos. Pueden purificarse como proteínas nativas a partir de células de *M. tuberculosis* o filtrado de cultivo, mediante procedimientos tales como los indicados anteriormente. También pueden producirse los antígenos inmunogénicos recombinantemente, utilizando una secuencia de ADN codificante del antígeno, que ha sido insertada en un vector de expresión y expresada en un huésped apropiado. Son ejemplos de células huésped, *E. coli*. Los polipéptidos o parte inmunogénica de los mismos también pueden producirse sintéticamente, presentando menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de 50 aminoácidos, y pueden generarse utilizando técnicas bien conocidas por el experto ordinario en la materia, tal como técnicas de fase sólida disponibles comercialmente, en las que se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena de aminoácidos en crecimiento.

En la construcción y preparación de ADN plasmídico codificante del polipéptido tal como se define para la vacunación de ADN, puede utilizarse una cepa huésped tal como *E. coli*. a continuación, el ADN plasmídico puede prepararse a partir de cultivos de la cepa huésped portadora del plásmido de interés, y purificarse utilizando, p.ej., el kit de columna de Qiagen Giga-Plasmid (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA), incluyendo una etapa de eliminación de endotoxinas. Resulta preferente que el ADN plasmídico utilizado para la vacunación de ADN se encuentre libre de endotoxinas.

#### Proteínas de fusión

Los polipéptidos inmunogénicos también pueden producirse como proteínas de fusión, métodos mediante los cuales pueden conseguirse características superiores del polipéptido de la invención. Por ejemplo, parejas de fusión que facilitan la exportación del polipéptido en el caso de que se produzca recombinantemente; parejas de fusión que facilitan la purificación del polipéptido, y parejas de fusión que potencian la inmunogenicidad del fragmento polipeptídico de la invención, son todas posibilidades interesantes. Por lo tanto, la invención se refiere además a un polipéptido de fusión que comprende por lo menos un polipéptido o parte inmunogénica definida anteriormente y por lo menos una pareja de fusión. La pareja de fusión puede ser, para potenciar la inmunogenicidad, otro polipéptido derivado de *M. tuberculosis*, tal como un fragmento polipeptídico derivado de una bacteria perteneciente al complejo de la tuberculosis, tal como ESAT-6, CFP10, TB10.4, RD1-ORF5, RD1-ORF2, Rv1036, MPB64, MPT64, Ag85A, Ag85B (MPT59), MPB59, Ag85C, lipoproteína de 19kDa, MPT32 y alfa-cristalina, o por lo menos un epítipo de célula T de entre cualquiera de los antígenos anteriormente mencionados (Skjøt et al 2000; WO0179274; WO01 04151; ; solicitud de patente US nº 09/0505,739; Rosenkrands *et al.*, 1998; Nagai et al., 1991). La invención se refiere además a un polipéptido de fusión que comprende fusiones mutuas de dos o más de los polipéptidos (o partes inmunogénicas de los mismos) de la invención.

Otras parejas de fusión, que podrían potenciar la inmunogenicidad del producto, son linfoquinas tales como IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12. Con el fin de facilitar la expresión y/o la purificación, la pareja de fusión puede ser, p.ej., una proteína fimbrial bacteriana, p.ej., los componentes del pilus, pilina y papA; la proteína A; el péptido ZZ (las fusiones ZZ son comercializadas por Pharmacia en Suecia); la proteína de unión a maltosa; la glutatión-S-transferasa, la  $\beta$ -galactosidasa o la polihistidina. Las proteínas de fusión pueden producirse recombinantemente en una célula huésped, que podría ser *E. coli*, y es una posibilidad la inducción de una región conectora entre las diferentes parejas de fusión.

Otras parejas de fusión interesantes son los polipéptidos, que se lipidan de manera que el polipéptido inmunogénico sea presentado de una manera adecuada al sistema inmunológico. Este efecto es, p.ej., conocido de vacunas a base del polipéptido OspA de *Borrelia burgdorferi*, tal como se describe en, p.ej., el documento nº WO 96/40718 A, o vacunas a base de la lipoproteína OprI de *Pseudomonas aeruginosa* (Cote-Sierra J., 1998). Otra posibilidad es la fusión N-terminal de una secuencia de señal conocida y una cisteína N-terminal con el polipéptido inmunogénico. Dicha fusión resulta en la lipidación del polipéptido inmunogénico en la cisteína N-terminal, al ser producido en un huésped de producción adecuado.

#### Usos

#### Vacuna

Una vacuna es una preparación biológica que establece o mejora la inmunidad frente a una enfermedad particular. Las vacunas pueden ser profilácticas (p.ej., para prevenir o mejorar los efectos de una futura infección por cualquier patógeno natural o "salvaje"), postexposición (p.ej., para evitar la reactivación en individuos con infección latente sin síntomas clínicos) o terapéuticas (p.ej., vacunas utilizadas para tratar la enfermedad activa solas o combinadas con el tratamiento antibiótico para acortar el tratamiento).

Un modelo animal de TB latente

Con el fin de inducir una infección latente de grado bajo por *M. tb*, los animales en primer lugar recibieron una infección en aerosol utilizando una dosis normal de *M. tb* (aproximadamente 150 bacterias en los pulmones). Tras 6 semanas de infección, seguidamente los animales recibieron un tratamiento quimioterapéutico subóptimo de 6 semanas durante las que se erradicó la mayor parte de las bacterias, aunque no todas. Las bacterias restantes establecerán una infección latente. Tras el tratamiento quimioterapéutico, algunos animales se vacunan para examinar la capacidad de la vacuna de bloquear la reactivación de la infección latente, que se producirá espontáneamente 5 a 15 semanas después del tratamiento quimioterapéutico. Ver la figura 2.

*Vacuna de proteínas*

Otra parte de la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende un polipéptido (o por lo menos una parte inmunogénica del mismo) o polipéptido de fusión según la invención. Con el fin de garantizar un rendimiento óptimo de dicha composición de vacuna, resulta preferente que comprenda un portador, vehículo o adyuvante inmunológica o farmacéuticamente aceptable.

Una vacuna eficaz, en la que un polipéptido de la invención es reconocido por el animal, será capaz en un modelo animal de reducir la carga bacteriana en los órganos diana, prolongar el tiempo de supervivencia y/o reducir la pérdida de peso tras el reto por un *Mycobacterium* virulento, en comparación con animales no vacunados.

Los portadores adecuados se seleccionan del grupo que consiste en un polímero al que el polipéptido o polipéptidos se unen mediante interacción no covalente hidrofóbica, tal como un plástico, p.ej., poliestireno, o un polímero al que el polipéptido o polipéptidos se unen covalentemente, tal como un polisacárido, o un polipéptido, p.ej., albúmina de suero bovino, ovoalbúmina o hemocianina de lapa americana. Los vehículos adecuados se seleccionan del grupo que consiste en un diluyente y un agente de suspensión. El adyuvante se selecciona preferentemente del grupo que consiste en bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), Quil A, poli I:C, hidróxido de aluminio, adyuvante incompleto de Freund, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (DMT), dibehenato de trehalosa y dipéptido muramilo (DPM).

La preparación de vacunas que contienen secuencias peptídicas como ingredientes activos es generalmente bien entendida en la técnica, tal como ejemplifican las patentes US nº 4.608.251, nº 4.601.903, nº 4.599.231 y nº 4.599.230.

Entre otros métodos para conseguir un efecto adyuvante para la vacuna se incluye la utilización de agentes tales como el hidróxido de aluminio o fosfato (alúmina); también pueden utilizarse polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol), agregación de la proteína en la vacuna mediante tratamiento térmico, agregación mediante reactivación de anticuerpos (Fab) tratados con pepsina, mezcla con células bacterianas, tales como *C. parvum* o endotoxinas o componentes lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas, emulsión en vehículos aceites fisiológicamente aceptables, tales como monooleato de sorbitán (Aracel A) o emulsión con solución al 20 por ciento de un perfluorocarburo (Fluosol-DA) utilizado como sustituto en bloque. Otras posibilidades implican la utilización de sustancias inmunomoduladoras, tales como citoquinas o inductores de IFN- $\gamma$  sintéticos, tales como poli I:C en combinación con los adyuvantes anteriormente mencionados.

Otra posibilidad interesante para conseguir el efecto adyuvante es utilizar la técnica descrita en Gosselin et al., 1992. Brevemente, puede conjugarse un antígeno relevante, tal como un antígeno de la presente invención, con un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno) contra los receptores de Fc $\gamma$  sobre los monocitos/macrófagos.

Las vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de dosis, y en cantidad suficiente para ser inmunogénicas y eficaces en el bloqueo de la reactivación. La cantidad que debe administrarse depende del sujeto que debe tratarse, incluyendo, p.ej., la capacidad del sistema inmunológico del individuo de montar una respuesta inmunológica y el grado de protección deseado. Los intervalos de dosis adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de ingrediente activo por vacunación, con un intervalo preferente de entre aproximadamente 0,1  $\mu$ g y 1.000  $\mu$ g, tal como en el intervalo de entre aproximadamente 1  $\mu$ g y 300  $\mu$ g, y especialmente en el intervalo de entre aproximadamente 10  $\mu$ g y 50  $\mu$ g. Los regímenes adecuados para la administración inicial e inyecciones de refuerzo también son variables, aunque se tipifican por una administración inicial seguido de inoculaciones posteriores u otras administraciones.

El modo de aplicación puede variar ampliamente. Cualquiera de los métodos convencionales de administración de una vacuna es aplicable. Entre ellos se cree que incluyen la aplicación oral en una base fisiológicamente aceptable

sólida o en una dispersión fisiológicamente aceptable, por vía parenteral, mediante inyección o similar. La dosis de la vacuna dependería de la vía de administración y variará según la edad de la persona que debe vacunarse y, en menor grado, el tamaño de la persona que debe vacunarse.

5 Las vacunas se administran convencionalmente por vía intrapulmonar, p.ej., mediante aerosol o inhalación, por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular. Entre las formulaciones adicionales que resultan adecuadas para otros modos de administración se incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, entre los ligantes y portadores tradicionales pueden incluirse, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10%, preferentemente de 1-2%. Entre las formulaciones orales se incluyen excipientes normalmente utilizados tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación sostenida y ventajosamente contienen 10% a 95% de ingrediente activo, preferentemente 25% a 70%.

15 En muchos casos, resultará necesarias múltiples administraciones de la vacuna. En casos en que el individuo ya ha resultado infectado o se sospecha que se ha infectado, la vacunación anterior puede haber proporcionado suficiente inmunidad para evitar la enfermedad primaria pero, tal como se ha comentado anteriormente, el refuerzo de esta respuesta inmunológica no ayudará contra la infección latente. En tal situación, la vacuna necesariamente deberá ser una vacuna postexposición diseñada para eficacia contra el estadio latente de la infección o resurgimiento de la infección tuberculosis activa.

25 Debido a la variación genética, diferentes individuos pueden reaccionar con respuestas inmunológicas de diferente intensidad contra el mismo polipéptido. Por lo tanto, la vacuna según la invención puede comprender varios polipéptidos diferentes para incrementar la respuesta inmunológica. La vacuna puede comprender dos o más polipéptidos o partes inmunogénicas, en la que la totalidad de los polipéptidos son tal como se ha definido anteriormente, o algunos aunque no todos los péptidos pueden obtenerse de las micobacterias virulentas. En el último ejemplo, los polipéptidos que no satisfacen necesariamente los criterios proporcionados anteriormente para los polipéptidos pueden actuar según su propia inmunogenicidad o actuar meramente como adyuvantes.

30 La vacuna puede comprender 1 a 20, tal como 2 a 20 o incluso 3 a 20 polipéptidos o polipéptidos de fusión diferentes, tales como 3 a 10 polipéptidos o polipéptidos de fusión diferentes.

#### 35 Vacuna de ADN

Los fragmentos de ácidos nucleicos de la invención pueden utilizarse para llevar a cabo la expresión in vivo de antígenos, es decir, los fragmentos de ácidos nucleicos pueden utilizarse en las denominadas vacunas de ADN tal como en la revisión proporcionada por Ulmer et al., 1993.

40 Por lo tanto, en la presente memoria también se describe una vacuna postexposición que comprende un fragmento de ácidos nucleicos según la invención, llevando a cabo la vacuna la expresión in vivo de antígenos por el animal, incluyendo un ser humano en el que se ha administrado la vacuna, siendo eficaz la cantidad de antígeno expresado para proporcionar el tratamiento de las infecciones causadas por micobacterias virulentas en un animal, incluyendo un ser humano.

45 La eficacia de dicha vacuna de ADN puede potenciarse posiblemente mediante la administración del gen codificante del producto de expresión junto con un fragmento de ADN codificante de un polipéptido que presenta la capacidad de modular la respuesta inmunológica.

#### 50 *Vacunas recombinantes vivas*

Una posibilidad para activar eficazmente una respuesta inmunológica celular para una vacuna postexposición puede conseguirse mediante la expresión del antígeno relevante en una vacuna en un microorganismo no patogénico o virus. Los ejemplos bien conocidos de tales microorganismos son *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella* y *Pseudomona* y son ejemplos de virus, el virus Vaccinia y los adenovirus.

60 Por lo tanto, en la presente memoria se describe además una mejora de la vacuna BCG viva actualmente disponible, en la que una o más copias de una secuencia de ADN codificante de uno o más polipéptidos tal como se han definido anteriormente se han incorporado en el genoma del microorganismo de una manera que permite que éste exprese y secrete el polipéptido. La incorporación de más de una copia de una secuencia de nucleótidos de la invención se encuentra contemplado que potencie la respuesta inmunológica.

65 Otra posibilidad es integrar el ADN codificante del polipéptido según la invención en un virus atenuado, tal como el virus Vaccinia o un adenovirus (Rolph et al., 1997). El virus Vaccinia recombinante es capaz de replicarse dentro del citoplasma de la célula huésped infectada y el polipéptido de interés por lo tanto puede inducir una respuesta inmunológica, que se contempla que induce protección frente a TB.

A continuación, se describe la invención en mayor detalle en los ejemplos no limitativos siguientes.

### Leyendas de figura

- 5      Figura 1: el curso de una infección por *M. tuberculosis* se produce esencialmente en 3 etapas.  
 Figura 2: modelo de vacunación postexposición para bloquear la reactivación.  
 Figura 3: modelo de vacunación de TB.  
 Vista general esquemática del modelo utilizado en el Statens Serum Institut (SSI) para el ensayo de las vacunas postexposición. Se infectaron ratones con *M. tb* virulentos por la vía de aerosol. Entre las semanas 6 y 12 postinfección, los ratones fueron tratados con antibióticos para establecer un estado de TB latente. Los ratones se  
 10      vacunaron 2 a tres veces a intervalos de 3 semanas a partir de la semana 10 postinfección con los candidatos a vacuna postexposición. Se dejó tiempo para que la enfermedad se reactivase en los ratones y aproximadamente 20 semanas después, se evaluaron los pulmones para el número de bacterias con el fin de evaluar la eficacia de protección de la vacuna.
- 15      Figura 4: la vacuna postexposición indujo protección por ESAT6 pero no Ag85.  
 Se infectaron los ratones, se trataron y se vacunaron según la vista general esquemática en el Ejemplo 1. Los ratones se sacrificaron entre las semanas 30 y 40 posteriores a la infección y en este punto temporal se evaluaron los pulmones para la carga bacteriana (figura A, C-E) o, tal como se muestra en la figura 4B, en la que se determinó la carga bacteriana en varios puntos temporales durante la infección con ESAT6. (A y B) Carga bacteriana de animales vacunados con ESAT6 en comparación con la de animales de control. (C) Carga bacteriana de animales vacunados con Ag85B en comparación con la de animales de control. (D) Carga bacteriana de animales vacunados con ESAT-6 pepmix (pool de péptidos solapantes que cubren la secuencia completa de ESAT6) en comparación con animales vacunados con Ag85B y con animales de control. (E) Protección frente a la reactivación tras la vacunación postexposición con ratones vacunados con Ag85B-ESAT6 (H1) en comparación con la de ratones de control no vacunados. Todos los datos en la figura 4A, C-E se muestran como gráficos de puntos en los que se representa cada animal individual, ilustrando la media, mientras que cada punto temporal en la figura 4B es representativo de 6 animales individuales y se muestra como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (B). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando una prueba t no emparejada (figura A-C y E) o una prueba de comparaciones múltiples de Tukey (figura D), en donde  $p < 0,05$  se consideró el nivel de significancia.
- 20      Figura 5: la vacunación postexposición de ESAT-6 indujo las células T polifuncionales.  
 Las células procedentes de pulmones infectados procedentes de animales no vacunados o vacunados con ESAT-6 se estimularon in vitro con ESAT-6 antes de la tinción con anti-CD4, -CD8, -IFN- $\gamma$ , -TNF- $\alpha$  e -IL-2. (A y B) Se determinaron los perfiles de citoquinas dividiendo en primer lugar las células T CD4 en células IFN- $\gamma$  positivas (+) o IFN- $\gamma$  negativas (-). Se analizaron tanto las células IFN- $\gamma^+$  como IFN- $\gamma^-$  con respecto a la producción de TNF- $\alpha$  e IL-2. Los gráficos circulares (A y B) presentan un código de colores según el perfil de producción de citoquinas y resumen las fracciones de la respuesta de células T CD4 $^+$  (de entre las células T CD4 específicas de ESAT-6) que son positivas para un perfil de producción de citoquinas dado. (C) Se muestran todas las posibles combinaciones de citoquinas en el eje x del gráfico circular y se proporciona para cada grupo de inmunización el porcentaje de células T CD4 $^+$  específicas de ESAT-6 en ratones no vacunados (columnas grises) o en ratones vacunados con ESAT-6 (columnas negras) que expresan cualquier combinación de citoquinas. (D) Se vacunaron ratones con infección latente dos veces con ESAT-6 y 20 semanas después de la última vacunación, se evaluaron los pulmones para el número de bacterias con el fin de determinar la eficacia de protección. (\*\* $p < 0,01$ , prueba de comparaciones múltiples de Tukey de ANOVA unidireccional).
- 25      Figura 6: Análisis agrupados de todos los experimentos postexposición  
 Para un experimento individual en que se había utilizado ESAT6, Rv3871, Ag85B, Rv3905, Rv3445, Rv0569 or Rv2031c (figura A), Ag85B-ESAT6 (H1) o Ag85B-ESAT6-Rv2660 (H56) (figura B) para la vacunación postexposición, se comparó la mediana de la carga bacteriana del grupo de control de adyuvante con la carga bacteriana de cada ratón individual en un grupo vacunado con uno cualquiera de los antígenos mencionados anteriormente. En las figuras A y B, cada punto corresponde al nivel de protección, es decir,  $\Delta \text{Log}_{10}$  UFC proporcionado por la vacunación en comparación con el grupo de control de adyuvante y consiste en varios experimentos independientes. (A)  $\text{Log}_{10}$  protección para los antígenos individuales ESAT6, Rv3871, Ag85B, Rv3905, Rv3445, Rv0569 o Rv2031c (B) o para los antígenos híbridos H1 y H56 en comparación con ESAT6 solo. Se aplicó el análisis estadístico para las comparaciones de las medianas entre los diferentes grupos utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Kruskal Wallis. Se consideró que  $p < 0,05$  era el nivel de significancia.
- 30      Figura 7: efecto de la vacunación postexposición con Rv3871 en comparación con ESAT6 y animales de control.  
 Se infectaron los ratones, se trataron y se vacunaron en las semanas 10, 13 y 18 posteriores a la infección. En la semana 36 posterior a la infección, se sacrificaron los ratones y linfocitos pulmonares procedentes tanto de ratones vacunados como de control solución salina no vacunados se reestimularon in vitro con Rv3871 (fig. 7A) o ESAT6 (fig. 7B). Se evaluó la liberación de IFN- $\gamma$  mediante ELISA y se obtuvieron muestras por triplicado. Los datos se representan como medias  $\pm$  SEM. Se determinó la eficacia de protección proporcionada por las vacunas mediante enumeración de las bacterias en pulmón cultivado a partir de homogenado de pulmones completos ( $n=16$  a 18). Los datos representados como gráfico de puntos, en los que cada punto representa un animal individual y se ilustran con la mediana (línea roja).
- 35        
 40        
 45        
 50        
 55        
 60        
 65        
 70        
 75        
 80        
 85        
 90        
 95        
 100        
 105        
 110        
 115        
 120        
 125        
 130        
 135        
 140        
 145        
 150        
 155        
 160        
 165        
 170        
 175        
 180        
 185        
 190        
 195        
 200        
 205        
 210        
 215        
 220        
 225        
 230        
 235        
 240        
 245        
 250        
 255        
 260        
 265        
 270        
 275        
 280        
 285        
 290        
 295        
 300        
 305        
 310        
 315        
 320        
 325        
 330        
 335        
 340        
 345        
 350        
 355        
 360        
 365        
 370        
 375        
 380        
 385        
 390        
 395        
 400        
 405        
 410        
 415        
 420        
 425        
 430        
 435        
 440        
 445        
 450        
 455        
 460        
 465        
 470        
 475        
 480        
 485        
 490        
 495        
 500        
 505        
 510        
 515        
 520        
 525        
 530        
 535        
 540        
 545        
 550        
 555        
 560        
 565        
 570        
 575        
 580        
 585        
 590        
 595        
 600        
 605        
 610        
 615        
 620        
 625        
 630        
 635        
 640        
 645        
 650        
 655        
 660        
 665        
 670        
 675        
 680        
 685        
 690        
 695        
 700        
 705        
 710        
 715        
 720        
 725        
 730        
 735        
 740        
 745        
 750        
 755        
 760        
 765        
 770        
 775        
 780        
 785        
 790        
 795        
 800        
 805        
 810        
 815        
 820        
 825        
 830        
 835        
 840        
 845        
 850        
 855        
 860        
 865        
 870        
 875        
 880        
 885        
 890        
 895        
 900        
 905        
 910        
 915        
 920        
 925        
 930        
 935        
 940        
 945        
 950        
 955        
 960        
 965        
 970        
 975        
 980        
 985        
 990        
 995        
 1000        
 1005        
 1010        
 1015        
 1020        
 1025        
 1030        
 1035        
 1040        
 1045        
 1050        
 1055        
 1060        
 1065        
 1070        
 1075        
 1080        
 1085        
 1090        
 1095        
 1100        
 1105        
 1110        
 1115        
 1120        
 1125        
 1130        
 1135        
 1140        
 1145        
 1150        
 1155        
 1160        
 1165        
 1170        
 1175        
 1180        
 1185        
 1190        
 1195        
 1200        
 1205        
 1210        
 1215        
 1220        
 1225        
 1230        
 1235        
 1240        
 1245        
 1250        
 1255        
 1260        
 1265        
 1270        
 1275        
 1280        
 1285        
 1290        
 1295        
 1300        
 1305        
 1310        
 1315        
 1320        
 1325        
 1330        
 1335        
 1340        
 1345        
 1350        
 1355        
 1360        
 1365        
 1370        
 1375        
 1380        
 1385        
 1390        
 1395        
 1400        
 1405        
 1410        
 1415        
 1420        
 1425        
 1430        
 1435        
 1440        
 1445        
 1450        
 1455        
 1460        
 1465        
 1470        
 1475        
 1480        
 1485        
 1490        
 1495        
 1500        
 1505        
 1510        
 1515        
 1520        
 1525        
 1530        
 1535        
 1540        
 1545        
 1550        
 1555        
 1560        
 1565        
 1570        
 1575        
 1580        
 1585        
 1590        
 1595        
 1600        
 1605        
 1610        
 1615        
 1620        
 1625        
 1630        
 1635        
 1640        
 1645        
 1650        
 1655        
 1660        
 1665        
 1670        
 1675        
 1680        
 1685        
 1690        
 1695        
 1700        
 1705        
 1710        
 1715        
 1720        
 1725        
 1730        
 1735        
 1740        
 1745        
 1750        
 1755        
 1760        
 1765        
 1770        
 1775        
 1780        
 1785        
 1790        
 1795        
 1800        
 1805        
 1810        
 1815        
 1820        
 1825        
 1830        
 1835        
 1840        
 1845        
 1850        
 1855        
 1860        
 1865        
 1870        
 1875        
 1880        
 1885        
 1890        
 1895        
 1900        
 1905        
 1910        
 1915        
 1920        
 1925        
 1930        
 1935        
 1940        
 1945        
 1950        
 1955        
 1960        
 1965        
 1970        
 1975        
 1980        
 1985        
 1990        
 1995        
 2000        
 2005        
 2010        
 2015        
 2020        
 2025        
 2030        
 2035        
 2040        
 2045        
 2050        
 2055        
 2060        
 2065        
 2070        
 2075        
 2080        
 2085        
 2090        
 2095        
 2100        
 2105        
 2110        
 2115        
 2120        
 2125        
 2130        
 2135        
 2140        
 2145        
 2150        
 2155        
 2160        
 2165        
 2170        
 2175        
 2180        
 2185        
 2190        
 2195        
 2200        
 2205        
 2210        
 2215        
 2220        
 2225        
 2230        
 2235        
 2240        
 2245        
 2250        
 2255        
 2260        
 2265        
 2270        
 2275        
 2280        
 2285        
 2290        
 2295        
 2300        
 2305        
 2310        
 2315        
 2320        
 2325        
 2330        
 2335        
 2340        
 2345        
 2350        
 2355        
 2360        
 2365        
 2370        
 2375        
 2380        
 2385        
 2390        
 2395        
 2400        
 2405        
 2410        
 2415        
 2420        
 2425        
 2430        
 2435        
 2440        
 2445        
 2450        
 2455        
 2460        
 2465        
 2470        
 2475        
 2480        
 2485        
 2490        
 2495        
 2500        
 2505        
 2510        
 2515        
 2520        
 2525        
 2530        
 2535        
 2540        
 2545        
 2550        
 2555        
 2560        
 2565        
 2570        
 2575        
 2580        
 2585        
 2590        
 2595        
 2600        
 2605        
 2610        
 2615        
 2620        
 2625        
 2630        
 2635        
 2640        
 2645        
 2650        
 2655        
 2660        
 2665        
 2670        
 2675        
 2680        
 2685        
 2690        
 2695        
 2700        
 2705        
 2710        
 2715        
 2720        
 2725        
 2730        
 2735        
 2740        
 2745        
 2750        
 2755        
 2760        
 2765        
 2770        
 2775        
 2780        
 2785        
 2790        
 2795        
 2800        
 2805        
 2810        
 2815        
 2820        
 2825        
 2830        
 2835        
 2840        
 2845        
 2850        
 2855        
 2860        
 2865        
 2870        
 2875        
 2880        
 2885        
 2890        
 2895        
 2900        
 2905        
 2910        
 2915        
 2920        
 2925        
 2930        
 2935        
 2940        
 2945        
 2950        
 2955        
 2960        
 2965        
 2970        
 2975        
 2980        
 2985        
 2990        
 2995        
 3000        
 3005        
 3010        
 3015        
 3020        
 3025        
 3030        
 3035        
 3040        
 3045        
 3050        
 3055        
 3060        
 3065        
 3070        
 3075        
 3080        
 3085        
 3090        
 3095        
 3100        
 3105        
 3110        
 3115        
 3120        
 3125        
 3130        
 3135        
 3140        
 3145        
 3150        
 3155        
 3160        
 3165        
 3170        
 3175        
 3180        
 3185        
 3190        
 3195        
 3200        
 3205        
 3210        
 3215        
 3220        
 3225        
 3230        
 3235        
 3240        
 3245        
 3250        
 3255        
 3260        
 3265        
 3270        
 3275        
 3280        
 3285        
 3290        
 3295        
 3300        
 3305        
 3310        
 3315        
 3320        
 3325        
 3330        
 3335        
 3340        
 3345        
 3350        
 3355        
 3360        
 3365        
 3370        
 3375        
 3380        
 3385        
 3390        
 3395        
 3400        
 3405        
 3410        
 3415        
 3420        
 3425        
 3430        
 3435        
 3440        
 3445        
 3450        
 3455        
 3460        
 3465        
 3470        
 3475        
 3480        
 3485        
 3490        
 3495        
 3500        
 3505        
 3510        
 3515        
 3520        
 3525        
 3530        
 3535        
 3540        
 3545        
 3550        
 3555        
 3560        
 3565        
 3570        
 3575        
 3580        
 3585        
 3590        
 3595        
 3600        
 3605        
 3610        
 3615        
 3620        
 3625        
 3630        
 3635        
 3640        
 3645        
 3650        
 3655        
 3660        
 3665        
 3670        
 3675        
 3680        
 3685        
 3690        
 3695        
 3700        
 3705        
 3710        
 3715        
 3720        
 3725        
 3730        
 3735        
 3740        
 3745        
 3750        
 3755        
 3760        
 3765        
 3770        
 3775        
 3780        
 3785        
 3790        
 3795        
 3800        
 3805        
 3810        
 3815        
 3820        
 3825        
 3830        
 3835        
 3840        
 3845        
 3850        
 3855        
 3860        
 3865        
 3870        
 3875        
 3880        
 3885        
 3890        
 3895        
 3900        
 3905        
 3910        
 3915        
 3920        
 3925        
 3930        
 3935        
 3940        
 3945        
 3950        
 3955        
 3960        
 3965        
 3970        
 3975        
 3980        
 3985        
 3990        
 3995        
 4000        
 4005        
 4010        
 4015        
 4020        
 4025        
 4030        
 4035        
 4040        
 4045        
 4050        
 4055        
 4060        
 4065        
 4070        
 4075        
 4080        
 4085        
 4090        
 4095        
 4100        
 4105        
 4110        
 4115        
 4120        
 4125        
 4130        
 4135        
 4140        
 4145        
 4150        
 4155        
 4160        
 4165        
 4170        
 4175        
 4180        
 4185        
 4190        
 4195        
 4200        
 4205        
 4210        
 4215        
 4220        
 4225        
 4230        
 4235        
 4240        
 4245        
 4250        
 4255        
 4260        
 4265        
 4270        
 4275        
 4280        
 4285        
 4290        
 4295        
 4300        
 4305        
 4310        
 4315        
 4320        
 4325        
 4330        
 4335        
 4340        
 4345        
 4350        
 4355        
 4360        
 4365        
 4370        
 4375        
 4380        
 4385        
 4390        
 4395        
 4400        
 4405        
 4410        
 4415        
 4420        
 4425        
 4430        
 4435        
 4440        
 4445        
 4450

## Ejemplos

### EJEMPLO 1: modelo de TB murina para la vacunación

5 El modelo Cornell ha sido ampliamente utilizado como modelo murino para el estudio de la TB latente. Este modelo se adaptó en el laboratorio de los presentes inventores para el ensayo de la capacidad de los candidatos de vacuna de bloquear la reactivación. Los ratones se infectaron inicialmente con aerosol de *M. tb* virulento y en la semana 6 después de la infección se inició el tratamiento antibiótico para reducir la carga bacteriana. Esto se llevó a cabo para mimetizar el estadio latente de una infección humana, que no se produce espontáneamente en los ratones. Durante esta etapa latente (una etapa con un número de bacterias continuamente bajo), los ratones se inmunizaron dos veces y se determinó la capacidad de la vacuna de bloquear la reactivación, mediante el cultivo de bazo y pulmones para *M. tb* vivos 20 semanas después de la última inmunización. La larga duración de los experimentos resulta necesaria para permitir un tiempo suficiente para la reactivación de la enfermedad, que es un requisito previo para una lectura de la eficacia de la vacuna (figura 3).

### EJEMPLO 2: la vacuna postexposición indujo protección por ESAT6 pero no Ag85.

Se ha demostrado que ESAT-6 y Ag85B son protectoras en la vacuna profiláctica, tanto como componentes individuales como también como molécula de fusión Ag85B-ESAT6 (H1). Sin embargo, al someter a ensayo estos antígenos en el modelo postexposición (tal como se ha indicado anteriormente, en el Ejemplo 1), sólo ESAT6 presentó un efecto protector y crecimiento de bacterias de control durante la etapa de reactivación (figura 4). Además, tal como se observa en la figura 4B, la protección por ESAT6 frente a la reactivación se manifiesta tan pronto como en la semana 18 después de la infección y esta protección se mantuvo durante la totalidad del curso del experimento (hasta la semana 40 posterior a la infección). Lo anterior contrasta con lo observado al utilizar Ag85B como vacuna postexposición (figura 4C y D), en la que no se produjo una reducción significativa de la carga bacteriana en comparación con el control. Además, los presentes inventores evaluaron la proteína de fusión H1, que está compuesta de los antígenos de TB Ag85B y ESAT-6, que han demostrado una prometedora eficacia en un contexto profiláctico. Al utilizar esta molécula como una vacuna postexposición en el modelo de postexposición del SSI, fue capaz de reducir significativamente el número de bacterias (figura 4E).

### EJEMPLO 3: producción inducida por vacuna postexposición por mezcla de péptidos ESAT6

Tal como se ha mostrado en los ejemplos, anteriormente, la molécula ESAT-6 es muy activa al administrarla postexposición, resultando en una reducción de la carga bacteriana en comparación con el grupo de control y también en comparación con Ag85B. Además, los presentes inventores mostraron que ESAT-6 administrada como pool de péptidos solapantes en lugar de una proteína recombinante también conduce a una mejor protección frente a la reactivación en comparación con tanto el grupo de control como Ag85B, demostrando la fuerte actividad de ESAT6 y la capacidad de funcionar como vacuna postexposición (figura 4D).

40 Péptidos ESAT-6 solapantes (P1-P13) utilizados para el experimento de protección:

P1 MTEQQWNFAGIEAAA (SEC ID nº 19).

P2 NFAGIEAAAASAIQGN (SEC ID nº 20).

P3 ASAIQGNVTSIHSL (SEQ ID NO. 21).

P4 NVTSIHSLLDGKQS (SEQ ID NO. 22).

45 P5 SLLDEGKQSLTKLAA (SEQ ID NO. 23).

P6 KQSLTKLAAAWGGSG (SEQ ID NO. 24).

P7 AAWGGSGSEAYQGVQ (SEQ ID NO. 25).

P8 GSEAYQGVQKWDAT (SEQ ID NO. 26).

P9 QKWDATATELNNAL (SEQ ID NO. 27).

50 P10 TATELNNALQNLART (SEQ ID NO. 28).

P11 ALQNLARTISEAGQA (SEQ ID NO. 29).

P12 TISEAGQAMASTEGR (SEQ ID NO. 30).

P13 QAMASTEGRVTGMFA (SEQ ID NO. 31).

### 55 EJEMPLO 5: Vacunación postexposición con células T polifuncionales inducidas por ESAT-6

Con el fin de examinar el efecto de una vacunación postexposición con ESAT-6 sobre el perfil de expresión de citoquinas de las células específicas de ESAT-6, en primer lugar, los ratones se infectaron con aerosol con *M. tb* virulentas y en la semana 6 después de la infección se inició el tratamiento antibiótico para reducir la carga bacteriana y establecer una infección latente. Durante la etapa latente, los ratones se vacunaron (tal como se muestra en la figura 3) tres veces a intervalos de 3 semanas y se determinó la capacidad de la vacuna de ESAT-6 de influir sobre el número de células T polifuncionales y de bloquear la reactivación de *M. tb* 20 semanas después de la última vacunación. Los resultados mostraron que se produce una respuesta de ESAT-6 sustancial en el grupo no vacunado, pero que el perfil de expresión de citoquinas era marcadamente diferente en comparación con el grupo vacunado con ESAT-6 (fig. 5), en particular en términos de células T polifuncionales (células T CD4 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>). De esta manera, en comparación con el grupo no vacunado, los presentes inventores observaron un número reducido de células T CD4

IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  y un número incrementado de células T CD4 polifuncionales triple positivas que coexpresan IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-2. La presencia incrementada de células T polifuncionales se correlacionaba con un número de bacterias reducido en los pulmones de los animales vacunados con ESAT-6 (fig. 5D).

5 EJEMPLO 6: vacunación postexposición con ESAT6 protege más consistentemente frente a la reactivación que otros antígenos asociados a la infección de estadio temprano y de estadio tardío.

Con el fin de determinar qué antígenos protegían más consistentemente frente a la protección, los presentes inventores realizaron un análisis agrupado de datos normalizados basado en todos los experimentos postexposición realizados. Los datos procedentes de experimentos individuales se normalizaron mediante comparación de la carga bacteriana de cada ratón individual dentro de un grupo con la mediana del grupo de control; es decir, cada punto de datos representa la diferencia (Log<sub>10</sub> UFC mediana de control -Log<sub>10</sub> UFC grupo de vacuna) entre UFC mediana de control y UFC de cada individuo (figura 6). En la figura 6A, la comparación del conjunto de datos agrupados de protección para los antígenos asociados a latencia Rv0569, Rv2031c y los antígenos tempranos Ag85B, ESAT6, Rv3871, Rv3905 y Rv3445, de los cuales los dos últimos son proteínas de la familia de ESAT6 muestra que los animales vacunados con ESAT6 están significativamente mejor protegidos frente a la reactivación en comparación con otros antígenos evaluados. Además, los niveles de protección alcanzados tras la vacunación postexposición con Rv3871 y proteína ESX-1 aparentemente también se encuentran elevados en comparación con otros antígenos (figura 6A). Con el fin de demostrar adicionalmente la actividad de ESAT6, en particular, los presentes inventores compararon la protección proporcionada por ESAT6 con los dos constructos de fusión H1 (Ag85B-ESAT6) y H56 (Ag85B-ESAT6-Rv2660), en donde ambos contienen ESAT6 (figura 6B). El análisis mostró que la actividad de ESAT6 todavía resulta en la protección frente a la reactivación al incluirlo en los dos constructos de fusión mencionados anteriormente.

EJEMPLO 7: la vacunación postexposición con otro elemento de la familia de ESX-1, Rv3871, aparentemente presenta un efecto inhibitorio del proceso de reactivación.

Los presentes inventores evaluaron otros elementos de la familia de ESX-1 en paralelo con ESAT6 y encontraron que la vacunación postexposición con Rv3871 conducía a una inducción de una respuesta inmunológica específica de Rv3871 (fig. 7B), aunque no de la magnitud de la respuesta inmunológica inducida por ESAT6 (fig. 7A). Sin embargo, ambas respuestas inmunológicas, las inducidas por ESAT6 y por Rv3871, fueron superiores a las observadas en animales de control de solución salina. La inducción de una respuesta inmunológica específica de vacuna se asoció a una carga bacteriana reducida (mediana) en ambos grupos de vacuna en comparación con el grupo de solución salina. Lo anterior indica que Rv3871 podría presentar un efecto similar de protección frente a la reactivación al de ESAT6, demostrado por los niveles similares de número bacteriano en estos dos grupos en comparación con el nivel algo elevado en el grupo de control (figura 7C).

## Referencias

- Andersen, P. 2007 15(1), 7-13
- 40 Anon. 2001. Global Tuberculosis Control. WHO Report.
- Arend, SM., Infect Immun. 2000 68(6): 3314-3321.
- Brodin, P. et al. Infect Immun. 2006, 74, 88-98
- Cote-Sierra J, et al 1998, Gene Oct 9;221(1):25-34
- Doherty TM et al., 2002, J Clin Microbiol. Feb;40(2):704-6.
- 45 Gao LY et al 2004, Molecular Microbiology 1677-93
- Gosselin et al., 1992. J. Immunol. 149: 3477-3481
- Guinn KI et al, 2004, Mol Microbiol. 51, 359-70
- Guttstadt, A 1891. Die Wirksamkeit des Koch'schen Heilmittels gegen Tuberculosis, Po-lykliniken und Pathologisch/Anatomischen Institute der Preussischen Universitaten. Springer, Berlin.
- 50 Harboe, M., et al 1998 Infect. Immun. 66:2; 717-723
- Hougardy et al 2007, PLoS ONE. Oct 3;2(10):e926
- Kilgus J et al, J Immunol. 1991 Jan 1;146(1):307-15
- Leyten EM. Et al. Microbes Infect. 2006 8(8):2052-60.
- Lin MY and Ottenhoff TH, Biol. Chem. 2008, 389 (5): 497-511
- 55 Lowrie, D.B. et al 1999, Nature 400: 269-71
- Lustig et al 1976, Cell Immunol 24(1):164-7
- MacGurn JA et al. Mol Microbiol. 2005, 57:1653-63
- Merrifield, R. B. Fed. Proc. Am. Soc. Ex. Biol. 21: 412, 1962 and J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963
- Mowat et al 1991, Immunology 72(3):317-22
- 60 Mustafa, AS et al. 2000, Clin. Infect. Dis. 30 (suppl. 3) S201-S205
- Nagai et al 1991, Infect. Immun 59:1; 372-382
- Olsen AW et al, Eur J Immunol. 2000 Jun; 30(6):1724-32
- Pym AS et al Nat Med 2003, 9, 533-9;
- Pearson, WR. et al. 1988. Proc Natl Acad Sci USA, 85, 2444-2448.
- 65 Raghavan, S. et al. 2008, Nature 454, 717-721
- Ravn, P. et al 1999. J.Infect.Dis. 179:637-645

Rolph, MS, and I. A. Ramshaw. 1997. *Curr. Opin. Immunol.* 9:517-24  
 Rogerson, BJ et al *Immunology* 2006, 118, 195-201  
 Rosenkrands, I., et al 1998, *Infect. Immun* 66:6; 2728-2735  
 Ruhwald M. et al 2008 *PLoS ONE*. Aug 6;3(8):e2858  
 5 Sambrook et al *Molecular Cloning; A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1989  
 Seder, Nat. *Rev. Immunol.* 2008;8(4):247-58  
 Sinigaglia F et al. *Nature* 1988 Dec 22-29;336(6201):778-80  
 Skjøt, RLV., et al 2000, *Infect. Immun* 68:1; 214-220  
 Smith J. et al. 2008, *Infect Immun* 76, 5478-87  
 10 Stanley, SA et al. 2003 *Proc Natl Acad. Sci USA* 100:12420-5  
 Stryhn, A., et al 1996 *Eur. J. Immunol.* 26:1911-1918  
 Turner, OC et al 2000 *Infect Immun.* 68:6:3674-9.  
 Talaat AM et al. 2007, *J of Bact* 189, 4265-74  
 Thompson J., et al *Nucleic Acids Res* 1994 22:4673-4680  
 15 Ulmer J.B et al 1993, *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2(9): 983-989  
 van Pinxteren LA et al. 2000. *Eur. J. Immunol.* 30: 3689-98.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

20 <110> Statens Serum Institut

<120> Vacuna contra la tuberculosis para impedir la reactivación

<130> 15034

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.1

25 <210> 1

<211> 95

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser  
 1 5 10 15

Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly  
 20 25 30

Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser  
 35 40 45

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu  
 50 55 60

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly  
 65 70 75 80

30 Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala  
 85 90 95

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 714 383 T3

<400> 2

Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly  
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val  
20 25 30

Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly  
35 40 45

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys  
50 55 60

Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly  
65 70 75 80

Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser  
85 90 95

Gln Met Gly Phe  
100

- 5 <210> 3  
<211> 392  
<212> PRT  
<213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 714 383 T3

<400> 3

Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly  
1 5 10 15

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
50 55 60

Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu  
65 70 75 80

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
100 105 110

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

Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val  
130 135 140

Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala  
145 150 155 160

Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala  
165 170 175

Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr

ES 2 714 383 T3

	180		185		190														
Leu	Gly	Glu	Val	Trp	Glu	Phe	Ile	Thr	Asn	Ala	Leu	Asn	Gly	Leu	Lys				
	195						200					205							
Glu	Leu	Trp	Asp	Lys	Leu	Thr	Gly	Trp	Val	Thr	Gly	Leu	Phe	Ser	Arg				
	210					215					220								
Gly	Trp	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Phe	Phe	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Leu	Thr				
225					230					235					240				
Gly	Ala	Thr	Ser	Gly	Leu	Ser	Gln	Val	Thr	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ala				
				245					250					255					
Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Ala	His	Ala	Asp	Ser	Leu	Ala	Ser				
			260					265					270						
Ser	Ala	Ser	Leu	Pro	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Phe				
	275						280					285							
Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Gln	Val	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Arg	Gln				
	290					295					300								
Ala	Leu	Arg	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Pro	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln				
305					310					315					320				
Val	Gly	Gly	Gln	Ser	Gln	Leu	Val	Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Gln	Gly	Met				
				325					330					335					
Gly	Gly	Pro	Val	Gly	Met	Gly	Gly	Met	His	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser				
			340					345					350						
Lys	Gly	Thr	Thr	Thr	Lys	Lys	Tyr	Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr				
		355					360					365							
Glu	Asp	Ala	Glu	Arg	Ala	Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Gly	Gln				
	370					375					380								
Lys	Val	Leu	Val	Arg	Asn	Val	Val												
385					390														

<210> 4  
 <211> 184  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

5

<400> 4  
 Val Asp Leu Pro Gly Asn Asp Phe Asp Ser Asn Asp Phe Asp Ala Val  
 1 5 10 15

ES 2 714 383 T3

Asp Leu Trp Gly Ala Asp Gly Ala Glu Gly Trp Thr Ala Asp Pro Ile  
20 25 30

Ile Gly Val Gly Ser Ala Ala Thr Pro Asp Thr Gly Pro Asp Leu Asp  
35 40 45

Asn Ala His Gly Gln Ala Glu Thr Asp Thr Glu Gln Glu Ile Ala Leu  
50 55 60

Phe Thr Val Thr Asn Pro Pro Arg Thr Val Ser Val Ser Thr Leu Met  
65 70 75 80

Asp Gly Arg Ile Asp His Val Glu Leu Ser Ala Arg Val Ala Trp Met  
85 90 95

Ser Glu Ser Gln Leu Ala Ser Glu Ile Leu Val Ile Ala Asp Leu Ala  
100 105 110

Arg Gln Lys Ala Gln Ser Ala Gln Tyr Ala Phe Ile Leu Asp Arg Met  
115 120 125

Ser Gln Gln Val Asp Ala Asp Glu His Arg Val Ala Leu Leu Arg Lys  
130 135 140

Thr Val Gly Glu Thr Trp Gly Leu Pro Ser Pro Glu Glu Ala Ala Ala  
145 150 155 160

Ala Glu Ala Glu Val Phe Ala Thr Arg Tyr Ser Asp Asp Cys Pro Ala  
165 170 175

Pro Asp Asp Glu Ser Asp Pro Trp  
180

<210> 5

<211> 103

5 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

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

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

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

Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala

ES 2 714 383 T3

50 55 60

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

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

Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr  
100

<210> 6

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 6

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

Tyr Pro Pro Gly Arg Gly Pro His Thr Ser Ala Glu Val Ile Ala Ala  
20 25 30

Leu Lys Ala Glu Gly Ile Thr Met Ser Ala Pro Tyr Leu Ser Gln Leu  
35 40 45

Arg Ser Gly Asn Arg Thr Asn Pro Ser Gly Ala Thr Met Ala Ala Leu  
50 55 60

Ala Asn Phe Phe Arg Ile Lys Ala Ala Tyr Phe Thr Asp Asp Glu Tyr  
65 70 75 80

Tyr Glu Lys Leu Asp Lys Glu Leu Gln Trp Leu Cys Thr Met Arg Asp  
85 90 95

Asp Gly Val Arg Arg Ile Ala Gln Arg Ala His Gly Leu Pro Ser Ala  
100 105 110

Ala Gln Gln Lys Val Leu Asp Arg Ile Asp Glu Leu Arg Arg Ala Glu  
115 120 125

Gly Ile Asp Ala  
130

<210> 7

<211> 573

10 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 714 383 T3

<400> 7

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

Pro Met Ser Glu Ala Arg Ser Leu Asp Leu Phe Thr Glu Ile Thr Asn  
 20 25 30

Tyr Asp Glu Ser Ala Cys Asp Ala Trp Ile Gly Arg Ile Arg Cys Gly  
 35 40 45

Asp Thr Asp Arg Val Thr Leu Phe Arg Ala Trp Tyr Ser Arg Arg Asn  
 50 55 60

Phe Gly Gln Leu Ser Gly Ser Val Gln Ile Ser Met Ser Thr Leu Asn  
 65 70 75 80

Ala Arg Ile Ala Ile Gly Gly Leu Tyr Gly Asp Ile Thr Tyr Pro Val  
 85 90 95

Thr Ser Pro Leu Ala Ile Thr Met Gly Phe Ala Ala Cys Glu Ala Ala  
 100 105 110

Gln Gly Asn Tyr Ala Asp Ala Met Glu Ala Leu Glu Ala Ala Pro Val  
 115 120 125

Ala Gly Ser Glu His Leu Val Ala Trp Met Lys Ala Val Val Tyr Gly  
 130 135 140

Ala Ala Glu Arg Trp Thr Asp Val Ile Asp Gln Val Lys Ser Ala Gly  
 145 150 155 160

Lys Trp Pro Asp Lys Phe Leu Ala Gly Ala Ala Gly Val Ala His Gly  
 165 170 175

Val Ala Ala Ala Asn Leu Ala Leu Phe Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu  
 180 185 190

Thr Glu Ala Asn Asp Ser Pro Ala Gly Glu Ala Cys Ala Arg Ala Ile  
 195 200 205

Ala Trp Tyr Leu Ala Met Ala Arg Arg Ser Gln Gly Asn Glu Ser Ala  
 210 215 220

Ala Val Ala Leu Leu Glu Trp Leu Gln Thr Thr His Pro Glu Pro Lys  
 225 230 235 240

Val Ala Ala Ala Leu Lys Asp Pro Ser Tyr Arg Leu Lys Thr Thr Thr  
 245 250 255

Ala Glu Gln Ile Ala Ser Arg Ala Asp Pro Trp Asp Pro Gly Ser Val

ES 2 714 383 T3

260 265 270

Val Thr Asp Asn Ser Gly Arg Glu Arg Leu Leu Ala Glu Ala Gln Ala  
275 280 285

Glu Leu Asp Arg Gln Ile Gly Leu Thr Arg Val Lys Asn Gln Ile Glu  
290 295 300

Arg Tyr Arg Ala Ala Thr Leu Met Ala Arg Val Arg Ala Ala Lys Gly  
305 310 315 320

Met Lys Val Ala Gln Pro Ser Lys His Met Ile Phe Thr Gly Pro Pro  
325 330 335

Gly Thr Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg Val Val Ala Asn Ile Leu Ala  
340 345 350

Gly Leu Gly Val Ile Ala Glu Pro Lys Leu Val Glu Thr Ser Arg Lys  
355 360 365

Asp Phe Val Ala Glu Tyr Glu Gly Gln Ser Ala Val Lys Thr Ala Lys  
370 375 380

Thr Ile Asp Gln Ala Leu Gly Gly Val Leu Phe Ile Asp Glu Ala Tyr  
385 390 395 400

Ala Leu Val Gln Glu Arg Asp Gly Arg Thr Asp Pro Phe Gly Gln Glu  
405 410 415

Ala Leu Asp Thr Leu Leu Ala Arg Met Glu Asn Asp Arg Asp Arg Leu  
420 425 430

Val Val Ile Ile Ala Gly Tyr Ser Ser Asp Ile Asp Arg Leu Leu Glu  
435 440 445

Thr Asn Glu Gly Leu Arg Ser Arg Phe Ala Thr Arg Ile Glu Phe Asp  
450 455 460

Thr Tyr Ser Pro Glu Glu Leu Leu Glu Ile Ala Asn Val Ile Ala Ala  
465 470 475 480

Ala Asp Asp Ser Ala Leu Thr Ala Glu Ala Ala Glu Asn Phe Leu Gln  
485 490 495

Ala Ala Lys Gln Leu Glu Gln Arg Met Leu Arg Gly Arg Arg Ala Leu  
500 505 510

Asp Val Ala Gly Asn Gly Arg Tyr Ala Arg Gln Leu Val Glu Ala Ser  
515 520 525

Glu Gln Cys Arg Asp Met Arg Leu Ala Gln Val Leu Asp Ile Asp Thr  
530 535 540

Leu Asp Glu Asp Arg Leu Arg Glu Ile Asn Gly Ser Asp Met Ala Glu  
545 550 555 560

Ala Ile Ala Ala Val His Ala His Leu Asn Met Arg Glu  
565 570

ES 2 714 383 T3

<210> 8  
 <211> 480  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 8  
 Met Gly Leu Arg Leu Thr Thr Lys Val Gln Val Ser Gly Trp Arg Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Arg Arg Leu Glu His Ala Ile Val Arg Arg Asp Thr Arg Met  
 20 25 30  
 Phe Asp Asp Pro Leu Gln Phe Tyr Ser Arg Ser Ile Ala Leu Gly Ile  
 35 40 45  
 Val Val Ala Val Leu Ile Leu Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Tyr Phe  
 50 55 60  
 Lys Pro Gln Gly Lys Leu Gly Gly Thr Ser Leu Phe Thr Asp Arg Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Asn Gln Leu Tyr Val Leu Leu Ser Gly Gln Leu His Pro Val Tyr  
 85 90 95  
 Asn Leu Thr Ser Ala Arg Leu Val Leu Gly Asn Pro Ala Asn Pro Ala  
 100 105 110  
 Thr Val Lys Ser Ser Glu Leu Ser Lys Leu Pro Met Gly Gln Thr Val  
 115 120 125  
 Gly Ile Pro Gly Ala Pro Tyr Ala Thr Pro Val Ser Ala Gly Ser Thr  
 130 135 140  
 Ser Ile Trp Thr Leu Cys Asp Thr Val Ala Arg Ala Asp Ser Thr Ser  
 145 150 155 160  
 Pro Val Val Gln Thr Ala Val Ile Ala Met Pro Leu Glu Ile Asp Ala  
 165 170 175

ES 2 714 383 T3

Ser Ile Asp Pro Leu Gln Ser His Glu Ala Val Leu Val Ser Tyr Gln  
 180 185 190

Gly Glu Thr Trp Ile Val Thr Thr Lys Gly Arg His Ala Ile Asp Leu  
 195 200 205

Thr Asp Arg Ala Leu Thr Ser Ser Met Gly Ile Pro Val Thr Ala Arg  
 210 215 220

Pro Thr Pro Ile Ser Glu Gly Met Phe Asn Ala Leu Pro Asp Met Gly  
 225 230 235 240

Pro Trp Gln Leu Pro Pro Ile Pro Ala Ala Gly Ala Pro Asn Ser Leu  
 245 250 255

Gly Leu Pro Asp Asp Leu Val Ile Gly Ser Val Phe Gln Ile His Thr  
 260 265 270

Asp Lys Gly Pro Gln Tyr Tyr Val Val Leu Pro Asp Gly Ile Ala Gln  
 275 280 285

Val Asn Ala Thr Thr Ala Ala Ala Leu Arg Ala Thr Gln Ala His Gly  
 290 295 300

Leu Val Ala Pro Pro Ala Met Val Pro Ser Leu Val Val Arg Ile Ala  
 305 310 315 320

Glu Arg Val Tyr Pro Ser Pro Leu Pro Asp Glu Pro Leu Lys Ile Val  
 325 330 335

Ser Arg Pro Gln Asp Pro Ala Leu Cys Trp Ser Trp Gln Arg Ser Ala  
 340 345 350

Gly Asp Gln Ser Pro Gln Ser Thr Val Leu Ser Gly Arg His Leu Pro  
 355 360 365

Ile Ser Pro Ser Ala Met Asn Met Gly Ile Lys Gln Ile His Gly Thr  
 370 375 380

Ala Thr Val Tyr Leu Asp Gly Gly Lys Phe Val Ala Leu Gln Ser Pro  
 385 390 395 400

Asp Pro Arg Tyr Thr Glu Ser Met Tyr Tyr Ile Asp Pro Gln Gly Val  
 405 410 415

Arg Tyr Gly Val Pro Asn Ala Glu Thr Ala Lys Ser Leu Gly Leu Ser  
 420 425 430

Ser Pro Gln Asn Ala Pro Trp Glu Ile Val Arg Leu Leu Val Asp Gly  
 435 440 445

Pro Val Leu Ser Lys Asp Ala Ala Leu Leu Glu His Asp Thr Leu Pro  
 450 455 460

Ala Asp Pro Ser Pro Arg Lys Val Pro Ala Gly Ala Ser Gly Ala Pro  
 465 470 475 480

ES 2 714 383 T3

<210> 9  
 <211> 747  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 9  
 Met Thr Thr Lys Lys Phe Thr Pro Thr Ile Thr Arg Gly Pro Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Thr Pro Gly Glu Ile Ser Leu Thr Pro Pro Asp Asp Leu Gly Ile Asp  
 20 25 30  
 Ile Pro Pro Ser Gly Val Gln Lys Ile Leu Pro Tyr Val Met Gly Gly  
 35 40 45  
 Ala Met Leu Gly Met Ile Ala Ile Met Val Ala Gly Gly Thr Arg Gln  
 50 55 60  
 Leu Ser Pro Tyr Met Leu Met Met Pro Leu Met Met Ile Val Met Met  
 65 70 75 80  
 Val Gly Gly Leu Ala Gly Ser Thr Gly Gly Gly Gly Lys Lys Val Pro  
 85 90 95  
 Glu Ile Asn Ala Asp Arg Lys Glu Tyr Leu Arg Tyr Leu Ala Gly Leu  
 100 105 110  
 Arg Thr Arg Val Thr Ser Ser Ala Thr Ser Gln Val Ala Phe Phe Ser  
 115 120 125  
 Tyr His Ala Pro His Pro Glu Asp Leu Leu Ser Ile Val Gly Thr Gln  
 130 135 140  
 Arg Gln Trp Ser Arg Pro Ala Asn Ala Asp Phe Tyr Ala Ala Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Ile Gly Ile Gly Asp Gln Pro Ala Val Asp Arg Leu Leu Lys Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Gly Gly Glu Leu Ala Ala Ala Ser Ala Ala Pro Gln Pro Phe Leu  
 180 185 190

ES 2 714 383 T3

Glu Pro Val Ser His Met Trp Val Val Lys Phe Leu Arg Thr His Gly  
 195 200 205

Leu Ile His Asp Cys Pro Lys Leu Leu Gln Leu Arg Thr Phe Pro Thr  
 210 215 220

Ile Ala Ile Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu Met Thr Ala  
 225 230 235 240

Met Ile Cys His Leu Ala Val Phe His Pro Pro Asp Leu Leu Gln Ile  
 245 250 255

Arg Val Leu Thr Glu Glu Pro Asp Asp Pro Asp Trp Ser Trp Leu Lys  
 260 265 270

Trp Leu Pro His Val Gln His Gln Thr Glu Thr Asp Ala Ala Gly Ser  
 275 280 285

Thr Arg Leu Ile Phe Thr Arg Gln Glu Gly Leu Ser Asp Leu Ala Ala  
 290 295 300

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

Val Val Asp Leu Thr Gly Gly Lys Ala Gly Phe Pro Pro Asp Gly Arg  
 325 330 335

Ala Gly Val Thr Val Ile Thr Leu Gly Asn His Arg Gly Ser Ala Tyr  
 340 345 350

Arg Ile Arg Val His Glu Asp Gly Thr Ala Asp Asp Arg Leu Pro Asn  
 355 360 365

Gln Ser Phe Arg Gln Val Thr Ser Val Thr Asp Arg Met Ser Pro Gln  
 370 375 380

Gln Ala Ser Arg Ile Ala Arg Lys Leu Ala Gly Trp Ser Ile Thr Gly  
 385 390 395 400

Thr Ile Leu Asp Lys Thr Ser Arg Val Gln Lys Lys Val Ala Thr Asp  
 405 410 415

Trp His Gln Leu Val Gly Ala Gln Ser Val Glu Glu Ile Thr Pro Ser  
 420 425 430

Arg Trp Arg Met Tyr Thr Asp Thr Asp Arg Asp Arg Leu Lys Ile Pro  
 435 440 445

ES 2 714 383 T3

Phe Gly His Glu Leu Lys Thr Gly Asn Val Met Tyr Leu Asp Ile Lys  
 450 455 460

Glu Gly Ala Glu Phe Gly Ala Gly Pro His Gly Met Leu Ile Gly Thr  
 465 470 475 480

Thr Gly Ser Gly Lys Ser Glu Phe Leu Arg Thr Leu Ile Leu Ser Leu  
 485 490 495

Val Ala Met Thr His Pro Asp Gln Val Asn Leu Leu Leu Thr Asp Phe  
 500 505 510

Lys Gly Gly Ser Thr Phe Leu Gly Met Glu Lys Leu Pro His Thr Ala  
 515 520 525

Ala Val Val Thr Asn Met Ala Glu Glu Ala Glu Leu Val Ser Arg Met  
 530 535 540

Gly Glu Val Leu Thr Gly Glu Leu Asp Arg Arg Gln Ser Ile Leu Arg  
 545 550 555 560

Gln Ala Gly Met Lys Val Gly Ala Ala Gly Ala Leu Ser Gly Val Ala  
 565 570 575

Glu Tyr Glu Lys Tyr Arg Glu Arg Gly Ala Asp Leu Pro Pro Leu Pro  
 580 585 590

Thr Leu Phe Val Val Val Asp Glu Phe Ala Glu Leu Leu Gln Ser His  
 595 600 605

Pro Asp Phe Ile Gly Leu Phe Asp Arg Ile Cys Arg Val Gly Arg Ser  
 610 615 620

Leu Arg Val His Leu Leu Leu Ala Thr Gln Ser Leu Gln Thr Gly Gly  
 625 630 635 640

Val Arg Ile Asp Lys Leu Glu Pro Asn Leu Thr Tyr Arg Ile Ala Leu  
 645 650 655

Arg Thr Thr Ser Ser His Glu Ser Lys Ala Val Ile Gly Thr Pro Glu  
 660 665 670

Ala Gln Tyr Ile Thr Asn Lys Glu Ser Gly Val Gly Phe Leu Arg Val  
 675 680 685

Gly Met Glu Asp Pro Val Lys Phe Ser Thr Phe Tyr Ile Ser Gly Pro  
 690 695 700

Tyr Met Pro Pro Ala Ala Gly Val Glu Thr Asn Gly Glu Ala Gly Gly  
 705 710 715 720

Pro Gly Gln Gln Thr Thr Arg Gln Ala Ala Arg Ile His Arg Phe Thr  
 725 730 735

Ala Ala Pro Val Leu Glu Glu Ala Pro Thr Pro  
 740 745

ES 2 714 383 T3

<210> 10  
 <211> 591  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 10  
 Met Thr Ala Glu Pro Glu Val Arg Thr Leu Arg Glu Val Val Leu Asp  
 1 5 10 15  
  
 Gln Leu Gly Thr Ala Glu Ser Arg Ala Tyr Lys Met Trp Leu Pro Pro  
 20 25 30  
  
 Leu Thr Asn Pro Val Pro Leu Asn Glu Leu Ile Ala Arg Asp Arg Arg  
 35 40 45  
  
 Gln Pro Leu Arg Phe Ala Leu Gly Ile Met Asp Glu Pro Arg Arg His  
 50 55 60  
  
 Leu Gln Asp Val Trp Gly Val Asp Val Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ile  
 65 70 75 80  
  
 Gly Ile Gly Gly Ala Pro Gln Thr Gly Lys Ser Thr Leu Leu Gln Thr  
 85 90 95  
  
 Met Val Met Ser Ala Ala Ala Thr His Ser Pro Arg Asn Val Gln Phe  
 100 105 110  
  
 Tyr Cys Ile Asp Leu Gly Gly Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Glu Asn Leu  
 115 120 125  
  
 Pro His Val Gly Gly Val Ala Asn Arg Ser Glu Pro Asp Lys Val Asn  
 130 135 140  
  
 Arg Val Val Ala Glu Met Gln Ala Val Met Arg Gln Arg Glu Thr Thr  
 145 150 155 160  
  
 Phe Lys Glu His Arg Val Gly Ser Ile Gly Met Tyr Arg Gln Leu Arg  
 165 170 175  
  
 Asp Asp Pro Ser Gln Pro Val Ala Ser Asp Pro Tyr Gly Asp Val Phe  
 180 185 190

ES 2 714 383 T3

Leu Ile Ile Asp Gly Trp Pro Gly Phe Val Gly Glu Phe Pro Asp Leu  
 195 200 205

Glu Gly Gln Val Gln Asp Leu Ala Ala Gln Gly Leu Ala Phe Gly Val  
 210 215 220

His Val Ile Ile Ser Thr Pro Arg Trp Thr Glu Leu Lys Ser Arg Val  
 225 230 235 240

Arg Asp Tyr Leu Gly Thr Lys Ile Glu Phe Arg Leu Gly Asp Val Asn  
 245 250 255

Glu Thr Gln Ile Asp Arg Ile Thr Arg Glu Ile Pro Ala Asn Arg Pro  
 260 265 270

Gly Arg Ala Val Ser Met Glu Lys His His Leu Met Ile Gly Val Pro  
 275 280 285

Arg Phe Asp Gly Val His Ser Ala Asp Asn Leu Val Glu Ala Ile Thr  
 290 295 300

Ala Gly Val Thr Gln Ile Ala Ser Gln His Thr Glu Gln Ala Pro Pro  
 305 310 315 320

Val Arg Val Leu Pro Glu Arg Ile His Leu His Glu Leu Asp Pro Asn  
 325 330 335

Pro Pro Gly Pro Glu Ser Asp Tyr Arg Thr Arg Trp Glu Ile Pro Ile  
 340 345 350

Gly Leu Arg Glu Thr Asp Leu Thr Pro Ala His Cys His Met His Thr  
 355 360 365

Asn Pro His Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ala Lys Ser Gly Lys Thr Thr  
 370 375 380

Ile Ala His Ala Ile Ala Arg Ala Ile Cys Ala Arg Asn Ser Pro Gln  
 385 390 395 400

Gln Val Arg Phe Met Leu Ala Asp Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Asp Ala  
 405 410 415

Val Pro Asp Thr His Leu Leu Gly Ala Gly Ala Ile Asn Arg Asn Ser  
 420 425 430

Ala Ser Leu Asp Glu Ala Val Gln Ala Leu Ala Val Asn Leu Lys Lys  
 435 440 445

ES 2 714 383 T3

Arg Leu Pro Pro Thr Asp Leu Thr Thr Ala Gln Leu Arg Ser Arg Ser  
450 455 460

Trp Trp Ser Gly Phe Asp Val Val Leu Leu Val Asp Asp Trp His Met  
465 470 475 480

Ile Val Gly Ala Ala Gly Gly Met Pro Pro Met Ala Pro Leu Ala Pro  
485 490 495

Leu Leu Pro Ala Ala Ala Asp Ile Gly Leu His Ile Ile Val Thr Cys  
500 505 510

Gln Met Ser Gln Ala Tyr Lys Ala Thr Met Asp Lys Phe Val Gly Ala  
515 520 525

Ala Phe Gly Ser Gly Ala Pro Thr Met Phe Leu Ser Gly Glu Lys Gln  
530 535 540

Glu Phe Pro Ser Ser Glu Phe Lys Val Lys Arg Arg Pro Pro Gly Gln  
545 550 555 560

Ala Phe Leu Val Ser Pro Asp Gly Lys Glu Val Ile Gln Ala Pro Tyr  
565 570 575

Ile Glu Pro Pro Glu Glu Val Phe Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gly  
580 585 590

<210> 11

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11

Met Glu Lys Met Ser His Asp Pro Ile Ala Ala Asp Ile Gly Thr Gln  
1 5 10 15

Val Ser Asp Asn Ala Leu His Gly Val Thr Ala Gly Ser Thr Ala Leu  
20 25 30

Thr Ser Val Thr Gly Leu Val Pro Ala Gly Ala Asp Glu Val Ser Ala  
35 40 45

Gln Ala Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Gly Ile Gln Leu Leu Ala Ser  
50 55 60

Asn Ala Ser Ala Gln Asp Gln Leu His Arg Ala Gly Glu Ala Val Gln  
65 70 75 80

Asp Val Ala Arg Thr Tyr Ser Gln Ile Asp Asp Gly Ala Ala Gly Val  
85 90 95

Phe Ala Glu

10 <210> 12

<211> 368

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 714 383 T3

<400> 12

Met Leu Trp His Ala Met Pro Pro Glu Leu Asn Thr Ala Arg Leu Met  
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Pro Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ala Gly Trp Gln  
 20 25 30

Thr Leu Ser Ala Ala Leu Asp Ala Gln Ala Val Glu Leu Thr Ala Arg  
 35 40 45

Leu Asn Ser Leu Gly Glu Ala Trp Thr Gly Gly Gly Ser Asp Lys Ala  
 50 55 60

Leu Ala Ala Ala Thr Pro Met Val Val Trp Leu Gln Thr Ala Ser Thr  
 65 70 75 80

Gln Ala Lys Thr Arg Ala Met Gln Ala Thr Ala Gln Ala Ala Ala Tyr  
 85 90 95

Thr Gln Ala Met Ala Thr Thr Pro Ser Leu Pro Glu Ile Ala Ala Asn  
 100 105 110

His Ile Thr Gln Ala Val Leu Thr Ala Thr Asn Phe Phe Gly Ile Asn  
 115 120 125

Thr Ile Pro Ile Ala Leu Thr Glu Met Asp Tyr Phe Ile Arg Met Trp  
 130 135 140

Asn Gln Ala Ala Leu Ala Met Glu Val Tyr Gln Ala Glu Thr Ala Val  
 145 150 155 160

Asn Thr Leu Phe Glu Lys Leu Glu Pro Met Ala Ser Ile Leu Asp Pro  
 165 170 175

Gly Ala Ser Gln Ser Thr Thr Asn Pro Ile Phe Gly Met Pro Ser Pro  
 180 185 190

Gly Ser Ser Thr Pro Val Gly Gln Leu Pro Pro Ala Ala Thr Gln Thr  
 195 200 205

ES 2 714 383 T3

Leu Gly Gln Leu Gly Glu Met Ser Gly Pro Met Gln Gln Leu Thr Gln  
210 215 220

Pro Leu Gln Gln Val Thr Ser Leu Phe Ser Gln Val Gly Gly Thr Gly  
225 230 235 240

Gly Gly Asn Pro Ala Asp Glu Glu Ala Ala Gln Met Gly Leu Leu Gly  
245 250 255

Thr Ser Pro Leu Ser Asn His Pro Leu Ala Gly Gly Ser Gly Pro Ser  
260 265 270

Ala Gly Ala Gly Leu Leu Arg Ala Glu Ser Leu Pro Gly Ala Gly Gly  
275 280 285

Ser Leu Thr Arg Thr Pro Leu Met Ser Gln Leu Ile Glu Lys Pro Val  
290 295 300

Ala Pro Ser Val Met Pro Ala Ala Ala Ala Gly Ser Ser Ala Thr Gly  
305 310 315 320

Gly Ala Ala Pro Val Gly Ala Gly Ala Met Gly Gln Gly Ala Gln Ser  
325 330 335

Gly Gly Ser Thr Arg Pro Gly Leu Val Ala Pro Ala Pro Leu Ala Gln  
340 345 350

Glu Arg Glu Glu Asp Asp Glu Asp Asp Trp Asp Glu Glu Asp Asp Trp  
355 360 365

<210> 13

<211> 666

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5

<400> 13

Met Ala Ala Asp Tyr Asp Lys Leu Phe Arg Pro His Glu Gly Met Glu  
1 5 10 15

Ala Pro Asp Asp Met Ala Ala Gln Pro Phe Phe Asp Pro Ser Ala Ser  
20 25 30

Phe Pro Pro Ala Pro Ala Ser Ala Asn Leu Pro Lys Pro Asn Gly Gln  
35 40 45

Thr Pro Pro Pro Thr Ser Asp Asp Leu Ser Glu Arg Phe Val Ser Ala  
50 55 60

Pro Thr Pro Met  
65 70 75 80

ES 2 714 383 T3

Pro Ile Ala Ala Gly Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Ala Ala Ser Lys  
85 90 95

Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile Ala Gly Pro Glu Pro Ala Pro Pro  
100 105 110

Lys Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile Ala Gly Pro Glu Pro Ala Pro  
115 120 125

Pro Lys Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile Ala Gly Pro Ala Pro Thr  
130 135 140

Pro Thr Glu Ser Gln Leu Ala Pro Pro Arg Pro Pro Thr Pro Gln Thr  
145 150 155 160

Pro Thr Gly Ala Pro Gln Gln Pro Glu Ser Pro Ala Pro His Val Pro  
165 170 175

Ser His Gly Pro His Gln Pro Arg Arg Thr Ala Pro Ala Pro Pro Trp  
180 185 190

Ala Lys Met Pro Ile Gly Glu Pro Pro Pro Ala Pro Ser Arg Pro Ser  
195 200 205

Ala Ser Pro Ala Glu Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Gln His Ser Arg  
210 215 220

Arg Ala Arg Arg Gly His Arg Tyr Arg Thr Asp Thr Glu Arg Asn Val  
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Thr Gly Pro Ser Ile Gln Ala Arg Leu Arg Ala Glu  
245 250 255

Glu Ala Ser Gly Ala Gln Leu Ala Pro Gly Thr Glu Pro Ser Pro Ala  
260 265 270

Pro Leu Gly Gln Pro Arg Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Thr Arg Pro Ala  
275 280 285

Pro Thr Glu Pro Pro Pro Ser Pro Ser Pro Gln Arg Asn Ser Gly Arg  
290 295 300

Arg Ala Glu Arg Arg Val His Pro Asp Leu Ala Ala Gln His Ala Ala  
305 310 315 320

Ala Gln Pro Asp Ser Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly Gly Arg Arg Arg  
325 330 335

ES 2 714 383 T3

Lys Arg Ala Ala Pro Asp Leu Asp Ala Thr Gln Lys Ser Leu Arg Pro  
 340 345 350

Ala Ala Lys Gly Pro Lys Val Lys Lys Val Lys Pro Gln Lys Pro Lys  
 355 360 365

Ala Thr Lys Pro Pro Lys Val Val Ser Gln Arg Gly Trp Arg His Trp  
 370 375 380

Val His Ala Leu Thr Arg Ile Asn Leu Gly Leu Ser Pro Asp Glu Lys  
 385 390 395 400

Tyr Glu Leu Asp Leu His Ala Arg Val Arg Arg Asn Pro Arg Gly Ser  
 405 410 415

Tyr Gln Ile Ala Val Val Gly Leu Lys Gly Gly Ala Gly Lys Thr Thr  
 420 425 430

Leu Thr Ala Ala Leu Gly Ser Thr Leu Ala Gln Val Arg Ala Asp Arg  
 435 440 445

Ile Leu Ala Leu Asp Ala Asp Pro Gly Ala Gly Asn Leu Ala Asp Arg  
 450 455 460

Val Gly Arg Gln Ser Gly Ala Thr Ile Ala Asp Val Leu Ala Glu Lys  
 465 470 475 480

Glu Leu Ser His Tyr Asn Asp Ile Arg Ala His Thr Ser Val Asn Ala  
 485 490 495

Val Asn Leu Glu Val Leu Pro Ala Pro Glu Tyr Ser Ser Ala Gln Arg  
 500 505 510

Ala Leu Ser Asp Ala Asp Trp His Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ser Arg  
 515 520 525

Phe Tyr Asn Leu Val Leu Ala Asp Cys Gly Ala Gly Phe Phe Asp Pro  
 530 535 540

Leu Thr Arg Gly Val Leu Ser Thr Val Ser Gly Val Val Val Val Ala  
 545 550 555 560

Ser Val Ser Ile Asp Gly Ala Gln Gln Ala Ser Val Ala Leu Asp Trp  
 565 570 575

Leu Arg Asn Asn Gly Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Arg Ala Cys Val Val  
 580 585 590

ES 2 714 383 T3

Ile Asn His Ile Met Pro Gly Glu Pro Asn Val Ala Val Lys Asp Leu  
595 600 605

Val Arg His Phe Glu Gln Gln Val Gln Pro Gly Arg Val Val Val Met  
610 615 620

Pro Trp Asp Arg His Ile Ala Ala Gly Thr Glu Ile Ser Leu Asp Leu  
625 630 635 640

Leu Asp Pro Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu Glu Leu Ala Ala Ala Leu  
645 650 655

Ser Asp Asp Phe Glu Arg Ala Gly Arg Arg  
660 665

<210> 14

<211> 511

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 14

Leu Ser Ala Pro Ala Val Ala Ala Gly Pro Thr Ala Ala Gly Ala Thr  
1 5 10 15

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

Met Thr Asp Leu Val Leu Pro Ala Ala Val Pro Met Glu Thr Tyr Ile  
35 40 45

Asp Asp Thr Val Ala Val Leu Ser Glu Val Leu Glu Asp Thr Pro Ala  
50 55 60

Asp Val Leu Gly Gly Phe Asp Phe Thr Ala Gln Gly Val Trp Ala Phe  
65 70 75 80

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Pro Leu Lys Leu Asp Gln Ser Leu Asp Asp  
85 90 95

Ala Gly Val Val Asp Gly Ser Leu Leu Thr Leu Val Ser Val Ser Arg  
100 105 110

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

Val Leu Asp Glu Ser Pro Glu Phe Asp Arg Thr Ala Leu Asn Arg Phe  
130 135 140

Val Gly Ala Ala Ile Pro Leu Leu Thr Ala Pro Val Ile Gly Met Ala  
145 150 155 160

ES 2 714 383 T3

Met Arg Ala Trp Trp Glu Thr Gly Arg Ser Leu Trp Trp Pro Leu Ala  
 165 170 175

Ile Gly Ile Leu Gly Ile Ala Val Leu Val Gly Ser Phe Val Ala Asn  
 180 185 190

Arg Phe Tyr Gln Ser Gly His Leu Ala Glu Cys Leu Leu Val Thr Thr  
 195 200 205

Tyr Leu Leu Ile Ala Thr Ala Ala Ala Leu Ala Val Pro Leu Pro Arg  
 210 215 220

Gly Val Asn Ser Leu Gly Ala Pro Gln Val Ala Gly Ala Ala Thr Ala  
 225 230 235 240

Val Leu Phe Leu Thr Leu Met Thr Arg Gly Gly Pro Arg Lys Arg His  
 245 250 255

Glu Leu Ala Ser Phe Ala Val Ile Thr Ala Ile Ala Val Ile Ala Ala  
 260 265 270

Ala Ala Ala Phe Gly Tyr Gly Tyr Gln Asp Trp Val Pro Ala Gly Gly  
 275 280 285

Ile Ala Phe Gly Leu Phe Ile Val Thr Asn Ala Ala Lys Leu Thr Val  
 290 295 300

Ala Val Ala Arg Ile Ala Leu Pro Pro Ile Pro Val Pro Gly Glu Thr  
 305 310 315 320

Val Asp Asn Glu Glu Leu Leu Asp Pro Val Ala Thr Pro Glu Ala Thr  
 325 330 335

Ser Glu Glu Thr Pro Thr Trp Gln Ala Ile Ile Ala Ser Val Pro Ala  
 340 345 350

Ser Ala Val Arg Leu Thr Glu Arg Ser Lys Leu Ala Lys Gln Leu Leu  
 355 360 365

Ile Gly Tyr Val Thr Ser Gly Thr Leu Ile Leu Ala Ala Gly Ala Ile  
 370 375 380

Ala Val Val Val Arg Gly His Phe Phe Val His Ser Leu Val Val Ala  
 385 390 395 400

Gly Leu Ile Thr Thr Val Cys Gly Phe Arg Ser Arg Leu Tyr Ala Glu  
 405 410 415

ES 2 714 383 T3

Arg Trp Cys Ala Trp Ala Leu Leu Ala Ala Thr Val Ala Ile Pro Thr  
420 425 430

Gly Leu Thr Ala Lys Leu Ile Ile Trp Tyr Pro His Tyr Ala Trp Leu  
435 440 445

Leu Leu Ser Val Tyr Leu Thr Val Ala Leu Val Ala Leu Val Val Val  
450 455 460

Gly Ser Met Ala His Val Arg Arg Val Ser Pro Val Val Lys Arg Thr  
465 470 475 480

Leu Glu Leu Ile Asp Gly Ala Met Ile Ala Ala Ile Ile Pro Met Leu  
485 490 495

Leu Trp Ile Thr Gly Val Tyr Asp Thr Val Arg Asn Ile Arg Phe  
500 505 510

<210> 15

<211> 280

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 15

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

Ala Lys Leu Ala Gly Leu Val Phe Pro Gln Pro Pro Ala Pro Ile Ala  
20 25 30

Val Ser Gly Thr Asp Ser Val Val Ala Ala Ile Asn Glu Thr Met Pro  
35 40 45

Ser Ile Glu Ser Leu Val Ser Asp Gly Leu Pro Gly Val Lys Ala Ala  
50 55 60

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

Lys Thr Asp Gln Ser Leu Gly Thr Ser Leu Ser Gln Tyr Ala Phe Gly  
85 90 95

Ser Ser Gly Glu Gly Leu Ala Gly Val Ala Ser Val Gly Gly Gln Pro  
100 105 110

Ser Gln Ala Thr Gln Leu Leu Ser Thr Pro Val Ser Gln Val Thr Thr  
115 120 125

Gln Leu Gly Glu Thr Ala Ala Glu Leu Ala Pro Arg Val Val Ala Thr

ES 2 714 383 T3

130

135

140

Val Pro Gln Leu Val Gln Leu Ala Pro His Ala Val Gln Met Ser Gln  
145 150 155 160

Asn Ala Ser Pro Ile Ala Gln Thr Ile Ser Gln Thr Ala Gln Gln Ala  
165 170 175

Ala Gln Ser Ala Gln Gly Gly Ser Gly Pro Met Pro Ala Gln Leu Ala  
180 185 190

Ser Ala Glu Lys Pro Ala Thr Glu Gln Ala Glu Pro Val His Glu Val  
195 200 205

Thr Asn Asp Asp Gln Gly Asp Gln Gly Asp Val Gln Pro Ala Glu Val  
210 215 220

Val Ala Ala Ala Arg Asp Glu Gly Ala Gly Ala Ser Pro Gly Gln Gln  
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Val Pro Ala Gln Ala Met Asp Thr Gly Ala Gly Ala  
245 250 255

Arg Pro Ala Ala Ser Pro Leu Ala Ala Pro Val Asp Pro Ser Thr Pro  
260 265 270

Ala Pro Ser Thr Thr Thr Thr Leu  
275 280

<210> 16

<211> 729

5 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 16

Met Ser Ile Thr Arg Pro Thr Gly Ser Tyr Ala Arg Gln Met Leu Asp  
1 5 10 15

Pro Gly Gly Trp Val Glu Ala Asp Glu Asp Thr Phe Tyr Asp Arg Ala  
20 25 30

Gln Glu Tyr Ser Gln Val Leu Gln Arg Val Thr Asp Val Leu Asp Thr  
35 40 45

Cys Arg Gln Gln Lys Gly His Val Phe Glu Gly Gly Leu Trp Ser Gly  
50 55 60

Gly Ala Ala Asn Ala Ala Asn Gly Ala Leu Gly Ala Asn Ile Asn Gln  
65 70 75 80

ES 2 714 383 T3

Leu Met Thr Leu Gln Asp Tyr Leu Ala Thr Val Ile Thr Trp His Arg  
85 90 95

His Ile Ala Gly Leu Ile Glu Gln Ala Lys Ser Asp Ile Gly Asn Asn  
100 105 110

Val Asp Gly Ala Gln Arg Glu Ile Asp Ile Leu Glu Asn Asp Pro Ser  
115 120 125

Leu Asp Ala Asp Glu Arg His Thr Ala Ile Asn Ser Leu Val Thr Ala  
130 135 140

Thr His Gly Ala Asn Val Ser Leu Val Ala Glu Thr Ala Glu Arg Val  
145 150 155 160

Leu Glu Ser Lys Asn Trp Lys Pro Pro Lys Asn Ala Leu Glu Asp Leu  
165 170 175

Leu Gln Gln Lys Ser Pro Pro Pro Pro Asp Val Pro Thr Leu Val Val  
180 185 190

Pro Ser Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro Ile Thr Pro Gly  
195 200 205

Thr Pro Ile Thr Pro Gly Thr Pro Ile Thr Pro Ile Pro Gly Ala Pro  
210 215 220

Val Thr Pro Ile Thr Pro Thr Pro Gly Thr Pro Val Thr Pro Val Thr  
225 230 235 240

Pro Gly Lys Pro Val Thr Pro Val Thr Pro Val Lys Pro Gly Thr Pro  
245 250 255

Gly Glu Pro Thr Pro Ile Thr Pro Val Thr Pro Pro Val Ala Pro Ala  
260 265 270

Thr Pro Ala Thr Pro Ala Thr Pro Val Thr Pro Ala Pro Ala Pro His  
275 280 285

Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Gly Pro Gln Pro Val  
290 295 300

Thr Pro Ala Thr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Ala Thr Pro Gly Thr Pro  
305 310 315 320

Gly Gly Glu Pro Ala Pro His Val Lys Pro Ala Ala Leu Ala Glu Gln  
325 330 335

ES 2 714 383 T3

Pro Gly Val Pro Gly Gln His Ala Gly Gly Gly Thr Gln Ser Gly Pro  
 340 345 350

Ala His Ala Asp Glu Ser Ala Ala Ser Val Thr Pro Ala Ala Ala Ser  
 355 360 365

Gly Val Pro Gly Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ser Gly Thr Ala  
 370 375 380

Val Gly Ala Gly Ala Arg Ser Ser Val Gly Thr Ala Ala Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Ala Gly Ser His Ala Ala Thr Gly Arg Ala Pro Val Ala Thr Ser Asp  
 405 410 415

Lys Ala Ala Ala Pro Ser Thr Arg Ala Ala Ser Ala Arg Thr Ala Pro  
 420 425 430

Pro Ala Arg Pro Pro Ser Thr Asp His Ile Asp Lys Pro Asp Arg Ser  
 435 440 445

Glu Ser Ala Asp Asp Gly Thr Pro Val Ser Met Ile Pro Val Ser Ala  
 450 455 460

Ala Arg Ala Ala Arg Asp Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Arg Gln  
 465 470 475 480

Arg Gly Arg Gly Asp Ala Leu Arg Leu Ala Arg Arg Ile Ala Ala Ala  
 485 490 495

Leu Asn Ala Ser Asp Asn Asn Ala Gly Asp Tyr Gly Phe Phe Trp Ile  
 500 505 510

Thr Ala Val Thr Thr Asp Gly Ser Ile Val Val Ala Asn Ser Tyr Gly  
 515 520 525

Leu Ala Tyr Ile Pro Asp Gly Met Glu Leu Pro Asn Lys Val Tyr Leu  
 530 535 540

Ala Ser Ala Asp His Ala Ile Pro Val Asp Glu Ile Ala Arg Cys Ala  
 545 550 555 560

Thr Tyr Pro Val Leu Ala Val Gln Ala Trp Ala Ala Phe His Asp Met  
 565 570 575

Thr Leu Arg Ala Val Ile Gly Thr Ala Glu Gln Leu Ala Ser Ser Asp  
 580 585 590

Pro Gly Val Ala Lys Ile Val Leu Glu Pro Asp Asp Ile Pro Glu Ser



ES 2 714 383 T3

<210> 18  
 <211> 460  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 18  
 Met Thr Gln Ser Gln Thr Val Thr Val Asp Gln Gln Glu Ile Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Asn Glu Val Glu Ala Pro Met Ala Asp Pro Pro Thr Asp Val  
 20 25 30  
 Pro Ile Thr Pro Cys Glu Leu Thr Ala Ala Lys Asn Ala Ala Gln Gln  
 35 40 45  
 Leu Val Leu Ser Ala Asp Asn Met Arg Glu Tyr Leu Ala Ala Gly Ala  
 50 55 60  
 Lys Glu Arg Gln Arg Leu Ala Thr Ser Leu Arg Asn Ala Ala Lys Ala  
 65 70 75 80  
 Tyr Gly Glu Val Asp Glu Glu Ala Ala Thr Ala Leu Asp Asn Asp Gly  
 85 90 95  
 Glu Gly Thr Val Gln Ala Glu Ser Ala Gly Ala Val Gly Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 Ser Ala Glu Leu Thr Asp Thr Pro Arg Val Ala Thr Ala Gly Glu Pro  
 115 120 125  
 Asn Phe Met Asp Leu Lys Glu Ala Ala Arg Lys Leu Glu Thr Gly Asp  
 130 135 140  
 Gln Gly Ala Ser Leu Ala His Phe Ala Asp Gly Trp Asn Thr Phe Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Leu Gln Gly Asp Val Lys Arg Phe Arg Gly Phe Asp Asn Trp  
 165 170 175  
 Glu Gly Asp Ala Ala Thr Ala Cys Glu Ala Ser Leu Asp Gln Gln Arg  
 180 185 190  
 Gln Trp Ile Leu His Met Ala Lys Leu Ser Ala Ala Met Ala Lys Gln



ES 2 714 383 T3

<210> 20  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 20  
 Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn  
 1 5 10 15

<210> 21  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 10 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 21  
 Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu  
 1 5 10 15

<210> 22  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 22  
 Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser  
 1 5 10 15

<210> 23  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 20 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 23  
 Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

<210> 24  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 24  
 30 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

<210> 25  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 35 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 25  
 Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln  
 1 5 10 15

<210> 26  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 40 <213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 714 383 T3

<400> 26  
 Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr  
 1 5 10 15

5 <210> 27  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 27  
 Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu  
 1 5 10 15

10 <210> 28  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 28  
 Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr  
 1 5 10 15

15 <210> 29  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 29  
 Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala  
 1 5 10 15

<210> 30  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

25 <400> 30  
 Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn  
 1 5 10 15

<210> 31  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 31  
 Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala  
 1 5 10 15

<210> 32  
 <211> 462  
 35 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 714 383 T3

<400> 32

Met Arg Asn Pro Leu Gly Leu Arg Phe Ser Thr Gly His Ala Leu Leu  
1 5 10 15

Ala Ser Ala Leu Ala Pro Pro Cys Ile Ile Ala Phe Leu Glu Thr Arg  
20 25 30

Tyr Trp Trp Ala Gly Ile Ala Leu Ala Ser Leu Gly Val Ile Val Ala  
35 40 45

Thr Val Thr Phe Tyr Gly Arg Arg Ile Thr Gly Trp Val Ala Ala Val  
50 55 60

Tyr Ala Trp Leu Arg Arg Arg Arg Arg Pro Pro Asp Ser Ser Ser Glu  
65 70 75 80

Pro Val Val Gly Ala Thr Val Lys Pro Gly Asp His Val Ala Val Arg  
85 90 95

Trp Gln Gly Glu Phe Leu Val Ala Val Ile Glu Leu Ile Pro Arg Pro  
100 105 110

Phe Thr Pro Thr Val Ile Val Asp Gly Gln Ala His Thr Asp Asp Met  
115 120 125

Leu Asp Thr Gly Leu Val Glu Glu Leu Leu Ser Val His Cys Pro Asp  
130 135 140

Leu Glu Ala Asp Ile Val Ser Ala Gly Tyr Arg Val Gly Asn Thr Ala  
145 150 155 160

Ala Pro Asp Val Val Ser Leu Tyr Gln Gln Val Ile Gly Thr Asp Pro  
165 170 175

ES 2 714 383 T3

Ala Pro Ala Asn Arg Arg Thr Trp Ile Val Leu Arg Ala Asp Pro Glu  
180 185 190

Arg Thr Arg Lys Ser Ala Gln Arg Arg Asp Glu Gly Val Ala Gly Leu  
195 200 205

Ala Arg Tyr Leu Val Ala Ser Ala Thr Arg Ile Ala Asp Arg Leu Ala  
210 215 220

Ser His Gly Val Asp Ala Val Cys Gly Arg Ser Phe Asp Asp Tyr Asp  
225 230 235 240

His Ala Thr Asp Ile Gly Phe Val Arg Glu Lys Trp Ser Met Ile Lys  
245 250 255

Gly Arg Asp Ala Tyr Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Pro Asp  
260 265 270

Val Trp Trp Ser Ala Arg Ala Asp His Thr Ile Thr Arg Val Arg Val  
275 280 285

Ala Pro Gly Met Ala Pro Gln Ser Thr Val Leu Leu Thr Thr Ala Asp  
290 295 300

Lys Pro Lys Thr Pro Arg Gly Phe Ala Arg Leu Phe Gly Gly Gln Arg  
305 310 315 320

Pro Ala Leu Gln Gly Gln His Leu Val Ala Asn Arg His Cys Gln Leu  
325 330 335

Pro Ile Gly Ser Ala Gly Val Leu Val Gly Glu Thr Val Asn Arg Cys  
340 345 350

Pro Val Tyr Met Pro Phe Asp Asp Val Asp Ile Ala Leu Asn Leu Gly  
355 360 365

Asp Ala Gln Thr Phe Thr Gln Phe Val Val Arg Ala Ala Ala Ala Gly  
370 375 380

Ala Met Val Thr Val Gly Pro Gln Phe Glu Glu Phe Ala Arg Leu Ile  
385 390 395 400

Gly Ala His Ile Gly Gln Glu Val Lys Val Ala Trp Pro Asn Ala Thr  
405 410 415

Thr Tyr Leu Gly Pro His Pro Gly Ile Asp Arg Val Ile Leu Arg His  
420 425 430

Asn Val Ile Gly Thr Pro Arg His Arg Gln Leu Pro Ile Arg Arg Val  
435 440 445

Ser Pro Pro Glu Glu Ser Arg Tyr Gln Met Ala Leu Pro Lys  
450 455 460

<210> 33  
<211> 446

5

ES 2 714 383 T3

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33

Val His Arg Ile Phe Leu Ile Thr Val Ala Leu Ala Leu Leu Thr Ala  
 1 5 10 15

Ser Pro Ala Ser Ala Ile Thr Pro Pro Pro Ile Asp Pro Gly Ala Leu  
 20 25 30

Pro Pro Asp Val Thr Gly Pro Asp Gln Pro Thr Glu Gln Arg Val Leu  
 35 40 45

Cys Ala Ser Pro Thr Thr Leu Pro Gly Ser Gly Phe His Asp Pro Pro  
 50 55 60

Trp Ser Asn Thr Tyr Leu Gly Val Ala Asp Ala His Lys Phe Ala Thr  
 65 70 75 80

Gly Ala Gly Val Thr Val Ala Val Ile Asp Thr Gly Val Asp Ala Ser  
 85 90 95

Pro Arg Val Pro Ala Glu Pro Gly Gly Asp Phe Val Asp Gln Ala Gly  
 100 105 110

Asn Gly Leu Ser Asp Cys Asp Ala His Gly Thr Leu Thr Ala Ser Ile  
 115 120 125

Ile Ala Gly Arg Pro Ala Pro Thr Asp Gly Phe Val Gly Val Ala Pro  
 130 135 140

Asp Ala Arg Leu Leu Ser Leu Arg Gln Thr Ser Glu Ala Phe Glu Pro  
 145 150 155 160

Val Gly Ser Gln Ala Asn Pro Asn Asp Pro Asn Ala Thr Pro Ala Ala  
 165 170 175

Gly Ser Ile Arg Ser Leu Ala Arg Ala Val Val His Ala Ala Asn Leu  
 180 185 190

Gly Val Gly Val Ile Asn Ile Ser Glu Ala Ala Cys Tyr Lys Val Ser  
 195 200 205

ES 2 714 383 T3

Arg Pro Ile Asp Glu Thr Ser Leu Gly Ala Ser Ile Asp Tyr Ala Val  
210 215 220

Asn Val Lys Gly Val Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Thr Gly Gly  
225 230 235 240

Asp Cys Val Gln Asn Pro Ala Pro Asp Pro Ser Thr Pro Gly Asp Pro  
245 250 255

Arg Gly Trp Asn Asn Val Gln Thr Val Val Thr Pro Ala Trp Tyr Ala  
260 265 270

Pro Leu Val Leu Ser Val Gly Gly Ile Gly Gln Thr Gly Met Pro Ser  
275 280 285

Ser Phe Ser Met His Gly Pro Trp Val Asp Val Ala Ala Pro Ala Glu  
290 295 300

Asn Ile Val Ala Leu Gly Asp Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Leu Gln  
305 310 315 320

Gly Arg Glu Gly Pro Val Pro Ile Ala Gly Thr Ser Phe Ala Ala Ala  
325 330 335

Tyr Val Ser Gly Leu Ala Ala Leu Leu Arg Gln Arg Phe Pro Asp Leu  
340 345 350

Thr Pro Ala Gln Ile Ile His Arg Ile Thr Ala Thr Ala Arg His Pro  
355 360 365

Gly Gly Gly Val Asp Asp Leu Val Gly Ala Gly Val Ile Asp Ala Val  
370 375 380

Ala Ala Leu Thr Trp Asp Ile Pro Pro Gly Pro Ala Ser Ala Pro Tyr  
385 390 395 400

Asn Val Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Val Glu Pro Gly Pro Asp Arg  
405 410 415

Arg Pro Ile Thr Ala Val Ala Leu Val Ala Val Gly Leu Thr Leu Ala  
420 425 430

Leu Gly Leu Gly Ala Leu Ala Arg Arg Ala Leu Ser Arg Arg  
435 440 445

<210> 34

<211> 103

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5

ES 2 714 383 T3

<400> 34

Met Thr Gly Phe Leu Gly Val Val Pro Ser Phe Leu Lys Val Leu Ala  
1 5 10 15

Gly Met His Asn Glu Ile Val Gly Asp Ile Lys Arg Ala Thr Asp Thr  
20 25 30

Val Ala Gly Ile Ser Gly Arg Val Gln Leu Thr His Gly Ser Phe Thr  
35 40 45

Ser Lys Phe Asn Asp Thr Leu Gln Glu Phe Glu Thr Thr Arg Ser Ser  
50 55 60

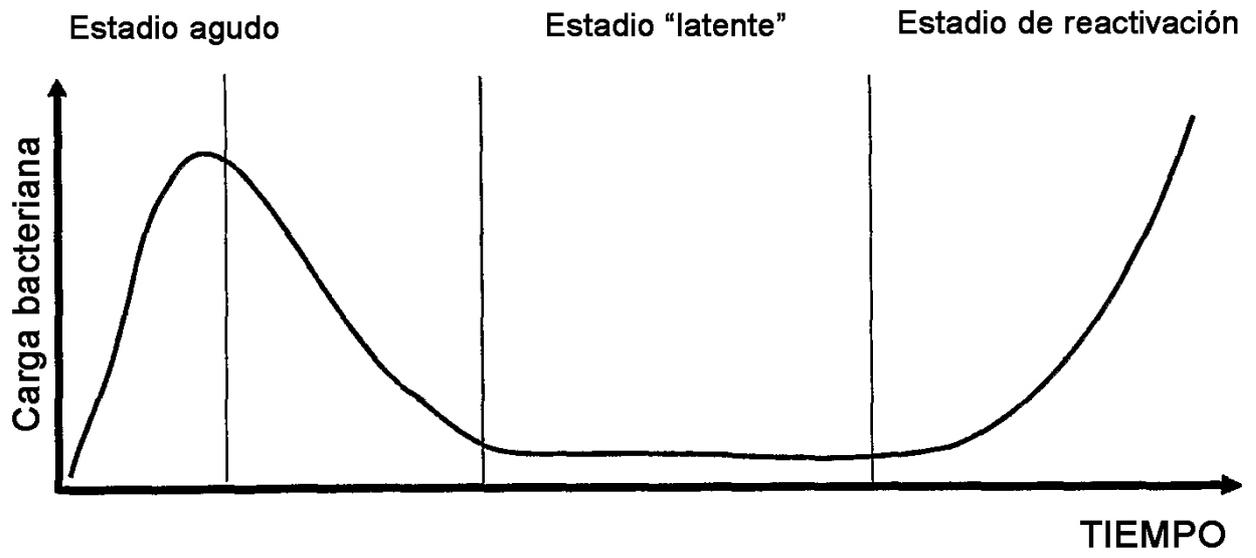
Thr Gly Thr Gly Leu Gln Gly Val Thr Ser Gly Leu Ala Asn Asn Leu  
65 70 75 80

Leu Ala Ala Ala Gly Ala Tyr Leu Lys Ala Asp Asp Gly Leu Ala Gly  
85 90 95

Val Ile Asp Lys Ile Phe Gly  
100

**REIVINDICACIONES**

1. Vacuna para la utilización en el bloqueo de la reactivación de la tuberculosis en individuos con infección latente por *M. tuberculosis*, que comprende un antígeno que se expresa constitutivamente durante la infección por *M. tuberculosis* o un ácido nucleico codificante de dicho antígeno, en el que el antígeno, perteneciente al sistema de excreción ESX-1, se selecciona del grupo que consiste en:
  - i) ESAT6, CFP10, Rv3614c, Rv3615c, EspR, Rv3868, Rv3869, Rv3870, Rv3871, Rv3872, Rv3873, Rv3876, Rv3877, Rv3878, Rv3879c, Rv3880c, Rv3881c, Rv3882c, Rv3883c y Rv3865,
  - ii) una parte inmunogénica que comprende un epítipo de una célula B o célula T de cualquiera de las secuencias en (i), y
  - iii) un análogo de secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90% respecto a cualquiera de las secuencias en (i) o (ii) y siendo simultáneamente inmunogénica mediante el bloqueo de la reactivación de la infección latente de tuberculosis al administrarla como vacuna terapéutica.
2. Vacuna para la utilización según la reivindicación 1, en la que los polipéptidos se fusionan con un antígeno expresado por bacterias en la familia de las micobacterias.
3. Vacuna para la utilización según la reivindicación 2, en la que la pareja de fusión es un antígeno que se expresa constitutivamente.
4. Vacuna para la utilización según la reivindicación 3, que comprende ESAT6 fusionado con CFP10.
5. Vacuna para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un sistema de administración adicional seleccionado de vacunas recombinantes vivas, que es organismos genéticamente modificados, tales como bacterias o virus que expresan genes micobacterianos, o sistemas de administración inmunogénica, tales como vacunas de ADN, es decir, plásmidos expresantes de genes o fragmentos génicos de las proteínas indicadas anteriormente, o vacunas de proteínas, es decir, las proteínas mismas o péptidos sintéticos derivados de las proteínas mismas administradas en un sistema de administración, tal como un adyuvante.
6. Vacuna para la utilización según la reivindicación 5, en la que el adyuvante comprende DDA/TDB y/o poli I:C
7. Vacuna para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia de aminoácidos es lipídada de manera que permite un efecto autoadyuvante del polipéptido.
8. Antígeno seleccionado del grupo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la utilización en el tratamiento de la tuberculosis latente.
9. Antígeno seleccionado del grupo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la utilización en la fabricación de una vacuna contra la reactivación de las infecciones latentes causadas por especies del complejo de tuberculosis seleccionado del grupo que consiste en *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*.
10. Antígeno para la utilización según la reivindicación 9, en el que dicha vacuna está destinada a la administración después de la infección en el estadio agudo y/o durante la infección en estadio latente.
11. Antígeno para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que la vacuna comprende una o más partes inmunogénicas tal como se definen en las reivindicaciones 1 a 4.



**Figura 1**

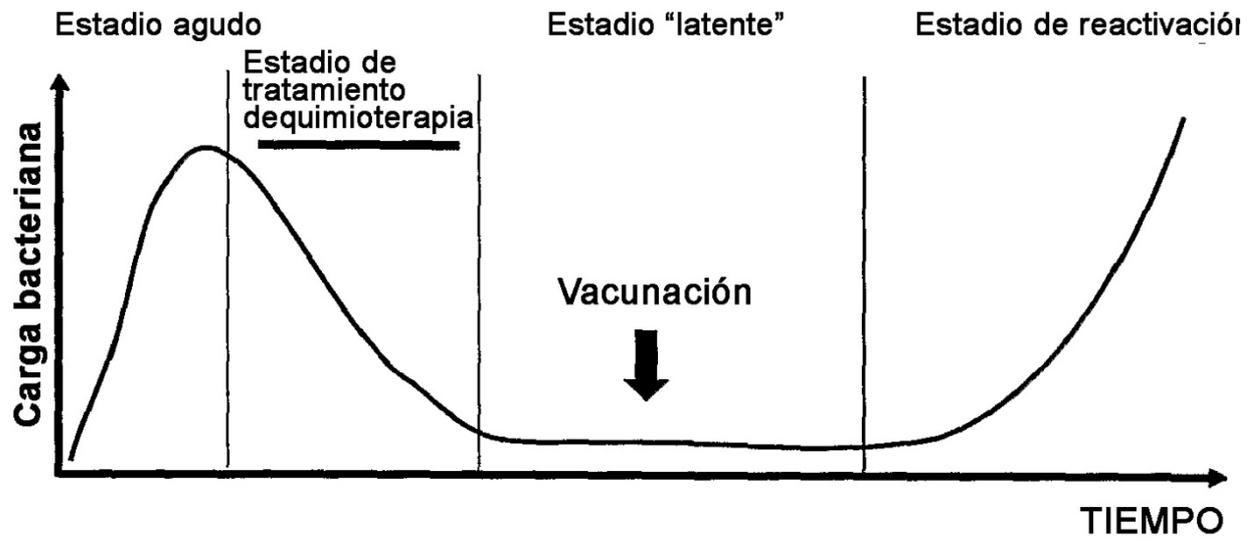


Figura 2

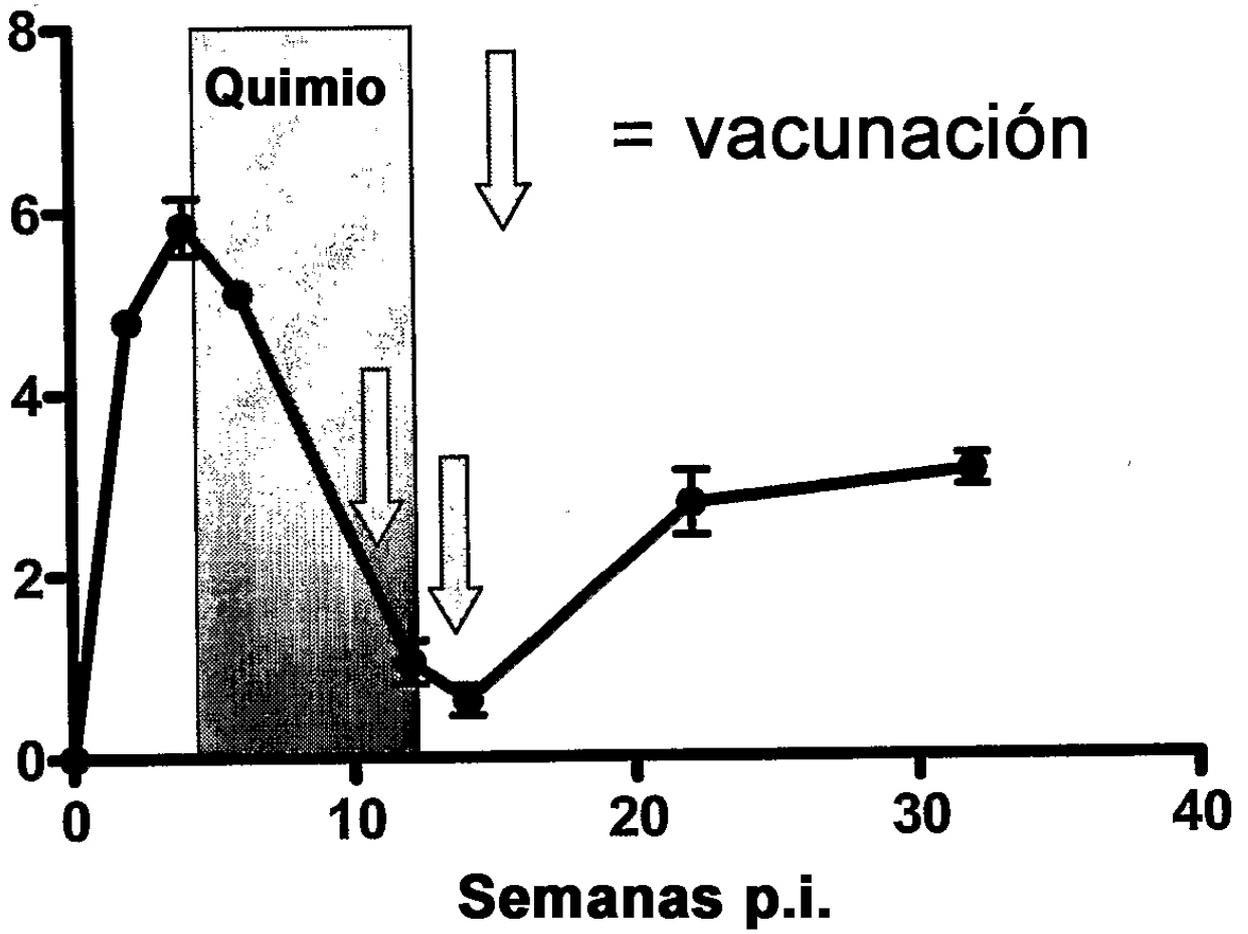


Figura 3

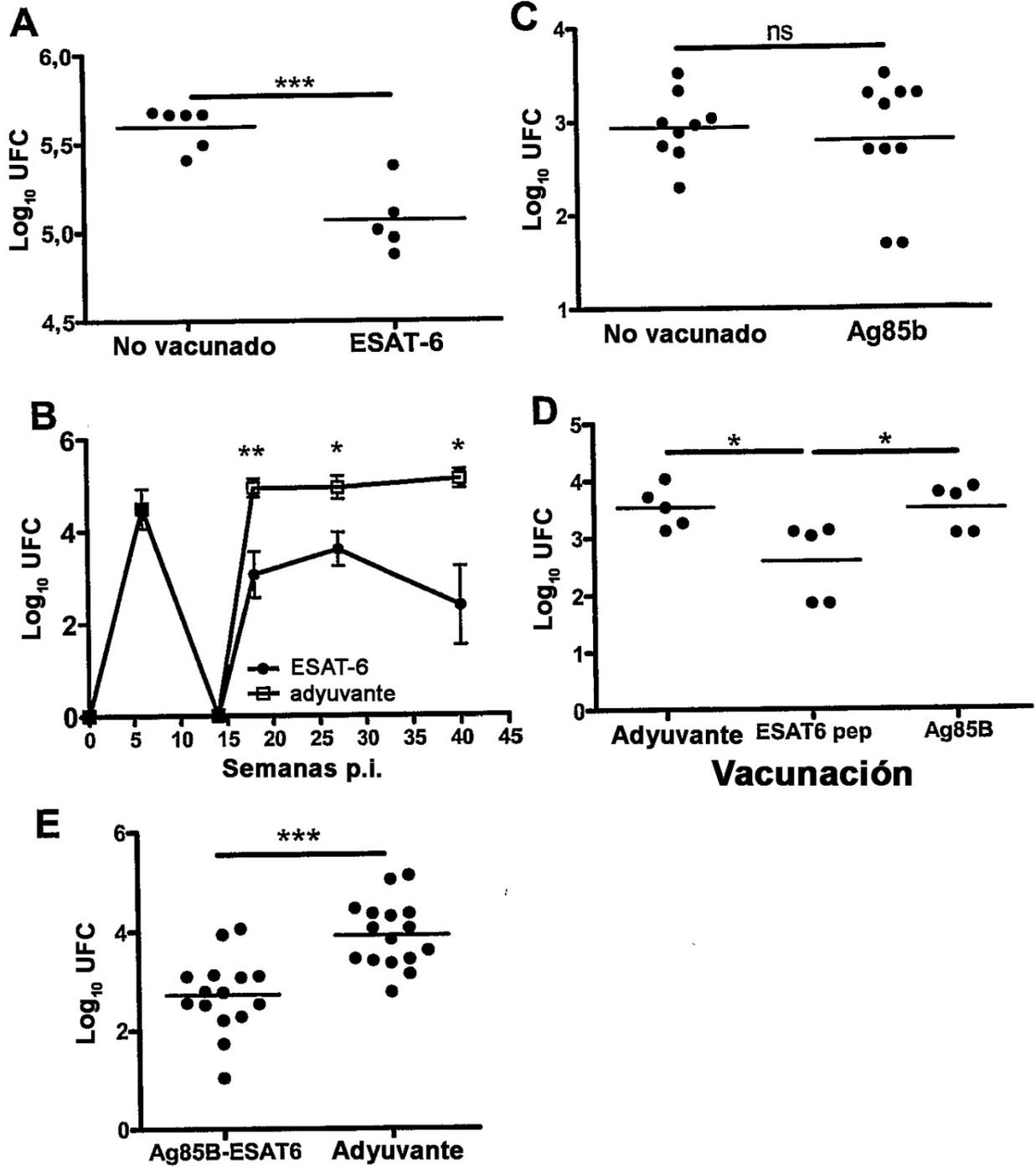


Figura 4

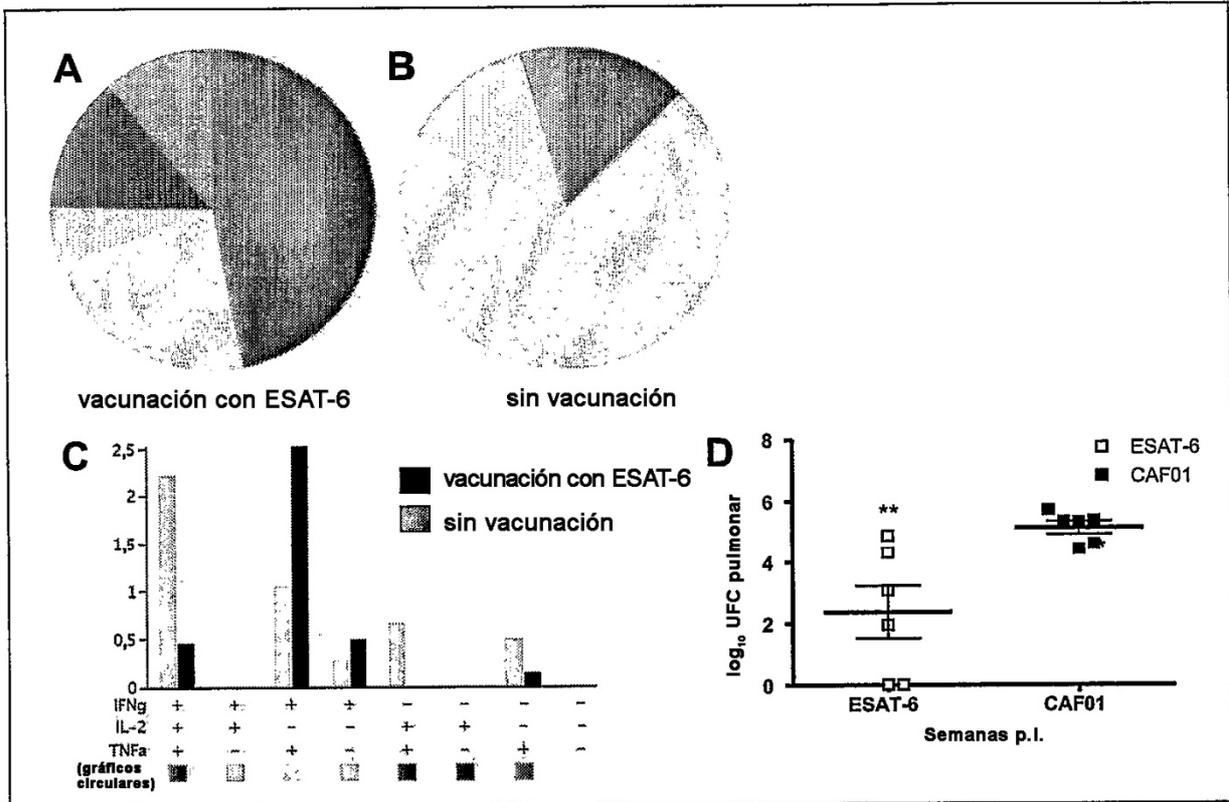


Figura 5

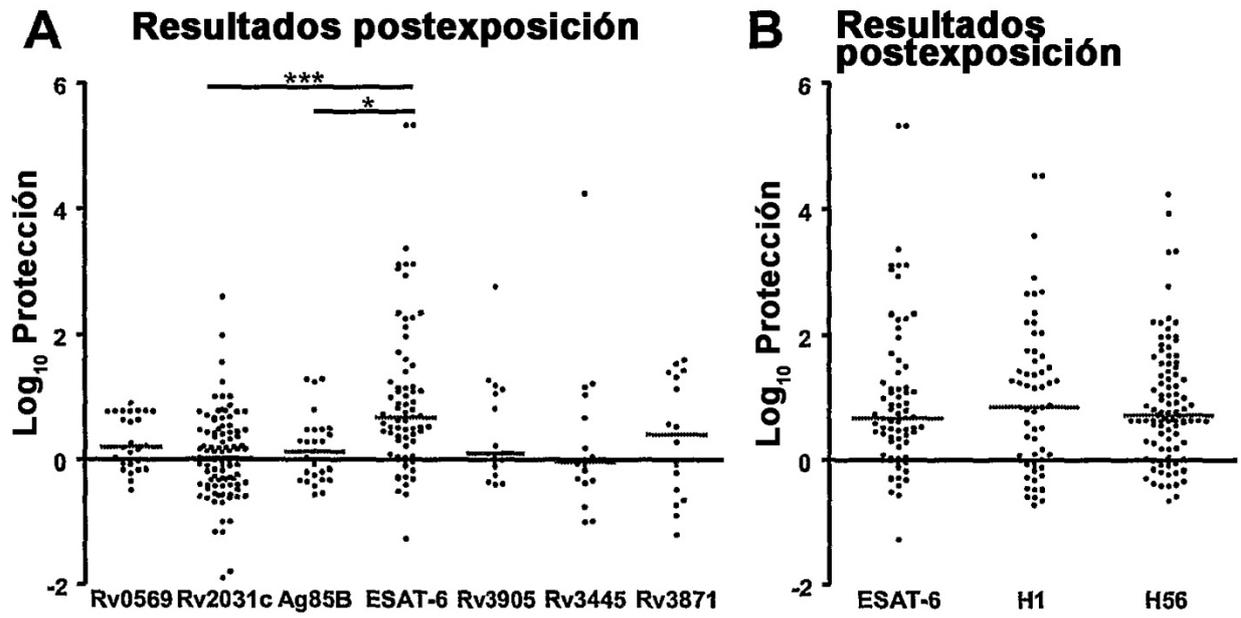


Figura 6

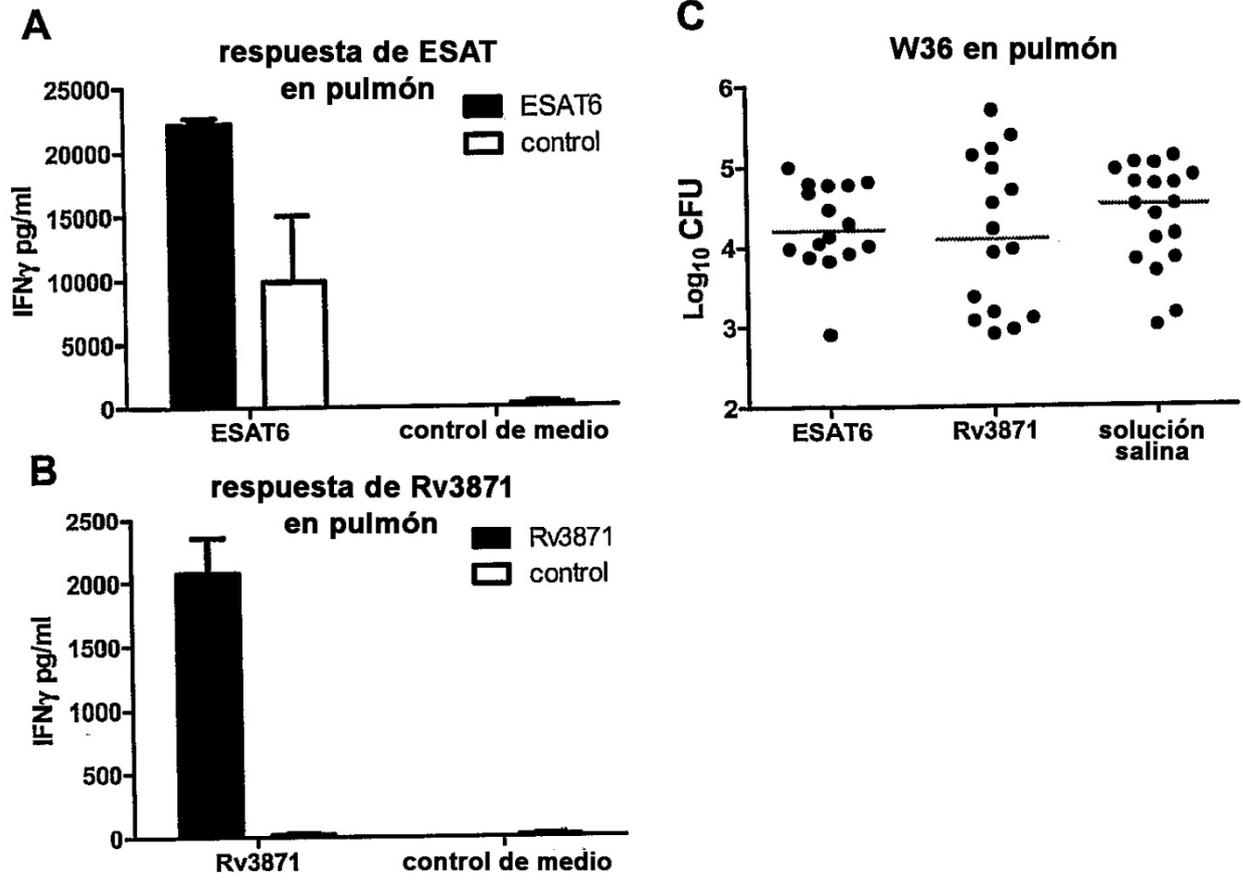


Figura 7