

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 423**

51 Int. Cl.:

A61K 39/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/EP2014/055144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140301**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14709975 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2968506**

54 Título: **Vacunas antimicobacterianas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361793522 P

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

31.03.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE GENÈVE (100.0%)
24 rue du Général-Dufour
1211 Genève 4, CH**

72 Inventor/es:

**BELNOUE, ELODIE ANNE FRANÇOISE;
DARBRE ABDELRAHMAN, STÉPHANIE
GABRIELLE;
KAMATH, ARUN THOMAS;
LAMBERT, PAUL;
SIEGRIST-JULLIARD, CLAIRE-ANNE y
PINSCHER, DANIEL DAVID**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 751 423 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas antimicobacterianas

1. Introducción

5 La descripción se refiere a arenavirus modificados genéticamente adecuados como vacunas contra infecciones por micobacterias. La invención se refiere a composiciones farmacéuticas para uso en métodos para el tratamiento de infecciones por micobacterias. Específicamente, se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas, vacunas y métodos para tratar infecciones en *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Antecedentes

10 La tuberculosis (TB) está provocada por la *Mycobacterium tuberculosis*. La TB se contagia y se propaga a través del aire. Se estima que alrededor de dos mil millones de personas, o un tercio de la población mundial, están infectadas con la bacteria y corren el riesgo de desarrollar la enfermedad. Alrededor del 5% de las personas infectadas se sienten mal de tuberculosis en los primeros dos años después de la infección. El otro 95% desarrolla una infección latente o 'dormida', que no es contagiosa, pero que aún puede convertirse en TB más adelante en la vida. El riesgo general de por vida para desarrollar TB después de la infección se estima en el 10% aproximadamente.

15 La tuberculosis pulmonar (pulmón) es la forma más común y más infecciosa de TB en todo el mundo. Sin embargo, la TB puede atacar cualquier parte del cuerpo. Según los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), hubo 8,8 millones de nuevos casos de TB en 2010 (informe de la OMS, 2011). En 2010, alrededor de 1,4 millones de personas murieron de tuberculosis, lo que equivale a aproximadamente 3800 muertes por día y una muerte cada 22 segundos. En 2009 hubo casi 10 millones de niños huérfanos debido a muertes por TB. El aumento de la movilidad de la población mundial, con más personas viajando a través de las fronteras, intensifica la propagación de las enfermedades infecciosas transmitidas por el aire. Si no se trata, cada persona con TB activa infecta de media de 10 a 15 personas cada año.

20 La TB afecta principalmente a adultos jóvenes en sus años más productivos. Aunque está relacionada con la pobreza y afecta sobre todo a los países en desarrollo, la tuberculosis es dominante en todos los continentes. Los síntomas de tuberculosis incluyen una tos persistente, dolor en el pecho, tos con sangre o esputo, debilidad, pérdida de peso, escalofríos, sudores nocturnos y fiebre.

25 Actualmente solo hay una vacuna contra la tuberculosis disponible en todo el mundo: Bacille Calmette-Guérin (BCG). Esta vacuna, utilizada desde 1921, se administra a más de 100 millones de bebés cada año y puede proteger a los niños de formas graves de tuberculosis. Sin embargo, la BCG tiene poca o ninguna eficacia en la prevención de la TB pulmonar en adultos (jóvenes), la forma más común y más infecciosa de tuberculosis. Además, existen serias preocupaciones de seguridad con respecto al uso de BCG en recién nacidos infectados por VIH. La carga de la enfermedad, que afecta a las economías de todo el mundo, se estima en cientos de miles de millones de dólares anualmente.

30 Las vacunas, generalmente aceptadas y probadas por ser tanto una forma muy eficiente como rentable de prevenir enfermedades infecciosas, pueden marcar la diferencia. Se necesitan urgentemente vacunas más efectivas y seguras para mejorar o reemplazar la BCG, ya que la tuberculosis sigue pasando factura. Los estudios de modelos muestran que sin nuevas vacunas, la TB nunca se puede eliminar. Nuevas vacunas, junto con diagnósticos más precisos y terapias farmacológicas más eficientes, salvarían decenas de millones de vidas. Las vacunas también serán especialmente cruciales en la lucha contra la tuberculosis multiresistente a los medicamentos (MDR-TB) y la tuberculosis extremadamente resistente a los medicamentos (XDR-TB), formas de TB que son caras y extremadamente difíciles o prácticamente imposibles de tratar.

35 El control de la infección de la tuberculosis micobacteriana (*Mtb*) depende principalmente de la respuesta de inmunidad mediada por células (CMI). Está ampliamente aceptado que las células T antibacterianas ejercen efectos protectores mediante la secreción de interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) para estimular los macrófagos infectados por bacterias. La *Mtb* se oculta de forma intracelular en las vacuolas de estos fagocitos y escapa de la degradación por la maquinaria lisosómica. Sin embargo tras la interacción afín con las células T antibacterianas, la estimulación resultante de los macrófagos infectados les permite matar y degradar sus patógenos intracelulares. Las células T CD4+ restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II se han identificado durante mucho tiempo como actores clave en este proceso. La evidencia más reciente indica que las células T CD8+ restringidas a MHC clase I también juegan un papel importante en la protección antibacteriana.

40 Abel Brian et al estudiaron la vacuna contra la tuberculosis AERAS-402 para inducir células T CD4+ y CD8+ en adultos. (*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol 181. pp1407-1417, 2010).

45 Por lo tanto, las nuevas estrategias de vacunación deben apuntar a inducir respuestas plurifuncionales de células T CD4+ y CD8+ (que coproducen IFN- γ y TNF- α) de gran magnitud. Existen diferencias muy significativas entre las diferentes plataformas de vectores, y sigue siendo impredecible qué vectores virales pueden cumplir de manera óptima estos requisitos.

55

3. Compendio de la invención

La descripción se refiere a una partícula de arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano.

- 5 La invención proporciona una partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso como una vacuna en un método para tratar o prevenir una infección con *M. tuberculosis* en un lactante, en donde la partícula comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano, en donde el antígeno micobacteriano es una proteína de fusión entre Ag85B y TB10.4, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y en donde el antígeno micobacteriano se fusiona a un péptido señal de un activador de plasminógeno tisular.
- 10 Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular es un péptido señal N-terminal.
- Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular dirige el direccionamiento al retículo endoplásmico.
- 15 Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7.
- Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular y la proteína de fusión comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.
- Según algunas realizaciones de la invención, un marco de lectura abierto del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.
- 20 Según algunas realizaciones de la invención, el marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.
- Según algunas realizaciones de la invención, la partícula de virus de la coriomeningitis comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.
- 25 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación y un vehículo farmacéuticamente inactivo para uso como una vacuna en un método para tratar o prevenir una infección con *M. tuberculosis* en un lactante, en donde la partícula comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano, en donde el antígeno micobacteriano es una proteína de fusión entre Ag85B y TB10.4, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y en donde el antígeno micobacteriano se fusiona a un péptido señal
- 30 de un activador de plasminógeno tisular.
- Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular es un péptido señal N-terminal.
- Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular dirige el direccionamiento al retículo endoplásmico.
- 35 Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7.
- Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular y la proteína de fusión comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.
- 40 Según algunas realizaciones de la invención, un marco de lectura abierto del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.
- Según algunas realizaciones de la invención, el marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.
- Según algunas realizaciones de la invención, la partícula de virus de la coriomeningitis comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.
- 45 En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno micobacteriano se selecciona del grupo de micobacterias que consta de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. colombiense*, *M. indicus pranii*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M.*
- 50

africanum, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensis*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *Acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*,
 5 *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M. canariense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M.*
 10 *duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenivorans*, *M. kumamotoense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense*, or *M. tokaiense*.

En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es una micolil transferasa o un fragmento de la misma. Por ejemplo, la micolil transferasa utilizada de acuerdo con la descripción descrita en la presente memoria puede constar de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno está codificado por la familia del gen *esat-6*. Más específicamente, el antígeno es TB10.3, TB12.9 o TB10.4 que pertenece a la familia del gen *esat-6*.

En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es TB10.4, Ag85B, un fragmento de TB10.4 o un fragmento de Ag85B. En una realización específica de la invención, el antígeno es una proteína de fusión entre TB10.4 y Ag85B. En ciertas realizaciones de la invención, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5.

En las realizaciones de la invención, el antígeno se fusiona a un péptido señal N-terminal de un activador de plasminógeno tisular. En ciertas realizaciones de la invención, el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.

El arnavirus utilizado de acuerdo con la invención descrita en la presente memoria es un virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación. En ciertas realizaciones de la invención, un marco de lectura abierto del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente. En una realización específica, el marco de lectura abierto que codifica el gen de la glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.

La descripción se refiere además a un virus que puede amplificar y expresar su información genética en una célula que ha sido infectada por el virus pero que no puede producir más partículas de la progenie infecciosa en una célula no complementaria. En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación que comprende un segmento genómico en donde el segmento genómico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 para uso como una vacuna (el segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:1 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:1 por uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN).

También se describe en la presente memoria una partícula de arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos 1639 a 3315 de la SEQ ID NO:11 (el segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:11 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:11 por uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN), y en donde el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano (el antígeno micobacteriano se puede fusionar a un péptido señal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico). También se describe en la presente memoria una partícula de arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de expresión cuya secuencia de aminoácidos es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por 1639 a 3315 de la SEQ ID NO:11 (el segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:11 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:11 por las uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN), y en donde el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano (el antígeno micobacteriano se puede fusionar a un péptido señal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico).

También se describe en la presente memoria una partícula de arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos 1640 a 3316 de la SEQ ID NO:12 (el segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:12 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:12 por uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN), y en donde el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano (el antígeno micobacteriano se puede fusionar a un péptido señal que dirige el

- antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico). También se describe en la presente memoria una partícula de arenavirus infeccioso deficiente en la replicación que comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de expresión cuya secuencia de aminoácidos es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por 1640 a 3316 de la SEQ ID NO:12 (el segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:12 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:12 por uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN), y en donde el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano (el antígeno micobacteriano se puede fusionar a un péptido señal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico).
- 5
- 10 En la presente memoria se describen composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, inmunogénicas o de vacunas, que comprenden un virus descrito en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente inactivo.
- También se describen en la presente memoria métodos para tratar o prevenir una infección por micobacterias en un paciente, que comprende administrar al paciente un virus, una composición farmacéutica, una composición inmunogénica o una vacuna descrita en la presente memoria. Además se describe en la presente memoria el uso de un virus, una composición farmacéutica, una composición inmunogénica o una vacuna descrita en la presente memoria para el tratamiento o prevención de una infección por micobacterias en un paciente. Por ejemplo, la infección por micobacterias es una infección con M. tuberculosis.
- 15

3.1 Convenciones y abreviaturas

tPA	Activador de plasminógeno tisular
20 Mtb	Mycobacterium tuberculosis
TB	Tuberculosis
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ORF	Marco de lectura abierto
25 GP	Glucoproteína
Z	Proteína matriz
NP	Nucleoproteína
UTR	Región no traducida
CD8	Grupo de diferenciación 8
30 CD4	Grupo de diferenciación 4
IFN-γ	Interferón-γ
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
CMI	Inmunidad mediada por células
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente a los medicamentos
35 XDR-TB	Tuberculosis extremadamente resistente a los medicamentos

4. Descripción del listado de secuencias

- SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos del segmento genómico rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4. El segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:1 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:1 por uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN.
- 40 SEQ ID NO:2 es la secuencia de nucleótidos para tPA-Ag85B-TB10.4 del ADNc.
- SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos para tPA-Ag85B-TB10.4.
- SEQ ID NO:4 es la secuencia de nucleótidos para Ag85B-TB10.4 del ADNc.
- SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos para Ag85B-TB10.4.

SEQ ID NO:6 es la secuencia de nucleótidos para el ADNc del tPA que incluye un grupo enlazador de seis nucleótidos.

SEQ ID NO:7 es la secuencia de aminoácidos para el péptido señal de tPA.

5 SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de un péptido antigénico para algunas células T CD4⁺ restringidas a H2-IA^b.

SEQ ID NO:9 es la secuencia de aminoácidos de un péptido antigénico para algunas células T CD8⁺ restringidas a H-2K^b utilizadas para la síntesis de MHC clase I dextramers.

SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de un péptido antigénico para algunas células T CD8⁺ restringidas a H-2K^b utilizadas para la reestimulación antes de la tinción intracelular de las citocinas por citometría de flujo.

10 SEQ ID NO:11 es la secuencia completa del segmento S del virus de la coriomeningitis linfocítica. El segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:11 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:11 por uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN.

15 SEQ ID NO:12 es la secuencia completa del segmento S del clon 13 del virus de la coriomeningitis linfocítica (GenBank: DQ361065.2). El segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:12 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:12 por uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN.

20 SEQ ID NO:13 es la secuencia completa del segmento L del clon 13 del virus de la coriomeningitis linfocítica, (GenBank: DQ361066.1). El segmento genómico esARN, la secuencia en la SEQ ID NO:13 se muestra para el ADN; sin embargo, el intercambio de todas las timidinas ("T") en la SEQ ID NO:13 por uridinas ("U") proporciona la secuencia deARN.

5. Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: Representación esquemática del genoma de arnavirus tipo salvaje. El genoma de arnavirus tipo salvaje consiste en un segmento deARN corto (1; ~3,4 kb) y uno grande (2; ~7,2 kb). El segmento corto lleva los marcos de lectura abiertos que codifican los genes de la nucleoproteína NP (3) y la glucoproteína GP (4). El segmento grande codifica laARN polimerasa L dependiente deARN (5) y los genes de la proteína matriz Z (6). Los arnavirus tipo salvaje se pueden volver deficientes en la replicación para generar vectores de vacunas sustituyendo el gen de la glucoproteína por antígenos de elección (7), contra los cuales se inducen respuestas inmunes.

30 Figura 2: Comparación de la inmunogenicidad de los vectores de vacuna en ratones rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 y rLCMV/Ag85B-TB10.4. El día 0 del experimento, se inmunizaron ratones C57BL/6 con 2×10^5 UFP o de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 (grupo 1) o de rLCMV/Ag85B-TB10.4 (grupo 2) por vía intravenosa. Los ratones control no se inmunizaron (grupo 3). La misma inmunización se repitió el día 28. El día 27 (panel A) y el día 38 (panel B) se midieron las células T CD8⁺ específicas de TB10.4 (IMYNYPAM) en sangre periférica mediante citometría de flujo utilizando MHC clase I dextramer. Las células que se unen a Dextramer se expresan como porcentaje de la población total de CD8⁺ (X en los paneles A y B). El día 56 del experimento, se sacrificaron los animales y se prepararon suspensiones de células individuales a partir del bazo de los animales. Se estimularon estas células con el péptido QIMYNYPAM derivado de TB10.4 que comprende la SEQ ID NO:10 y el péptido THSWEYWGAQLNAMKGDLS derivado de Ag85B que comprende la SEQ ID NO:8 para determinar interferón- γ y factor necrosis tumoral α (TNF- α) que coproducen las CD8⁺ (panel C), así como IFN- γ y TNF- α que coproducen las células T CD4⁺ (panel D), respectivamente. Para esto, se utilizaron técnicas de citometría de flujo y tinción de citocinas intracelulares estándar. Se expresan como un porcentaje las células que coproducen IFN- γ y TNF- α entre las células T CD8⁺ totales (Y en el panel C) o entre las células T CD4⁺ totales (Z en el panel D). Los símbolos representan ratones individuales. Los ratones del grupo 1 y del grupo 2 eran significativamente diferentes en todas las medidas, como se determinó utilizando el ensayo t de Student de dos colas no pareado ($p=0,0226$, $p=0,0108$, $p=0,0044$, $p=0,0001$ en los paneles A-D, respectivamente).

45 Figura 3: Comparación de la inmunogenicidad del vector de vacuna rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 administrado por vía intravenosa o subcutánea. El día 0 del experimento, se inmunizaron ratones C57BL/6 con 10^5 UFP de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 o a través de la vía intravenosa (grupo 1) o por vía subcutánea (grupo 2). Los ratones control no se inmunizaron (grupo 3). El día 11, los animales se sacrificaron y se prepararon suspensiones de células individuales a partir del bazo de estos animales. Se midieron las células T CD8⁺ específicas de TB10.4 (IMYNYPAM (SEQ ID NO:9)) por citometría de flujo utilizando MHC clase I dextramers. Las células que se unen a Dextramer se expresan como porcentaje de la población total de CD8⁺ (X en los paneles A). Se estimularon también las células del bazo con el péptido QIMYNYPAM derivado de TB10.4 que comprende la SEQ ID NO:10 y el péptido THSWEYWGAQLNAMKGDLS derivado de Ag85B que comprende la SEQ ID NO:8 para determinar IFN- γ y TNF- α que coproducen las células T CD8⁺ (panel B), así como IFN- γ y TNF- α que coproducen las células T CD4⁺ (panel C), respectivamente. Para esto, se utilizaron técnicas de citometría de flujo y tinción de citocinas intracelulares estándar. Se expresan como un porcentaje las células T CD8⁺ que producen IFN- γ específicas de

epítipo dentro de las células T CD8+ totales (Y en el panel B), así como las células que coproducen IFN- γ y TNF- α entre las células T CD4+ totales (Z en el panel C). Los símbolos representan ratones individuales.

Figura 4: Estudios de inmunización con el vector de vacuna rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 en ratones adultos y de 1 semana de edad. El día 0 del experimento, se inmunizaron ratones C57BL/6 adultos (grupo 1) y de 1 semana de edad (grupo 2) con 10^5 UFP de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 a través de la vía subcutánea. El día 10, los animales se sacrificaron y se prepararon suspensiones de células individuales a partir del bazo de estos animales. Se midieron las células T CD8+ específicas de TB10.4 (IMYNYPAM (SEQ ID NO:9)) por citometría de flujo utilizando MHC clase I dextramer. Las células que se unen a Dextramer se expresan como porcentaje de la población total de CD8+ (X en los paneles A) o como número total de células CD8+ que se unen a Dextramer en el bazo (Y en el panel B). Se estimularon también estas células con el péptido QIMYNYPAM derivado de TB10.4 que comprende la SEQ ID NO:10 y el péptido THSWEYWGAQLNAMKGDLS derivado de Ag85B que comprende la SEQ ID NO:8 para determinar interferón- γ específico de antígeno (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que coproducen las CD8+ (panel C), así como IFN- γ y TNF- α que coproducen las células T CD4+ (panel D), respectivamente. Para esto, se utilizaron técnicas de citometría de flujo y tinción de citocinas intracelulares estándar. Se expresan como un porcentaje las células que coproducen IFN- γ y TNF- α entre las células T CD8+ totales (Z en el panel C) o entre las células T CD4+ totales (XY en el panel D). Los símbolos representan ratones individuales.

6. Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describen métodos y composiciones para el tratamiento o prevención de infecciones de un sujeto con una micobacteria. Más específicamente, en la presente memoria se describen arnavirus infecciosos deficientes en la replicación que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano. Estos virus se pueden administrar a un sujeto para el tratamiento o prevención de una infección por micobacterias. La generación de vectores de arnavirus infecciosos y deficientes en la replicación para uso con la presente invención se describe con más detalle en la Sección 6.3.

La invención proporciona una partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso como una vacuna en un método para tratar o prevenir una infección con *M. tuberculosis* en un lactante, en donde la partícula comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano, en donde el antígeno micobacteriano es una proteína de fusión entre Ag85B y TB10.4, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y en donde el antígeno micobacteriano se fusiona a un péptido señal de un activador de plasminógeno tisular.

Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular es un péptido señal N-terminal.

Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular dirige el direccionamiento al retículo endoplásmico.

Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7.

Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular y la proteína de fusión comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.

Según algunas realizaciones de la invención, un marco de lectura abierto del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.

Según algunas realizaciones de la invención, el marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.

Según algunas realizaciones de la invención, la partícula de virus de la coriomeningitis comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación y un vehículo farmacéuticamente inactivo para uso como una vacuna en un método para tratar o prevenir una infección con *M. tuberculosis* en un lactante, en donde la partícula comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano, en donde el antígeno micobacteriano es una proteína de fusión entre Ag85B y TB10.4, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y en donde el antígeno micobacteriano se fusiona a un péptido señal de un activador de plasminógeno tisular.

Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular es un péptido señal N-terminal.

Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular dirige el direccionamiento al retículo endoplásmico.

Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7.

Según algunas realizaciones de la invención, el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular y la proteína de fusión comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.

- 5 Según algunas realizaciones de la invención, un marco de lectura abierto del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.

Según algunas realizaciones de la invención, el marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.

- 10 Según algunas realizaciones de la invención, la partícula de virus de la coriomeningitis comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.

En la presente memoria se describe un arenavirus modificado genéticamente, donde el arenavirus:

- i) es infeccioso;
- ii) no puede formar el virus de la progenie infecciosa en una célula no complementaria (es decir, una célula que no expresa la funcionalidad que falta del arenavirus deficiente en la replicación y provoca que sea deficiente en la replicación);
- 15 iii) es capaz de replicar su genoma y expresar su información genética; y
- iv) codifica un antígeno micobacteriano o un fragmento del mismo.

Un arenavirus modificado genéticamente descrito en la presente memoria es infeccioso, es decir, se puede unir a una célula huésped y liberar su material genético en la célula huésped. Un arenavirus modificado genéticamente descrito en la presente memoria es deficiente en la replicación, es decir, el arenavirus no puede producir más partículas de la progenie infecciosa en una célula no complementaria. En particular, se modifica el genoma del arenavirus (p. ej., por delección o inactivación funcional de un marco de lectura abierto) de manera que un virus que lleva el genoma modificado ya no pueda producir virus de la progenie infecciosa. Una célula no complementaria es una célula que no proporciona la funcionalidad que se ha eliminado del arenavirus deficiente en la replicación mediante la modificación de su genoma (p. ej., si el marco de lectura abierto que codifica la proteína GP se elimina o se inactiva funcionalmente, una célula no complementaria no proporciona la proteína GP). Sin embargo, un arenavirus modificado genéticamente descrito en la presente memoria es capaz de producir virus de la progenie infecciosa en células complementarias. Las células complementarias son células que proporcionan la funcionalidad que se ha eliminado del arenavirus deficiente en la replicación mediante la modificación de su genoma (p. ej., si el marco de lectura abierto que codifica la proteína GP se elimina o se inactiva funcionalmente, una célula complementaria proporciona la proteína GP). Un arenavirus modificado genéticamente descrito en la presente memoria amplifica y expresa su información genética en una célula que ha sido infectada por el virus. Un arenavirus modificado genéticamente descrito en la presente memoria comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano tal como los antígenos micobacterianos descritos en la Sección 6.2.

35 También se describe en la presente memoria un arenavirus modificado genéticamente en el cual un marco de lectura abierto (ORF) del genoma de arenavirus se elimina o se inactiva funcionalmente de manera que el virus resultante no pueda producir más partículas de virus de la progenie infecciosa. Una partícula de arenavirus que comprende un genoma modificado genéticamente en el cual se puede producir un marco de lectura abierto (ORF) eliminado o inactivado funcionalmente en células complementarias (es decir, en células que expresan el marco de lectura abierto arenaviral que se ha eliminado o inactivado funcionalmente) (véase Sección 6.3) El material genético de las partículas de arenavirus resultantes se puede transferir tras la infección de una célula huésped en la célula huésped, en donde se puede expresar y amplificar el material genético. Además, el genoma de las partículas de arenavirus modificado genéticamente codifica un antígeno micobacteriano que se puede expresar en la célula huésped.

45 En ciertos aspectos de la descripción, el ORF que codifica el gen de la glucoproteína (GP) del arenavirus se elimina para generar un arenavirus deficiente en la replicación para uso con la presente invención. En un aspecto específico de la descripción, el arenavirus deficiente en la replicación comprende un segmento genómico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno se fusiona a un péptido señal N-terminal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico (RE) de la célula que está infectada con el arenavirus. Por lo tanto, en ciertos aspectos de la descripción, una partícula de arenavirus modificado genéticamente comprende un segmento genómico que a) tiene una delección o inactivación funcional de un marco de lectura abierto que está presente en la forma de tipo salvaje del segmento genómico; y b) codifica (o en paralelo o en antiparalelo) un antígeno micobacteriano (véase Sección 6.3).

55 En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno codificado por el ácido nucleico que se inserta en el genoma del arenavirus deficiente en la replicación puede codificar, por ejemplo, un antígeno micobacteriano que incluye, pero no

se limita a TB10.4, Ag85B, un fragmento de TB10.4, o un fragmento de Ag85B. Según la invención, el péptido señal N-terminal fusionado con los antígenos descritos en la presente memoria es el péptido señal del activador de plasminógeno tisular. Se proporciona una descripción más detallada de los antígenos y los péptidos señal descritos en la presente memoria en la Sección 6.2.

- 5 En ciertos aspectos de la descripción, los arenavirus utilizados en la presente memoria pueden ser virus del Viejo Mundo, por ejemplo, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). Una descripción más detallada de los arenavirus descritos en la presente memoria se proporciona en la Sección 6.1.

En la presente memoria se describen ácidos nucleicos que codifican el genoma de tales arenavirus deficientes en la replicación. En ciertos aspectos, una partícula de arenavirus infeccioso deficiente en la replicación comprende un segmento genómico que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1. En la presente memoria se proporcionan sistemas de vectores basados en LCMV que comprenden uno o dos de los plásmidos de vectores descritos en la presente memoria. También se describen en la presente memoria líneas celulares, cultivos y métodos de cultivo de células infectadas con ácidos nucleicos, vectores y composiciones. La descripción más detallada de los ácidos nucleicos, sistemas de vectores y líneas celulares descritas en la presente memoria se describe en la Sección 6.4.

La descripción se refiere a dichos arenavirus modificados genéticamente deficientes en la replicación adecuados como vacunas y a métodos para utilizar dichos arenavirus en la vacunación y tratamiento o prevención de infecciones por micobacterias. La descripción más detallada de los métodos de uso de dichos arenavirus descritos en la presente memoria se proporciona en la Sección 6.5.

- 20 6.1 Vectores de arenavirus infecciosos deficientes en la replicación que expresan un antígeno micobacteriano

Los arenavirus para uso con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden ser virus del Viejo Mundo, por ejemplo, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Mobala, virus Mopeia o virus Ippy, o virus del Nuevo Mundo, por ejemplo, virus Amapari, virus Flexal, virus Guanarito, virus Junin, virus latino, virus Machupo, virus Oliveros, virus Paraná, virus Pichinde, virus Pirital, virus Sabiá, virus Tacaribe, virus Tamiami, virus Bear Canyon o virus Whitewater Arroyo. El arenavirus modificado genéticamente se puede generar como se describe en la Sección 6.3.

El genoma de arenavirus de tipo salvaje consiste en un segmento deARN corto (1; ~3,4kb) y uno grande (2; ~7,2kb). El segmento corto lleva los marcos de lectura abiertos que codifican los genes de nucleoproteína NP (3) y glucoproteína GP (4). El segmento grande codifica laARN polimerasa L dependiente deARN (5) y los genes de la proteína matriz Z (6). Los arenavirus de tipo salvaje se pueden volver deficientes en la replicación para generar vectores de vacunas sustituyendo el gen de la glucoproteína por antígenos micobacterianos (7), contra los cuales se inducen respuestas inmunes.

Los vectores de arenavirus infecciosos deficientes en la replicación que expresan un antígeno micobacteriano se pueden utilizar para inmunizar (de manera preventiva) o tratar (de manera inmunoterapéutica) sujetos contra infecciones por micobacterias. Un vector arenavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano que se puede utilizar para inmunizar (de manera preventiva) o tratar (de manera inmunoterapéutica) sujetos contra una infección con Mycobacterium tuberculosis.

Se sabe que la enfermedad por arenavirus y la inmunosupresión en la infección por arenavirus de tipo salvaje son el resultado de la replicación viral no controlada. Suprimiendo la replicación, es decir, la capacidad de producir partículas de virus de la progenie infecciosa de vectores de arenavirus eliminando de su genoma, p. ej. el gen de Z que se requiere para la liberación de partículas, o el gen de la GP el cual se requiere para la infección de las células diana, el número total de células infectadas puede estar limitado por el inóculo administrado, p. ej., a un vacunado, o transmitido accidentalmente al personal involucrado en aplicaciones médicas o biotecnológicas, o a animales. Por lo tanto, suprimir la replicación de los vectores de arenavirus evita la patogénesis como resultado de la transmisión intencionada o accidental de las partículas de vector. En esta invención, un aspecto importante consiste en explotar la necesidad anterior de suprimir la replicación de un modo beneficioso con el propósito de expresar un antígeno micobacteriano.

Una partícula de arenavirus se puede volver deficiente en la replicación por modificación genética de su genoma. Dichas modificaciones del genoma pueden incluir:

- 50 • deleción de un marco de lectura abierto (p. ej., el marco de lectura abierto que codifica la proteína GP, NP, L o Z);
- inactivación funcional de un marco de lectura abierto (p. ej., el marco de lectura abierto que codifica la proteína GP, NP, L o Z). Por ejemplo, esto se puede lograr introduciendo una mutación de sentido erróneo o sin sentido.
- mutagénesis de uno de los terminales 5' o 3' de uno de los segmentos genómicos;
- 55 • mutagénesis de una región intergénica (es decir, del segmento genómico L o el S).

Un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria es un virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en donde el segmento S del virus se modifica sustituyendo el marco de lectura abierto que codifica la proteína GP, se reemplaza con un marco de lectura abierto que codifica un antígeno de la *Mycobacterium tuberculosis*. En ciertos aspectos específicos de la descripción, el antígeno micobacteriano se fusiona a un péptido señal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico.

El genoma del vector arnavirus de tipo salvaje (Figura 1) se puede diseñar para conservar al menos los elementos reguladores esenciales en las regiones no traducidas (UTRs) 5' y 3' de ambos segmentos, y/o también las regiones intergénicas (IGRs). Sin estar limitados por la teoría, los factores de transacción mínimos para la expresión génica en las células infectadas permanecen en el genoma del vector como marcos de lectura abiertos que se pueden expresar, pero se pueden colocar de manera diferente en el genoma y se pueden colocar bajo el control de un promotor diferente al natural, o se pueden expresar a partir de sitios internos de entrada al ribosoma. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un antígeno micobacteriano se transcribe de uno de los promotores de arnavirus endógenos (es decir, 5' UTR, 3' UTR del segmento S, 5' UTR, 3' UTR del segmento L). Alternativamente, el ácido nucleico que codifica un antígeno micobacteriano se expresa a partir de secuencias promotoras heterólogas introducidas que se pueden leer por laARN polimerasa vírica dependiente deARN, por laARN polimerasa I celular,ARN polimerasa II oARN polimerasa III, tal como duplicaciones de secuencias del promotor vírico que se encuentran de forma natural en las UTRs víricas, el promotor deARN ribosómico 28S, el promotor de beta-actina o el promotor deARN ribosómico 5S, respectivamente. Los ácidos ribonucleicos que codifican para antígenos micobacterianos se pueden transcribir y traducir o por sí mismos o como leídos por fusión a marcos de lectura abiertos de proteínas del arnavirus, y se puede mejorar la expresión de proteínas en la célula huésped introduciendo en la secuencia de transcripción viral en el(los) lugar(es) apropiado(s) uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, sitios internos de entrada al ribosoma.

En ciertos aspectos de la descripción, se describe en la presente memoria una partícula de arnavirus (p. ej., LCMV) en la cual el marco de lectura abierto que codifica la GP del segmento genómico S se sustituye con una secuencia de nucleótidos que codifica:

- Un péptido señal fusionado a un antígeno micobacteriano para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- Un péptido señal fusionado a una micolil transferasa de una micobacteria o un fragmento de la misma para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- Un péptido señal fusionado a la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- Un péptido señal fusionado a un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- Un péptido señal fusionado a (i) la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C y (ii) un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* para el direccionamiento al retículo endoplásmico ; o
- En el siguiente orden de N-terminal a C-terminal: un péptido señal fusionado a (i) la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C y (ii) un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- En el siguiente orden de N-terminal a C-terminal: un péptido señal fusionado a (i) un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*; y (ii) la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C para el direccionamiento al retículo endoplásmico.

6.2 Antígenos micobacterianos

En ciertos aspectos de la descripción, los antígenos para uso con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son antígenos micobacterianos.

En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno micobacteriano es un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. avium*, *M. avium* paratuberculosis, *M. avium* silvaticum, *M. avium* "hominissuis", *M. colombiense*, *M. indicus pranii*, *M. asiaticum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii*, *M. triplex*, *M. genavense*, *M. florentinum*, *M. lentiflavum*, *M. palustre*, *M. kubicae*, *M. parascrofulaceum*, *M. heidelbergense*, *M. interjectum*, *M. simiae*, *M. branderi*, *M. cookii*, *M. celatum*, *M. bohemicum*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. lepromatosis*, *M. africanum*, *M. botniense*, *M. chimaera*, *M. conspicuum*, *M. doricum*, *M. farcinogenes*, *M. heckeshornense*, *M. intracellulare*, *M. lacus*, *M. marinum*, *M. monacense*, *M. montefiorensis*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. tusciae*, *M. xenopi*, *M. intermedium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. bolletii*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *Acetamidolyticum*, *M. boenickei*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense*, *M. brisbanense*, *M. cosmeticum*, *M. parafortuitum*, *M. austroafricanum*, *M. diernhoferi*, *M. hodleri*, *M. neoaurum*, *M. frederiksbergense*, *M. aurum*, *M. vaccae*, *M. fallax*, *M. confluentis*, *M. flavescens*, *M. madagascariense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*, *M. thermoresistibile*, *M. gadium*, *M. komossense*, *M. obuense*, *M. sphagni*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. brumae*, *M. canariense*, *M. chubuense*, *M. conceptionense*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. gilvum*, *M. hassiacum*, *M. holsaticum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. moriokaense*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. vanbaalenii*, *M. pulveris*, *M. arosiense*, *M. aubagnense*, *M. caprae*, *M. chlorophenolicum*, *M. fluoroanthenivorans*, *M. kumamotoense*, *M. novocastrense*, *M. parmense*, *M. phocaicum*, *M. poriferae*, *M. rhodesiae*, *M. seoulense* o *M. tokaiense*.

En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es una micolil transferasa o un fragmento de la misma. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es un fragmento de al menos al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de un producto génico de un gen de la micolil transferasa de una micobacteria o un fragmento de la misma. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es un fragmento que se puede identificar utilizando una variedad de métodos publicados para la predicción de determinantes antigénicos (véase, p. ej., Jameson B.A. and Wolf H., *Comput Appl Biosci.* 1988 March;4(1):181-186; Pellequer J.L. and Westhof E., *J Mol Graph.* 1993 Sep;11(3):204-10, 191-192; and Kolaskar A.S. and Tongaonkar P.C., *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4). En ciertos aspectos más específicos de la descripción, la micolil transferasa es la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C o un fragmento de la misma.

En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno está codificado por un gen de la familia del gen *esat-6*. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75 o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* o un fragmento del mismo. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es un fragmento que se puede identificar utilizando una variedad de métodos publicados para la predicción de determinantes antigénicos (véase, p. ej., Jameson B.A. and Wolf H., *Comput Appl Biosci.* 1988 March;4(1):181-186; Pellequer J.L. and Westhof E., *J Mol Graph.* 1993 Sep;11(3):204-10, 191-192; and Kolaskar A.S. and Tongaonkar P.C., *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4).

En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es TB10.3, TB12.9 o TB10.4 o un fragmento del mismo que pertenece a la familia del gen *esat-6*. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es TB10.4, Ag85B, un fragmento de TB10.4 o un fragmento de Ag85B.

En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es una proteína de fusión entre TB10.4 y Ag85B. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno es al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o al menos 500 aminoácidos de longitud. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno está codificado por una secuencia de ácido nucleico que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:4. En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:5.

En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno descrito en la presente memoria se fusiona a un péptido señal. Tales péptidos señal que se pueden fusionar con los antígenos descritos en la presente memoria incluyen:

Un péptido señal fusionado a un antígeno micobacteriano para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o

Un péptido señal fusionado a una micolil transferasa de una micobacteria o un fragmento de la misma para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o

Un péptido señal fusionado a la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o

Un péptido señal fusionado a un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o

Un péptido señal fusionado a (i) la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M.*

tuberculosis Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C y (ii) un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* para el direccionamiento al retículo endoplásmico ; o

5 En el siguiente orden de N-terminal a C-terminal: un péptido señal fusionado a (i) la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C y (ii) un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o

10 En el siguiente orden de N-terminal a C-terminal: un péptido señal fusionado a (i) un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*; y (ii) la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C para el direccionamiento al retículo endoplásmico.

15 En ciertos aspectos de la descripción, el antígeno descrito en la presente memoria se fusiona a un péptido señal N-terminal. En ciertos aspectos de la descripción, está presente un sitio de escisión entre el antígeno y el péptido señal. En ciertos aspectos más específicos de la descripción, la escisión de la proteasa entre el péptido señal y el antígeno da como resultado antígenos libres con un terminal N preciso (es decir, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, al menos 99% o 100% del antígeno liberado tienen la misma secuencia de aminoácidos N-terminal). En ciertos aspectos de la descripción, el péptido señal N-terminal dirige el direccionamiento del antígeno descrito en la presente memoria al retículo endoplásmico de la célula que está infectada con el arnavirus. En ciertos aspectos de la descripción, el péptido señal N-terminal que dirige el direccionamiento del antígeno al retículo endoplásmico incluye, pero no se limita a, el péptido señal del factor de crecimiento nervioso, *midkina*, *LAMP1*, *LIMPII*, *endotubina* o el gen factor negativo (*Nef*) (véase, p. ej., *Ladunga I.*, *Curr Opin Biotechnol.* 2000 Feb; 11(1):13-8).

20 El péptido señal que se fusiona al antígeno descrito en la presente memoria puede ser un activador de plasminógeno tisular (*tPA*). El péptido señal de *tPA* para uso con la presente invención puede ser codificado por una secuencia de ácido nucleico que se alinea con al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 o al menos 70 nucleótidos de la SEQ ID NO:6 como se determina sobre toda la longitud de la secuencia de ácido nucleico del péptido señal de *tPA* utilizando el software de alineación *BLAST*. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que se alinea con al menos 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 o al menos 24 aminoácidos de la SEQ ID NO:7 según se determina sobre toda la longitud del péptido señal utilizando el software de alineación *BLAST*.

30 La fusión péptido señal-antígeno puede ser al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o al menos 500 aminoácidos de longitud. La fusión péptido señal-antígeno puede ser codificada por una secuencia de ácido nucleico que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:2. La fusión péptido señal-antígeno puede comprender una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:3.

35 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un antígeno micobacteriano se pueden introducir en el genoma de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación por sustitución de la secuencia de ácido nucleico del marco de lectura abierto (*ORF*) de la glucoproteína *GP*, la proteína de matriz *Z*, la nucleoproteína *NP* o la proteína polimerasa *L*. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno micobacteriano se fusiona con el marco de lectura abierto (*ORF*) de la glucoproteína *GP*, la proteína matriz *Z*, la nucleoproteína *NP* o la proteína polimerasa *L*. La secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno micobacteriano, una vez insertada en el genoma de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación, se puede transcribir y/o expresar bajo el control de los cuatro promotores de arnavirus (5' *UTR* y 3' *UTR* del segmento *S*, y 5' *UTR* y 3' *UTR* del segmento *L*), así como los ácidos ribonucleicos que se pueden insertar con elementos reguladores que se pueden leer mediante la *ARN* polimerasa vírica dependiente de *ARN*, *ARN* polimerasa I celular, *ARN* polimerasa II o *ARN* polimerasa III, tal como duplicaciones de secuencias del promotor vírico que se encuentran de forma natural en las *UTRs* víricas, el promotor de *ARN* ribosómico 28S, el promotor de beta-actina o el promotor de *ARN* ribosómico 5S, respectivamente. Los ácidos nucleicos que codifican el antígeno micobacteriano se pueden transcribir y/o expresar o por sí mismos o como leídos por fusión a marcos de lectura abiertos de arnavirus y genes, respectivamente, y/o en combinación con uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, sitios internos de entrada de ribosomas.

40 En un aspecto de la descripción, el antígeno es uno que es útil para la prevención de enfermedades infecciosas. En un aspecto específico de la descripción, los antígenos se derivan de la *Mycobacterium tuberculosis*.

45 El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por secuencias de ácidos nucleicos que codifican un antígeno micobacteriano. El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por secuencias de ácidos nucleicos que codifican el antígeno que es un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de un producto génico de un gen de la micolil

transferasa de una micobacteria o un fragmento de la misma. El antígeno puede ser un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75 o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* o un fragmento del mismo. El fragmento de antígeno se puede identificar utilizando una variedad de métodos publicados para la predicción de determinantes antigénicos (véase, p. ej., Jameson B.A. and Wolf H., *Comput Appl Biosci.* 1988 March;4(1):181-186; Pellequer J.L. and Westhof E., *J Mol Graph.* 1993 Sep;11(3):204-10, 191-192; and Kolaskar A.S. and Tongaonkar P.C., *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):172-4).

En ciertos aspectos de la descripción, el marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se sustituye por secuencias de ácidos nucleicos que codifican antígenos que incluyen, pero no se limitan a, TB10.4, Ag85B, un fragmento de TB10.4 o un fragmento de Ag85B.

El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por secuencias de ácidos nucleicos que codifican un antígeno que es una proteína de fusión entre TB10.4 y Ag85B. El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por secuencias de ácidos nucleicos que codifican un antígeno que es al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o al menos 500 aminoácidos de longitud. El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por una secuencia de ácido nucleico que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:4. El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por una secuencia de ácido nucleico que codifican para un aminoácido que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:5.

El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por secuencias de ácidos nucleicos que codifican un antígeno que se fusiona a un péptido señal N-terminal para dirigir el direccionamiento del antígeno descrito en la presente memoria al retículo endoplásmico de la célula que está infectada con el arnavirus. El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por una fusión péptido señal-antígeno que es al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o al menos 500 aminoácidos de longitud. El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por una secuencia de ácido nucleico que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO:2. El marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del arnavirus se puede sustituir por una secuencia de ácido nucleico que codifica para un aminoácido que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:3.

6.3 Generación del arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano

En general, las partículas de arnavirus se pueden producir de forma recombinante mediante técnicas de genética inversa estándar como se describen para LCMV (L. Flatz, A. Bergthaler, J. C. de la Torre and D. D. Pinschewer, *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4663-4668, 2006; A. B. Sanchez and J. C. de la Torre, *Virology* 350:370, 2006; E. Ortiz-Riano, B.Y. Cheng, J. C. de la Torre, L. Martínez-Sobrido. *J Gen Virol.* 2013 Jan 30. Epub ahead of print). Estas técnicas se pueden utilizar para generar arnavirus infecciosos deficientes en la replicación, sin embargo, el genoma del virus rescatado se modifica como se describe en la Sección 6.1. Estas modificaciones pueden ser: i) uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, de los cuatro marcos de lectura abiertos del arnavirus (glucoproteína (GP); nucleoproteína (NP); la proteína matriz Z; laARN polimerasa L dependiente deARN) se eliminan o se desactivan funcionalmente para evitar la formación de partículas infecciosas en células normales, no obstante todavía permiten la expresión génica en células huésped infectadas por el vector arnavirus; y ii) se pueden introducir ácidos nucleicos que codifican para antígenos micobacterianos. Los virus infecciosos deficientes en la replicación como se describe en la presente memoria se pueden producir como se describe en la publicación de la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2009/083210 (Numero de aplicacion PCT/EP2008/010994).

Una vez generados a partir de ADNc, los arnavirus infecciosos deficientes en la replicación se pueden multiplicar en las células complementarias. Las células complementarias son células que proporcionan la funcionalidad que se ha eliminado del arnavirus deficiente en la replicación mediante la modificación de su genoma (p. ej., si el marco de lectura abierto que codifica la proteína GP se elimina o se inactiva funcionalmente, una célula complementaria proporciona la proteína GP).

Debido a la eliminación o inactivación funcional de uno o más de los genes virales en los vectores de arnavirus (aquí se tomará como un ejemplo la delección de la glucoproteína, GP), los vectores de arnavirus se pueden generar y expandir en células que proporcionan en trans el(los) gen(es) viral(es) eliminado(s), p. ej., la GP en el presente ejemplo. Dicha línea celular complementaria, en lo sucesivo denominada como células-C, se genera transfecando una línea celular de mamífero tal como BHK-21, HEK293, VERO u otra (aquí se tomará como un ejemplo BHK-21) con uno o más plásmido(s) para la expresión del (de los) gen(es) viral(es) de interés (plásmido de complementación, denominado como plásmido C). El(los) plásmido(s)-C expresa(n) el(los) gen(es) viral(es) eliminado(s) en el vector arnavirus que se generará bajo el control de uno o más casetes de expresión adecuados para la expresión en células de mamífero. p. ej., un promotor de la polimerasa II de mamífero tal como el promotor alfa de CMV o de EF1 con una señal de poliadenilación. Además, el plásmido de complementación presenta un marcador de selección de mamíferos, p. ej., resistencia a la puomicina, bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión génica en las células de mamífero, p. ej., el casete de expresión de polimerasa II como se indica anteriormente, o el(los) transcrito(s) del(de los) gen(es) viral(es) van seguidos por un sitio interno de

entrada al ribosoma, tal como el del virus de la encefalomiocarditis, seguido por el marcador de resistencia a mamíferos. Para la producción en *E. coli*, el plásmido presenta adicionalmente un marcador de selección bacteriana, tal como un casete de resistencia a ampicilina.

5 Las células que se utilizarán, p. ej., BHK-21, HEK293, MC57G u otras, se mantienen en cultivo y se transfectan con el(los) plásmido(s) de complementación utilizando cualquiera de las estrategias utilizadas normalmente, tal como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o por electroporación. Unos pocos días después, el agente de selección adecuado, p. ej., puromicina, se añade en concentraciones tituladas. Los clones supervivientes se aíslan y se subclonan siguiendo los procedimientos estandares, y los clones de células-C de elevada expresión se identifican utilizando procedimientos de citometría de flujo o transferencia Western con anticuerpos dirigidos contra la(s) proteína(s) viral(es) de interés. Como alternativa al uso de células-C transfectadas de forma estable, la transfección transitoria de células normales puede complementar el(los) gen(es) viral(es) ausente(s) en cada uno de las etapas donde las células-C se utilizarán a continuación.

15 Los plásmidos necesarios son de dos tipos: i) Dos plásmidos, denominados como plásmidos-TF para expresar intracelularmente en las células-C los factores de transacción mínimos del arnavirus, se derivan de p. ej., las proteínas NP y L del LCMV en el presente ejemplo; y ii) Plásmidos, denominados como plásmidos-GS, para expresar intracelularmente en las células-C los segmentos del genoma del vector arnavirus, p. ej., los segmentos con modificaciones diseñadas. Los plásmidos-TF expresan las proteínas NP y L del vector arnavirus respectivo de la descripción bajo control de un casete de expresión adecuado para la expresión de proteínas en células de mamífero, normalmente p. ej., un promotor de la polimerasa II de mamífero tal como el promotor alfa de CMV o EF1, cualquiera de ellos preferentemente en combinación con una señal de poliadenilación. Los plásmidos-GS expresan los segmentos del genoma pequeño (S) y el grande (L) del vector. Normalmente, se pueden utilizar casetes de expresión conducidos por polimerasa I o casetes de expresión conducidos porARN polimerasa de bacteriófago T7 (T7), este último preferentemente con una ribozima 3'-terminal para el procesamiento del transcrito primario para producir el extremo correcto. En el caso de utilizar un sistema basado en T7, la expresión de T7 en las células-C se debe proporcionar o incluyendo en el proceso de recuperación un plásmido de expresión adicional, construido de forma análoga a los plásmidos-TF, que proporcionan T7, o las células-C se construyen para expresar adicionalmente T7 de manera estable.

20 Para recuperar el vector arnavirus de la descripción, se consideran los siguientes procedimientos. Primer día: las células-C, normalmente 80% confluentes en placas de pocillos 6M, se transfectan con una mezcla de los dos plásmidos-TF más los dos plásmidos-GS. Para esto se puede explotar cualquiera de las estrategias normalmente utilizadas, tal como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o por electroporación.

25 3-5 días después: el sobrenadante de cultivo (preparación del vector arnavirus) se recolecta, se separa en alícuotas y se almacena a 4°C, -20°C o -80°C. dependiendo de cuánto tiempo se debe almacenar el vector arnavirus de la descripción antes de su uso. Luego, el título infeccioso de la preparación del vector arnavirus se evalúa mediante un ensayo de inmunofoco en células-C.

Además, la descripción se refiere a la expresión de un antígeno micobacteriano en un cultivo celular en donde el cultivo celular está infectado con un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano. Cuando se utiliza para la expresión de un antígeno micobacteriano en células cultivadas, se consideran los dos procedimientos siguientes:

40 i) Se infecta el tipo de célula de interés con la preparación del vector arnavirus descrita en la presente memoria a una multiplicidad de infección (MOI) de uno o más, p. ej., dos, tres o cuatro, dando como resultado la producción del antígeno micobacteriano en todas las células ya poco después de la infección.

45 ii) Alternativamente, se puede utilizar una MOI más baja y se pueden seleccionar clones de células individuales por su nivel de expresión del antígeno micobacteriano conducido viralmente. Posteriormente, se pueden expandir los clones individuales infinitamente debido a la naturaleza no citolítica de los vectores de arnavirus. Independientemente del enfoque, el antígeno micobacteriano se puede recoger (y purificar) posteriormente o del sobrenadante del cultivo o de las mismas células, dependiendo de las propiedades del antígeno micobacteriano producido. Sin embargo, la descripción no se limita a estas dos estrategias, y se pueden considerar otras formas de conducir la expresión del antígeno micobacteriano utilizando arnavirus infecciosos deficientes en la replicación como vectores.

6.4 Ácidos nucleicos, sistemas de vectores y líneas celulares

55 En un aspecto de la descripción, se describe en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica el segmento genómico grande (segmento L) de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación descrito en la presente memoria, en el cual un marco de lectura abierto del segmento genómico se elimina o se inactiva funcionalmente y el segmento genómico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano.

En un aspecto de la descripción, se describe en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica el segmento genómico corto (segmento S) de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación descrito en la

presente memoria, en el cual un marco de lectura abierto del segmento genómico se elimina o se inactiva funcionalmente y en donde el segmento genómico corto comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano. En otro aspecto de la descripción, se describe en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica el segmento genómico corto (segmento S) de un arnavirus infeccioso deficiente en replicación descrito en la presente memoria en el cual el marco de lectura abierto del gen de la glucoproteína se elimina o se inactiva funcionalmente y en donde el segmento genómico corto comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano.

También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un segmento genómico de arnavirus que comprende una secuencia que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99% , o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO:1. También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un segmento genómico de arnavirus que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos 1639 a 3315 de la SEQ ID NO:11; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano. También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un segmento genómico de arnavirus que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos 1639 a 3315 de la SEQ ID NO:11; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano fusionado a un péptido señal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico.

También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un segmento genómico de arnavirus que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de expresión cuya secuencia de aminoácidos es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 % , 97%, 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por 1639 a 3315 de la SEQ ID NO:11; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de expresión cuya secuencia de aminoácidos es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por 1639 a 3315 de la SEQ ID NO:11; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano fusionado a un péptido señal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico.

También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un segmento genómico de arnavirus que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos 1640 a 3316 de la SEQ ID NO:12; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano. También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un segmento genómico de arnavirus que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 % , al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de nucleótidos 1640 a 3316 de la SEQ ID NO:12; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano fusionado a un péptido señal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico.

También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un segmento genómico de arnavirus que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de expresión cuya secuencia de aminoácidos es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 % , 97%, 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por 1640 a 3316 de la SEQ ID NO:12; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de expresión cuya secuencia de aminoácidos es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por 1640 a 3316 de la SEQ ID NO:12; y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano fusionado a un péptido señal que dirige el antígeno micobacteriano al retículo endoplásmico.

También se describe en la presente memoria un sistema de vectores que comprende uno o más vectores que codifican juntos el genoma de una partícula de arnavirus infeccioso deficiente en la replicación descrita en la presente memoria. Específicamente, en la presente memoria se proporciona un sistema de vectores en donde el uno o más vectores codifican dos segmentos genómicos de arnavirus, a saber, un segmento L y un segmento S, de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación descrito en la presente memoria. Tal sistema de vectores puede codificar (en una o más moléculas de ADN separadas):

- Un segmento genómico S de arnavirus que se modifica de manera que una partícula de arnavirus que lleva este segmento genómico S modificado no puede producir partículas de virus de la progenie infecciosa y un segmento genómico L de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (en paralelo o en antiparalelo) un antígeno micobacteriano;
- Un segmento genómico L de arnavirus que se modifica de manera que una partícula de arnavirus que lleva este segmento genómico L modificado no puede producir partículas de virus de la progenie infecciosa y un segmento genómico S de arnavirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (en paralelo o en antiparalelo) un antígeno micobacteriano;
- Un segmento genómico S de arnavirus que se modifica de manera que una partícula de arnavirus que lleva este segmento genómico S modificado no puede producir partículas de virus de la progenie infecciosa y en

donde el segmento genómico S de arenavirus comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (en paralelo o en antiparalelo) un antígeno micobacteriano y un segmento genómico L de arenavirus tipo salvaje; o

- Un segmento genómico L de arenavirus que se modifica de manera que una partícula de arenavirus que lleva este segmento genómico L modificado no puede producir partículas de virus de la progenie infecciosa y en donde el segmento genómico L de arenavirus comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (en paralelo o en antiparalelo) un antígeno micobacteriano y un segmento genómico S de arenavirus tipo salvaje.

También se describe en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica un segmento genómico de arenavirus (p. ej., LCMV) en el cual el marco de lectura abierto que codifica la GP del segmento genómico S se sustituye con una secuencia de nucleótidos que codifica:

- Un péptido señal fusionado a un antígeno micobacteriano para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- Un péptido señal fusionado a una micolil transferasa de una micobacteria o un fragmento de la misma para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- Un péptido señal fusionado a la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- Un péptido señal fusionado a un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6 para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- Un péptido señal fusionado a (i) la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C y (ii) un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6 para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- En el siguiente orden de N-terminal a C-terminal: un péptido señal fusionado a (i) la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C y (ii) un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- En el siguiente orden de N-terminal a C-terminal: un péptido señal fusionado a (i) un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6; y (ii) la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C para el direccionamiento al retículo endoplásmico.

También se describe en la presente memoria una célula en donde la célula comprende un ácido nucleico o un sistema de vectores descrito anteriormente en esta sección. Las líneas celulares derivadas de dichas células, los cultivos que comprenden dichas células y los métodos de cultivo de dichas células infectadas también se proporcionan en la presente memoria.

6.5 Métodos de uso

También se describen en la presente memoria métodos para tratar una infección en un sujeto administrando al sujeto un arenavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, un método para tratar una infección descrita en la presente memoria comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un arenavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo. El sujeto puede ser un mamífero, un ratón, una rata, un animal domesticado, tal como, pero no se limita a, una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, una cabra, un gato, un perro, un hámster, un burro. En una realización específica, el sujeto es un humano.

También se describen en la presente memoria métodos para inducir una respuesta inmune contra una micobacteria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un arenavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano o una composición del mismo.

Los sujetos a quienes se administra un arenavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo pueden tener, ser susceptibles a o estar en riesgo de una infección micobacteriana. Específicamente, los sujetos a quienes se administra un arenavirus

5 infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo pueden estar infectados con, ser susceptibles a o estar en riesgo de una infección con micobacterias. Más específicamente, los sujetos a quienes se administra un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo pueden estar infectados con, ser susceptibles a o estar en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis.

10 Los sujetos a quienes se administra un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo pueden padecer, ser susceptibles a o estar en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis en el sistema pulmonar, sistema nervioso central, sistema linfático, sistema gastrointestinal o sistema circulatorio, entre otros. Específicamente, los sujetos a quienes se administra un arnavirus infeccioso deficiente en la descripción que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo pueden padecer, ser susceptibles a o estar en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis en uno o más órganos del cuerpo, que incluye, pero no se limita a, el cerebro, riñones, huesos, médula ósea, útero, testículos o pulmones. Más específicamente, los sujetos a quienes se administra un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo pueden padecer, ser susceptibles a o estar en riesgo de una infección de tuberculosis pulmonar con Mycobacterium tuberculosis en los pulmones.

15 El arnavirus infeccioso deficiente en la replicación de la descripción que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo se puede administrar a un sujeto que padece de síntomas que incluyen, pero no se limitan a pérdida de peso inexplicable, cansancio, fatiga, falta de aliento, fiebre, sudores nocturnos, escalofríos y pérdida de apetito, tos persistente, tos con sangre o esputo, dolor en el pecho o dolor al respirar o toser entre otros.

20 En otro aspecto de la descripción, un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria o una composición del mismo se administra a un sujeto de cualquier grupo de edad que padece, es susceptible a o está en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis. En un aspecto específico de la realización de la descripción, un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria o una composición del mismo se administra a un sujeto con un sistema inmune comprometido, un sujeto que padece desnutrición o diabetes, un sujeto que utiliza tabaco, un niño o un adulto joven que padece, es susceptible a o está en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis. En un aspecto más específico de la descripción, un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria o una composición del mismo se administra a un sujeto con un sistema inmune comprometido debido a la infección por VIH, que padece, es susceptible a, o está en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis. En otro aspecto más específico de la descripción, un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria o una composición del mismo se administra a un sujeto que es un niño de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 años de edad que padece, es susceptible a o está en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis. Un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo se puede administrar a un sujeto que es un lactante que padece, es susceptible a o está en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis. Específicamente, un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo se puede administrar a un sujeto que es un lactante de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses de edad que padece, es susceptible a o está en riesgo de una infección con Mycobacterium tuberculosis.

35 Un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo se puede administrar a sujetos con un riesgo elevado de infección diseminada por Mycobacterium tuberculosis. Específicamente, un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo se puede administrar a sujetos en período neonatal con sistema inmune neonatal inmaduro.

40 Un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria o una composición del mismo se puede administrar a un sujeto que tiene una infección latente o 'dormida' con Mycobacterium tuberculosis. Específicamente, un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo se puede administrar a un sujeto que tiene una infección latente o 'dormida' con Mycobacterium tuberculosis, lo cual no es contagioso, pero que todavía se puede convertir en TB más adelante en la vida.

45 La administración de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación de la descripción que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria o una composición del mismo a sujetos confiere inmunidad mediada por células (CMI) contra una infección con Mycobacterium tuberculosis. Sin estar limitado por la teoría, un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria o una composición del mismo puede infectar y expresar antígenos de interés en las células presentadoras de antígeno (APC) del huésped (p. ej., macrófagos) por la presentación directa de antígenos en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II. Alternativamente, la administración de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o

una composición del mismo a sujetos puede inducir respuestas plurifuncionales de células T CD4+ CD8+ específicas de Mtb que coproducen IFN- γ y TNF- α (el IFN- γ es producido por las células T CD4+ y CD8+ y el TNF- α es producido por las células T CD4+) de gran magnitud para tratar o prevenir una infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

5 La administración de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación de la descripción que expresa un antígeno micobacteriano o una composición del mismo puede reducir el riesgo de que un individuo desarrollará una infección con *Mycobacterium tuberculosis* en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90% o más, comparado con el riesgo de desarrollar una infección con *Mycobacterium tuberculosis* en ausencia de dicho tratamiento.

15 Alternativamente, la administración de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación de la descripción que expresa un antígeno micobacteriano o una composición del mismo puede reducir los síntomas de una infección con *Mycobacterium tuberculosis* en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90% o más, comparado con la manifestación de los síntomas de una infección con *Mycobacterium tuberculosis* en ausencia de dicho tratamiento.

20 Alternativamente, la administración de un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano o una composición del mismo en sujetos con un sistema inmune neonatal inmaduro puede inducir una respuesta de inmunidad mediada por células (CMI) contra una infección con *Mycobacterium tuberculosis* en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90% o más, comparado con la respuesta de inmunidad mediada por células (CMI) contra una infección con *Mycobacterium tuberculosis* en ausencia de dicho tratamiento.

25 Los cambios en la función de respuesta de inmunidad mediada por células (CMI) contra una infección con *Mycobacterium tuberculosis* inducida administrando un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano o una composición del mismo en sujetos se puede medir mediante cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a citometría de flujo (véase, p. ej., Perfetto S.P. et al., *Nat Rev Immun.* 2004; 4(8):648-55), ensayos de proliferación de linfocitos (véase, p. ej., Bonilla F.A. et al., *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008; 101:101-4; and Hicks M.J. et al., *Am J Clin Pathol.* 1983; 80:159-63), ensayos para medir la activación de linfocitos, que incluye la determinación de cambios en la expresión de marcadores de superficie después de la activación de la medición de citocinas de linfocitos T (véase, p. ej., Caruso A. et al., *Cytometry.* 1997;27:71-6), ensayos ELISPOT (véase, p. ej., Czerkinsky C.C. et al., *J Immunol Methods.* 1983;65:109-121; and Hutchings P.R. et al., *J Immunol Methods.* 1989;120:1-8) o ensayos de citotoxicidad de células asesinas naturales (véase, p. ej., Bonilla F.A. et al., *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005 May; 94 (5 Suppl. 1):S1-63).

30 En otro aspecto de la descripción, en la presente memoria se describe un método de uso con un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación (p. ej., LCMV) que expresa un antígeno micobacteriano como se describe en la presente memoria en el cual el marco de lectura abierto que codifica la GP del segmento genómico S se sustituye con una secuencia de nucleótidos que codifica:

- 35
- Un péptido señal fusionado a un antígeno micobacteriano para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
 - Un péptido señal fusionado a una micolil transferasa de una micobacteria o un fragmento de la misma para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
 - Un péptido señal fusionado a la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
 - Un péptido señal fusionado a un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6*, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen *esat-6* para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
 - Un péptido señal fusionado a (i) la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la *M. tuberculosis* Ag85A, *M. tuberculosis* Ag85B, o *M. tuberculosis* Ag85C y (ii) un producto génico de un gen de la familia del
- 50
- 55

gen esat-6, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6 para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o

- En el siguiente orden de N-terminal a C-terminal: un péptido señal fusionado a (i) la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C y (ii) un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6 para el direccionamiento al retículo endoplásmico; o
- En el siguiente orden de N-terminal a C-terminal: un péptido señal fusionado a (i) un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, o al menos 100 aminoácidos de un producto génico de un gen de la familia del gen esat-6; y (ii) la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C, o un fragmento de al menos 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de la M. tuberculosis Ag85A, M. tuberculosis Ag85B, o M. tuberculosis Ag85C para el direccionamiento al retículo endoplásmico.

6.6 Composiciones, administración y dosificación

También se describen en la presente memoria vacunas, composiciones inmunogénicas y composiciones farmacéuticas que comprenden un arnavirus modificado por ingeniería genética como se describe en la presente memoria. Dichas vacunas y composiciones farmacéuticas se pueden formular según procedimientos estandares en la técnica.

También se describen en la presente memoria composiciones que comprenden un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación descrito en la presente memoria. Dichas composiciones se pueden utilizar en métodos de tratamiento y prevención de enfermedades. Específicamente, las composiciones descritas en la presente memoria se pueden utilizar en el tratamiento de sujetos infectados con, o que son susceptibles a, una infección con Mycobacterium tuberculosis. Alternativamente, las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria se pueden utilizar para inducir una respuesta inmune en un huésped a quien se administra la composición. Las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria se pueden utilizar como vacunas y, por consiguiente, se pueden formular como composiciones farmacéuticas. Específicamente, las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria se pueden utilizar en la prevención de la infección de sujetos (p. ej., sujetos humanos) por Mycobacterium tuberculosis.

Las composiciones descritas en la presente memoria comprenden (p. ej., las composiciones inmunogénicas), se pueden administrar en combinación con un adyuvante. El adyuvante para la administración en combinación con una composición descrita en la presente memoria se puede administrar antes, concomitantemente con o después de la administración de dicha composición. El término "adyuvante" se puede referir a un compuesto que cuando se administra junto con o como parte de una composición descrita en la presente memoria aumenta, mejora y/o refuerza la respuesta inmune a una partícula de arnavirus infeccioso deficiente en la replicación, pero cuando se administra el compuesto solo no genera una respuesta inmune a la partícula de arnavirus infeccioso deficiente en la replicación. El adyuvante puede generar una respuesta inmune a la partícula de arnavirus infeccioso deficiente en la replicación y no producir una alergia u otra reacción adversa. Los adyuvantes pueden mejorar una respuesta inmune mediante varios mecanismos, que incluyen, p. ej., reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B y/o T, y estimulación de macrófagos. Cuando una vacuna o composición inmunogénica de la invención comprende adyuvantes o se administra junto con uno o más adyuvantes, los adyuvantes que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes de sales minerales o adyuvantes de gel de sales minerales, adyuvantes particulados, adyuvantes microparticulados, adyuvantes de la mucosa y adyuvantes inmunoestimuladores. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio (alumbre) (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio), 3-de-O-acilado monofosforil lípido A (MPL).(véase GB 2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), polisorbato 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), compuestos de imidazopiridina (véase la Solicitud Internacional N° PCT/US2007/064857, publicada como Publicación Internacional N° WO2007/109812), compuestos de imidazoquinolina (véase la Solicitud internacional N° PCT/US2007/064858, publicada como Publicación Internacional N° WO2007/109813) y saponinas, tal como QS21 (véase Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Pat. de EE.UU. N° 5,057,540) El adyuvante puede ser el adyuvante de Freund (completo o incompleto). Otros adyuvantes son las emulsiones de aceite en agua (tal como el escualeno o el aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tal como el monofosforil lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997).

Las composiciones comprenden el LCMV infeccioso deficiente en la replicación descrito en la presente memoria solo o, preferiblemente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden utilizar suspensiones o dispersiones de arnavirus modificados por ingeniería genética, especialmente suspensiones o dispersiones acuosas isotónicas. Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar y/o pueden constar de excipientes, p. ej., conservantes, estabilizadores, agentes humectantes y/o emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o tampones y se preparan de una manera conocida per se, por ejemplo, por medio de procesos

convencionales de dispersión y suspensión. Dichas dispersiones o suspensiones pueden constar de agentes reguladores de la viscosidad. Las suspensiones o dispersiones se mantienen a temperaturas de alrededor de 2-4°C, o preferiblemente para un almacenamiento de mayor duración, se pueden congelar y descongelarse poco antes de su uso. Para la inyección, la vacuna o las preparaciones inmunogénicas se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria constan adicionalmente de un conservante, p. ej., el derivado de mercurio timerosal. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria constan de 0,001% a 0,01% de timerosal. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria no constan de un conservante.

Las composiciones farmacéuticas constan de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{11} unidades formadoras de focos del LCMV modificado por ingeniería genética. Las formas de dosis unitarias para la administración parenteral son, por ejemplo, ampollas o viales, p. ej., viales que contienen de aproximadamente 10^3 a 10^{10} unidades formadoras de focos o 10^5 a 10^{15} partículas físicas de LCMV modificadas por ingeniería genética.

Una vacuna o composición inmunogénica proporcionada en la presente memoria se puede administrar a un sujeto, que incluye, pero no se limita a, por vía oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, percutánea, intranasal e inhalación, y mediante escarificación (pinchando a través de las capas superiores de la piel, p. ej., utilizando una aguja bifurcada). Específicamente, se pueden utilizar rutas subcutáneas o intravenosas.

Para la administración por vía intranasal o por inhalación, la preparación para su uso según la presente invención se puede administrar convenientemente en forma de una presentación en pulverizador de aerosol a partir de envases a presión o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado. p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para utilizar en un inhalador o insufladores que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La dosificación del ingrediente activo depende del tipo de vacuna y del sujeto, y su edad, peso, condición individual, los datos farmacocinéticos individuales y el modo de administración.

También se describen procesos y el uso de arenavirus modificados por ingeniería genética para la fabricación de vacunas en forma de preparaciones farmacéuticas, que constan de arenavirus modificados por ingeniería genética como ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se preparan de una manera conocida per se, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla y/o dispersión.

6.7 Ensayos

(a) Ensayo de tinción de multímero de MHC-péptido para la detección de la proliferación de células T CD8+ específicas de antígeno

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica se puede utilizar para ensayar respuestas de células T CD8+ específicas de antígeno. Por ejemplo, se puede utilizar el ensayo de tinción del tetrámero de MHC-péptido (véase, p. ej., Altman J.D. et al., *Science*. 1996; 274:94-96; and Murali-Krishna K. et al., *Immunity*. 1998; 8:177-187). Brevemente, el ensayo comprende los siguientes pasos, se utiliza un ensayo de tetrámero para detectar la presencia de células T específicas de antígeno. Para que una célula T detecte el péptido al que es específico, debe reconocer tanto el péptido como el tetrámero de las moléculas de MHC hechas a medida para una célula T específica de antígeno (normalmente marcada con fluorescencia). El tetrámero se detecta después por citometría de flujo a través del marcador fluorescente.

(b) Ensayo ELISPOT para la detección de la proliferación de células T CD4+ específicas de antígeno

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica se puede utilizar para ensayar las respuestas de células T CD4+ específicas de antígeno. Por ejemplo, se puede utilizar el ensayo ELISPOT (véase, p. ej., Czerkinsky C.C. et al., *J Immunol Methods*. 1983; 65:109-121; and Hutchings P.R. et al., *J Immunol Methods*. 1989; 120:1-8). Brevemente, el ensayo comprende las siguientes etapas: se reviste una placa inmunospot con un anticuerpo anticitoquina. Se incuban las células en la placa inmunospot. Las células secretan citocinas y luego se lavan. Después, las placas se revisten con un segundo anticuerpo anticitoquina biotinilado y se visualizan con un sistema avidin-HRP.

(c) Ensayo de citoquina intracelular para la detección de la funcionalidad de las respuestas de células T CD8+ y CD4+.

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica se puede utilizar para ensayar la funcionalidad de las respuestas de células T CD8+ y CD4+. Por ejemplo, se puede utilizar el ensayo de citocina intracelular combinado

con citometría de flujo (véase, p. ej., Suni M.A. et al., *J Immunol Methods*. 1998; 212:89-98; Nomura L.E. et al., *Cytometry*. 2000; 40:60-68; and Ghanekar S.A. et al., *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001; 8:628-63). Brevemente, el ensayo comprende las siguientes etapas: activación de las células a través de un péptido específico, se añade una inhibición del transporte de proteínas (p. ej., brefeldina A) para retener las citoquinas dentro de la célula. Después del lavado, se pueden añadir anticuerpos a otros marcadores celulares a las células. Las células se fijan y se permeabilizan. Se añade el anticuerpo anti-citoquina y las células se pueden analizar mediante citometría de flujo.

(d) Ensayo para medir la infectividad del vector arnavirus

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica se puede utilizar para medir la infectividad de una preparación de vector arnavirus. Por ejemplo, normalmente se utiliza para este propósito un ensayo de inmunofoco típico con células complementarias (células C) próximas. Las monocapas de células C, normalmente en placas de pocillos 24M, 80% confluentes, se infectan con diluciones de 10 veces de la preparación del vector arnavirus durante 90 minutos. Posteriormente, la capa celular se sobrepone con medio de cultivo celular adecuado suplementado con metilcelulosa al 1%. Dos o tres días más tarde, dependiendo de la permisividad de la línea de células C utilizada, se elimina el sobrenadante del cultivo, se fija la capa celular, normalmente con etanol/acetona o con formalina al 4%, seguido de permeabilización de la capa celular utilizando detergentes suaves. Posteriormente, se identifican los focos de células infectadas con el vector arnavirus utilizando preparación(es) de anticuerpos mono o policlonales contra una de las proteínas en el vector arnavirus a ensayar o contra el antígeno introducido. Se detecta el anticuerpo unido utilizando reactivos apropiados, tal como los anticuerpos anti-isotipo o anti-especies que se conjugan con un sistema para la visualización tal como la peroxidasa de rábano picante, seguido de una reacción de color con cromógenos adecuados tal como la o-fenilendiamina. Se cuentan las manchas resultantes en la placa para calcular el número de unidades formadoras de foco infeccioso (FFU) por volumen de preparación del vector arnavirus (véase, p. ej., Flint, S.J.; Enquist, W., Racaniello, V.R. and Skalka, A.M. (2009). "Virological Methods". Principles of Virology. ASM Press. ISBN 1-55581-443-3).

(e) Ensayo para confirmar la deficiencia de replicación de vectores virales

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica que determine la concentración de partículas de virus infecciosas competentes para la replicación también se puede utilizar como una medida de partículas virales deficientes en replicación en una muestra. Por ejemplo, normalmente se utilizan para este propósito un ensayo de inmunofoco típico con células no complementarias próximas. Las monocapas celulares no complementarias, normalmente en placas de pocillos 24M, 80% confluentes, se infectan con diluciones de 10 veces de la preparación del vector arnavirus durante 90 minutos. Posteriormente, la capa celular se sobrepone con medio de cultivo celular adecuado suplementado con metilcelulosa al 1%. Dos o tres días más tarde, dependiendo de la permisividad de la línea no complementaria utilizada, se elimina el sobrenadante del cultivo, se fija la capa celular, normalmente con etanol/acetona o con formalina al 4%, seguido de permeabilización de la capa celular utilizando detergentes suaves. Posteriormente, se identifican los focos de células infectadas con el vector arnavirus utilizando preparación(es) de anticuerpos mono o policlonales contra una de las proteínas en el vector arnavirus a ensayar o contra el antígeno introducido. Se detecta el anticuerpo unido utilizando reactivos apropiados, tal como los anticuerpos anti-isotipo o anti-especies que se conjugan con un sistema para la visualización tal como la peroxidasa de rábano picante, seguido de una reacción de color con cromógenos adecuados tal como la o-fenilendiamina. Se cuentan las manchas resultantes en la placa para calcular el número de unidades formadoras de foco infeccioso (FFU) por volumen de preparación del vector arnavirus (véase, p. ej., Flint, S.J.; Enquist, W., Racaniello, V.R. and Skalka, A.M. (2009). "Virological Methods". Principles of Virology. ASM Press. ISBN 1-55581-443-3).

Además, los ensayos basados en placa son el método estándar utilizado para determinar la concentración de virus en términos de unidades formadoras de placa (UFP) en una muestra de virus. Específicamente, se infecta una monocapa confluyente de células huésped no complementarias con el virus a diluciones variables y se cubre con un medio semisólido, tal como agar, para evitar que la infección del virus se propague indiscriminadamente. Se forma una placa viral cuando un virus se infecta y se replica con éxito en una célula dentro de la monocapa celular fijada (véase, p. ej., Kaufmann, S.H.; Kabelitz, D. (2002). *Methods in Microbiology Vol.32: Immunology of Infection*. Academic Press. ISBN 0-12-521532-0). La formación de la placa puede tardar de 3 a 14 días, dependiendo del virus que se esté analizando. Las placas generalmente se cuentan a mano y los resultados, en combinación con el factor de dilución utilizado para preparar la placa, se utilizan para calcular el número de unidades formadoras de placa por volumen de unidad de muestra (UFP/ml). El resultado de UFP/ml representa el número de partículas competentes para la replicación infecciosa dentro de la muestra.

(f) Ensayo para la expresión del antígeno viral

Cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica se puede utilizar para medir la expresión de antígenos virales. Por ejemplo, el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) es una variación más moderna de un ensayo de proteínas que utiliza un anticuerpo específico ligado a una enzima para detectar la presencia de una cantidad desconocida de antígeno (es decir, virus) en una muestra. Se detecta el resultado de la unión antígeno-anticuerpo y/o se cuantifica a través de la capacidad de la enzima para convertir un reactivo en una señal detectable que se puede utilizar para calcular la concentración del antígeno en la muestra (véase, p. ej., Kemeny, D.M.;

Challacombe, S.J. (1988) and Other Solid Phase Immunoassays: Theoretical and Practical Aspects. John Wiley and Sons. ISBN 0-471-90982-3). La peroxidasa de rábano picante (HRP) es una enzima común utilizada en los esquemas ELISA debido a su capacidad para amplificar la señal y aumentar la sensibilidad del ensayo. Existen muchas variaciones o tipos de ensayos ELISA, pero generalmente se pueden clasificar como indirectos, competitivos, sandwich o inversos (p. ej., Kuby, J.; Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. (2007). Kuby Immunology 6th edition. W.H. Freeman and Company. ISBN 1-4292-0211-4). Los kits ELISA están disponibles comercialmente de numerosas compañías y la cuantificación generalmente ocurre a través de reporteros cromogénicos o de fluorescencia (p. ej., Invitrogen, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Esta técnica es mucho menos laboriosa que los métodos tradicionales y puede tardar de 4 a 24 horas basada en el tiempo de incubación de anticuerpos.

(g) Modelos animales

La seguridad, tolerancia y eficacia inmunogénica de las vacunas que comprenden un arnavirus infeccioso deficiente en la replicación que expresa un antígeno micobacteriano descrito en la presente memoria o una composición del mismo se puede ensayar en modelos animales. Los modelos animales que se pueden utilizar para ensayar la seguridad, tolerancia y eficacia inmunogénica de las vacunas y las composiciones de las mismas utilizadas en la presente memoria pueden incluir ratones, cobayas, conejos y monos (véase, p. ej., Gupta U.D. and Katock V.M., Tuberculosis. 2005; 85: 277-293) Preferiblemente, los modelos animales que se pueden utilizar para ensayar la seguridad, tolerancia y eficacia inmunogénica de las vacunas y las composiciones de las mismas utilizadas en la presente memoria pueden incluir ratones.

7. Ejemplos

Estos ejemplos demuestran que la tecnología de vectores basados en el virus de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación (rLCMV) se puede utilizar con éxito para desarrollar nuevas vacunas contra la infección por micobacterias con *Mycobacterium tuberculosis* incluyendo antígenos micobacterianos en el vector arnavirus, y que la administración de tales vacunas puede inducir respuestas plurifuncionales de células T CD4+ y CD8+ específicas de Mtb (coproductoras de IFN- γ y TNF- α) de gran magnitud para controlar la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

7.1 Diseño del genoma del vector arnavirus

Se incluyeron Ag85B y TB10.4 (SEQ ID NOs.:4 y 5), que son ambos objetivos frecuentes de células T en pacientes humanos infectados con Mtb, en el rLCMV para crear el vector de vacuna. Siguiendo enfoques establecidos (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. US 2010/0297172 A1; and Flatz L. et al., Nat Med. 2010 March; 16(3): 339-345) se diseñó un vector de vacuna contra rLCMV que expresa un antígeno de fusión que consiste en los antígenos de Mtb, Ag85B y TB10.4 (rLCMV/Ag85B-TB10.4, Fig. 1). La redirección de Ag85B-TB10.4 por vía intracelular a un compartimento diferente, a saber, al retículo endoplásmico, mejora la inmunogenicidad de la vacuna. Para este propósito, se unió una secuencia señal N-terminal al gen Ag85B-TB10.4. La secuencia señal se tomó del activador de plasminógeno tisular (tPA) (SEQ ID NOs:6 y 7) y el marco de lectura abierto resultante se denominó tPA-Ag85B-TB10.4 (SEQ ID NO:2). También se generó el vector rLCMV correspondiente (rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4) (SEQ ID NO: 1). Ambos vectores se produjeron y titularon según la metodología establecida (Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. US 2010/0297172 A1; and Flatz L. et al., Nat Med. 2010 March; 16(3): 339-345).

7.2 Comparación de la inmunogenicidad y funcionalidad de los vectores de vacuna rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 y rLCMV/Ag85B-TB10.4 en ratones.

A continuación, se analizó y comparó la inmunogenicidad de rLCMV/Ag85B-TB10.4 y rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 en ratones (Fig. 2).

El día 0 del experimento, se inmunizaron ratones C57BL/6 con 2×10^5 UFP de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 (grupo 1) o de rLCMV/Ag85B-TB10.4 (grupo 2) por vía intravenosa. Los ratones control no se inmunizaron (grupo 3). Se repitió la misma inmunización el día 28. El día 27 (panel A) y el día 38 (panel B) se midieron células T CD8+ específicas de TB10.4 (IMYNYPAM) en sangre periférica mediante citometría de flujo utilizando MHC clase I dextramer. Las células que se unen a Dextramer se expresan como porcentaje de la población total de CD8+ (X en los paneles A y B). El día 56 del experimento, los animales se sacrificaron y se prepararon suspensiones de células individuales a partir del bazo de los animales. Se estimularon estas células con el péptido QIMYNYPAM derivado de TB10.4 que comprende la SEQ ID NO:10 y el péptido THSWEYWGALNAMKGDQLS derivado de Ag85B que comprende la SEQ ID NO:8 para determinar interferón- γ específico de antígeno (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que coproducen las CD8+ (panel C), así como IFN- γ y TNF- α que coproducen las células T CD4+ (panel D), respectivamente. Para esto, se utilizaron técnicas de citometría de flujo y tinción de citocinas intracelulares estándar. Se expresan como un porcentaje las células que coproducen IFN- γ y TNF- α entre las células T CD8+ totales (Y en el panel C) o entre las células T CD4+ totales (Z en el panel D). Los símbolos representan ratones individuales. Los ratones del grupo 1 y del grupo 2 fueron significativamente diferentes en todas las mediciones, según se determinó

utilizando el ensayo t de Student de dos colas no pareado ($p=0,0226$, $p=0,0108$, $p=0,0044$, $p=0,0001$ en los paneles A-D, respectivamente).

Después de una única inmunización intravenosa (cebado), ambos vectores indujeron respuestas de células T CD8+ específicas de Mtb de magnitud muy considerable (Fig. 2A). Estas respuestas se incrementaron de manera eficiente cuando el mismo vector se volvió a administrar cuatro semanas después del cebado (refuerzo, Fig. 2B). Después del cebado, así como después del refuerzo, rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 indujo respuestas significativamente más fuertes que rLCMV/Ag85B-TB10.4. Se investigó la funcionalidad de las respuestas de células T CD8+ y CD4+ después de la vacunación cebado-refuerzo. Ambos vectores indujeron respuestas plurifuncionales de células T CD8+ (Fig. 2C) y CD4+ (Fig. 2D) que coproducen IFN- γ y TNF- α de gran magnitud. En analogía a las diferencias en la fuerza de las respuestas de células T CD8+ totales específicas de Mtb (Fig. 2A, B), las respuestas plurifuncionales de células T CD8+ y CD4+ a rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 fueron de una magnitud significativamente mayor que las producidas por rLCMV/Ag85B-TB10.4. Estos datos demostraron que una modificación del direccionamiento intracelular de Ag85B-TB10.4 por medio de un péptido líder N-terminal tal como el uno de tPA puede aumentar las respuestas de células T CD8+ y CD4+.

7.3 Comparación de la inmunogenicidad del vector de vacuna rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 administrado por vía intravenosa o subcutánea

A continuación, se comparó la inmunogenicidad de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 cuando se administró por vía subcutánea a ratones con las respuestas producidas por la inmunización intravenosa con el mismo vector (Fig. 3).

El día 0 del experimento, se inmunizaron ratones C57BL/6 con 10^5 UFP de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 o a través de la vía intravenosa (grupo 1) o por vía subcutánea (grupo 2). Los ratones control no se inmunizaron (grupo 3). El día 11, los animales se sacrificaron y se prepararon suspensiones de células individuales a partir del bazo de estos animales. Se midieron las células T CD8+ específicas de TB10.4 (IMYNYPAM (SEQ ID NO: 9)) por citometría de flujo utilizando MHC clase I dextramer. Las células que se unen a Dextramer se expresan como porcentaje de la población total de CD8+ (X en los paneles A). Se estimularon también las células del bazo con el péptido QIMYNYPAM derivado de TB10.4 que comprende la SEQ ID NO:10 y el péptido THSWEYWGAQLNAMKGDLS derivado de Ag85B que comprende la SEQ ID NO:8 para determinar IFN- γ específico de antígeno que produce CD8+ (panel B), así como IFN- γ y TNF- α que coproducen células T CD4+ (panel C), respectivamente. Para esto, se utilizaron técnicas de citometría de flujo y tinción de citocinas intracelulares estándar. Se expresan como un porcentaje las células T CD8+ que producen IFN- γ específicas de epítipo dentro de las células T CD8+ totales (Y en el panel B), así como las células que coproducen IFN- γ y TNF- α entre las células T CD4+ totales (Z en el panel C). Los símbolos representan ratones individuales.

Se evaluó la magnitud total de las respuestas de células T CD8 específicas de Mtb (Fig. 3A), así como la magnitud de las células plurifuncionales T CD8+ (Fig. 3B) y T CD4+ (Fig. 3C) específicas de Mtb. Estos análisis demostraron que rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 indujo respuestas de células plurifuncionales T CD8+ y CD4+ de alta frecuencia independientemente de la ruta de administración de la vacuna.

7.4 Estudios de inmunización con el vector de vacuna rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 en ratones adultos y de 1 semana de edad.

Se examinó la capacidad de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 para inducir células T CD8+ y CD4+ específicas de Mtb en ratones de una semana de edad, y estas respuestas se compararon con las de animales adultos (Fig. 4).

El día 0 del experimento, se inmunizaron ratones adultos C57BL/6 (grupo 1) y de 1 semana de edad (grupo 2) con 10^5 UFP de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 a través de la vía subcutánea. El día 10, los animales se sacrificaron y se prepararon suspensiones de células individuales a partir del bazo de estos animales. Se midieron las células T CD8+ específicas de TB10.4 (IMYNYPAM (SEQ ID NO:9)) por citometría de flujo utilizando MHC clase I dextramer. Las células que se unen a Dextramer se expresan como porcentaje de la población total de CD8+ (X en los paneles A) o como número total de células CD8+ que se unen a Dextramer en el bazo (Y en el panel B). Se estimularon también estas células del bazo con el péptido QIMYNYPAM derivado de TB10.4 que comprende la SEQ ID NO:10 y el péptido THSWEYWGAQLNAMKGDLS derivado de Ag85B que comprende la SEQ ID NO:8 para determinar interferón- γ (IFN- γ) específico de antígeno y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que coproducen las CD8+ (panel C), así como IFN- γ y TNF- α que coproducen las células T CD4+ (panel D), respectivamente. Para esto, se utilizaron técnicas de citometría de flujo y tinción de citocinas intracelulares estándar. Se expresan como un porcentaje las células que coproducen IFN- γ y TNF- α entre las células T CD8+ totales (Z en el panel C) o entre las células T CD4+ totales (XY en el panel D). Los símbolos representan ratones individuales.

La magnitud de las respuestas de células T CD8+ específicas de Mtb fue equivalente en ratones de una semana de edad y adultos. De manera importante no solo estaban en el mismo intervalo la proporción relativa de células T CD8+ específicas (Fig. 4A), sino también su número total (Fig. 4B). Las células CD8+ específicas de Mtb de ratones de una semana de edad vacunados con rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 eran tan funcionales como las de ratones adultos, lo cual era evidente a partir de una capacidad equivalente para coproducir IFN- γ y TNF- α . Además, los ratones de una semana de edad y los adultos aumentaron las respuestas plurifuncionales comparables de células T

CD4+ específicas de Mtb (Fig. 4D). Estos hallazgos demostraron la capacidad de rLCMV/tPA-Ag85B-TB10.4 para inducir respuestas plurifuncionales de células T CD8+ y CD4+ específicas de Mtb en individuos muy jóvenes y, por lo tanto, inmunológicamente aún inmaduros.

Listado de secuencias

5 <110> Université de Genève
 <120> Vacunas antimicobacterianas
 <130> 103461PC
 10 <140> Para ser asignado
 <141>
 <160> 13
 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 3104
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> rLCMV / tPA-Ag85B-TB10.4
 25 <400> 1

gcgcaccggg	gatcctaggc	tttttgatt	gcgctttcct	ctagatcaac	tgggtgtcag	60
gcctatcct	acagaagat	ggatgcaatg	aagagagggc	tctgctgtgt	gctgctgtctg	120
tgtggagcag	tcttcgtttc	gcccagcag	atctccttct	cccggccggg	gctgccggtc	180
gagtagctgc	aggtgccgtc	gccgtogatg	ggccgcgaca	tcaaggttca	gttccagagc	240
ggtgggaaca	actcacctgc	ggtttatctg	ctogacggcc	tgcgcgcca	agacgactac	300
aacggctggg	atatcaacac	cccggcgttc	gagtggtact	accagtcggg	actgtcgata	360
gtcatgccgg	tggcgggca	gtccagcttc	tacagegact	ggtacagccc	ggcctgcggg	420
aaggctggct	gccagactta	caagtgggaa	accttcctga	ccagcgagct	gcccaatgg	480
ttgtccgcca	acagggcgt	gaagcccacc	ggcagcgtg	caatcggctt	gtcgatggcc	540
ggctcgtcgg	caatgatctt	ggccgcctac	caccccagc	agttcatcta	cgccggctcg	600
ctgtcggccc	tgctggacc	ctctcagggg	atggggccta	gcctgatcgg	cctcgcgatg	660
ggtgacgccg	gcggttaca	ggccgcagac	atgtggggtc	cctcgagtga	cccggcatgg	720
gagcgcaacg	accctacgca	gcagatcccc	aagctggtcg	caaacaacac	ccggctatgg	780
gtttattgcg	ggaacggcac	cccgaacgag	ttgggcggtg	ccaacatacc	cgccgagttc	840
ttggagaact	tcgttcgtag	cagcaacctg	aagttccagg	atgctgata	cgccgcgggc	900
gggcacaacg	ccgtgtcaa	cttcccggcc	aacggcacgc	acagctggga	gtactggggc	960
gctcagctca	agcccatgaa	gggtgacctg	cagagttcgt	taggcgccgg	catgtcgcaa	1020
atcatgtaca	actaccocgc	gatgttgggt	cacgccgggg	atatggccgg	atatgccggc	1080
acgctgcaga	gcttgggtgc	cgagatcgcc	gtggagcagg	ccgcgttgca	gagtgcggtg	1140
cagggcgata	ccgggatcac	gtatcaggcg	tggcaggcac	agtggaacca	ggccatggaa	1200
gatttgggtc	gggcctatca	tgcgatgtcc	agcaccatg	aagccaacac	catggcgatg	1260
atggcccgcg	acacggccga	agccgcgcaa	tggggcggtc	gaagaacagc	gcctccctga	1320
ctctccacct	cgaaagaggt	ggagagttag	ggaggcccag	agggtcttag	agtgtcaca	1380
catttggggc	tctaaaaatt	aggtcatgtg	gcagaatgtt	gtgaacagtt	ttcagatctg	1440
ggagccttgc	tttgaggcg	cttcaaaaa	tgatgcagtc	catgagtgca	cagtgcgggg	1500
tgatctcttt	cttctttttg	tcccttacta	ttccagtag	catcttacac	aaccagccat	1560
atgtgtccca	cactttatct	tcatactccc	togaagcttc	cctggtcatt	tcaacatcga	1620
taagcttaat	gtccttcta	ttttgtgagt	ccagaagctt	tctgatgtca	tcggagcctt	1680
gacagcttag	aaccatcccc	tgcggaagag	cacctataac	tgacgaggtc	aaccggggtt	1740
gcgcattgaa	gaggtcggca	agatccatgc	cgtgtgagta	cttggaaatct	tgcttgaatt	1800
gtttttgatc	aacgggttcc	ctgtaaaagt	gtatgaaactg	ccctgactgt	ggttggaaaa	1860
ttgctatttc	cactggatca	ttaaactctac	cctcaatgtc	aatccatgta	ggagcgttgg	1920
ggtcaattcc	tcccatgagg	tcttttaaaa	gcattgtctg	gctgtagctt	aagcccacct	1980
gaggtggacc	tgctgtcca	ggcgctggcc	tgggtgagtt	gactgcaggt	ttctcgcttg	2040
tgagatcaat	tgttgtggtt	tcccatgctc	tccccacaat	cgatgttcta	caagctatgt	2100
atggccatcc	ttcacctgaa	aggcaaatct	tatagaggat	gttttcata	gggttctctg	2160
cccgaacttg	gtctgaaaca	aacatgttga	gttttctctt	ggccccgaga	actgccttca	2220
agagatcctc	gctgttgctt	ggcttgatca	aaattgactc	taacatgta	cccccatcca	2280

ES 2 751 423 T3

```

acagggctgc ccctgccttc acggcagcac caagactaaa gttatagcca gaaatggtga 2340
tgctggactg ctgttcagtg atgaccccca gaactgggtg cttgtctttc agcctttcaa 2400
gatcattaag atttggatac ttgactgtgt aaagcaagcc aaggtctgtg agcgtttgta 2460
caacgtcatt gagcggagtc tgtgactggt tggccataca agccatagtt agacttggca 2520
ttgtgccaaa ttgattgttc aaaagtgatg agtctttcac atcccaaact cttaccacac 2580
cacttgacc ctgctgaggc tttctcatcc caactatctg taggatctga gatctttggt 2640
ctagttgctg tgttgtaag ttccccatat ataccctga agcctggggc ctttcagacc 2700
tcatgatctt ggccttcagc ttctcaaggt cagccgcaag agacatcagt tcttctgcac 2760
tgagcctccc cactttcaaa acattcttct ttgatgttga ctttaaacc acaagagaat 2820
gtacagctctg gttgagactt ctgagtctct gtaggtcttt gtcattctctc tttccttcc 2880
tcatgatcct ctgaacattg ctgacctcag agaagtcaa cccattcaga aggttggtg 2940
catccttaat gacagcagcc ttcacatctg atgtgaagct ctgcaattct cttctcaatg 3000
cttgcgcca ttggaagctc ttaacttctc tagacaagga catcttggtg ctcaatggtt 3060
tctcaagaca aatgcgcaat caaatgccta ggatccactg tgcg 3104

```

<210> 2
 <211> 1224
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de ADNc tPA-Ag85B-TB10.4

10 <400> 2

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgccagcag agatctcctt ctcccggcgg gggctgcccg tcgagtacct gcaggtgccg 120
tcgcogtcca tgggcccgcga catcaagggt cagttccaga gcggtgggaa caactcacct 180
gcggtttatc tgctcgacgg cctgcccggc caagacgact acaacggctg ggatatcaac 240
accccggcgt tcgagtggta ctaccagtcg ggactgtcga tagtcatgcc ggtcggcggg 300
cagtccagct tctacagcga ctggtacagc ccggcctcgg gtaaggctgg ctgccagact 360
tacaagtggg aaaccttctc gaccagcgag ctgcccgaat ggttgcggc caacagggcc 420
gtgaagccca ccggcagcgc tgcaatcggc ttgtcgatgg ccggctcgtc ggcaatgatc 480
ttggccgcct accaccccca gcagttcatc taacggcggc cgctgtcggc cctgctggac 540
ccctctcagg ggatggggcc tagcctgatc ggcctcgcga tgggtgacgc cggcgggttac 600
aaggccgcag acatgtgggg tcctcagagt gaccggcat gggagcga caaccctacg 660
cagcagatcc ccaagctggt cgcaaacaa acccggctat gggtttattg cgggaacggc 720
accccgaaac agttggcggg tgccaacata ccggccgagt tcttgagaaa cttcgttctg 780
agcagcaacc tgaagttcca ggatgcgtac aacggcggg gcgggcacaa cgccgtggtc 840
aacttcccgc ccaacggcac gcacagctgg gagtactggg gcgctcagct caacgccatg 900
aagggtgacc tgcagagttc gttaggcgcc ggcattgtcg aaatcatgta caactacccc 960
gcgatggttg gtcacgcccg ggatattggc ggatattggc gcacgctgca gagcttgggt 1020
gccgagatcg ccgtggagca ggcggcgttg cagagtgcgt ggcagggcga taccgggatc 1080
acgtatcagg cgtggcaggc acagtggaac caggccatgg aagatttggg gcgggcctat 1140
catgcatggt ccagcaccga tgaagccaac accatggcga tgatggcccg cgacacggcc 1200
gaagccgcca aatggggcgg ctga 1224

```

<210> 3
 15 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> secuencia de aminoácidos tPA-Ag85B-TB10.4

<400> 3

```

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

```

ES 2 751 423 T3

Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn
65 70 75 80
Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met
85 90 95
Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala
100 105 110
Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr
115 120 125
Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr
130 135 140
Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile
145 150 155 160
Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser
165 170 175
Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu
180 185 190
Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro
195 200 205
Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro
210 215 220
Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly
225 230 235 240
Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu
245 250 255
Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala
260 265 270
Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His
275 280 285
Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu
290 295 300
Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro
305 310 315 320
Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu
325 330 335
Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser
340 345 350
Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln
355 360 365
Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser
370 375 380
Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala
385 390 395 400
Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
405

<210> 4
<211> 1146
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADNc Ag85B-TB10.4

<400> 4

atgtcccggc cggggctgcc ggtcaggtac ctgcaggtgc cgtcgcctgc gatgggccgc 60
gacatcaagg ttcagttcca gagcgtggg aacaactcac ctgcggttta tctgctcgac 120
ggcctgcgcg cccaagacga ctacaacggc tgggatatca acaccccgcc gttcagagtgg 180
tactaccagt cgggactgtc gatagtcacg ccggtcggcg ggcagtcacg cttctacagc 240
gactggtaca gcccgccctg cggtaaggct ggctgccaga cttacaagtg ggaaaccttc 300
ctgaccagcg agctgccgca atggttgtcc gccaacaggg ccgtgaagcc caccggcagc 360
gctgcaatcg gcttgtcgat ggccggctcg tcggcaatga tcttgccgc ctaccacccc 420
cagcagttca tctacgccgg ctcgctgtcg gcctgctgg acccctctca ggggatgggg 480

ES 2 751 423 T3

```

cctagcctga tggcctcgc gatgggtgac gccggcggtt acaaggccgc agacatgtgg 540
gtccctcga gtgaccggc atgggagcgc aacgacccta cgcagcagat cccaagctg 600
gtcgaaaca acaccggct atgggtttat tgcgggaacg gcacccgaa cgagttgggc 660
ggtgccaaca taccgcca gttcttggag aacttcgttc gtagcagcaa cctgaagttc 720
caggatgctg acaacggcgc gggcgggcac aacgccgtgt tcaacttccc gcccaacggc 780
acgcacagct gggagtactg gggcgctcag ctcaacgcca tgaagggtga cctgcagagt 840
tcgttaggcg ccggcatgct gcaaatcatg tacaactacc ccgcatggtt gggtcacgcc 900
gggatatgg ccgatatgc cggcacgctg cagagcttgg gtgccgagat cgccgtggag 960
caggccgctg tgcagagtgc gtggcagggc gataccggga tcacgtatca ggcgtggcag 1020
gcacagtgga accaggccat ggaagatttg gtgcgggcct atcatgcgat gtccagcacc 1080
catgaagcca acacatggc gatgatggcc cgcgacacgg ccgaagccgc caaatggggc 1140
ggctga 1146
    
```

<210> 5

<211> 381

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos Ag85B-TB10.4

10

<400> 5

```

Met Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro
 1      5      10      15
Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn
 20      25      30
Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr
 35      40      45
Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser
 50      55      60
Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser
 65      70      75      80
Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys
 85      90      95
Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn
 100     105     110
Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala
 115     120     125
Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile
 130     135     140
Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly
 145     150     155     160
Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala
 165     170     175
Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp
 180     185     190
Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp
 195     200     205
Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile
 210     215     220
Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe
 225     230     235     240
Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe
 245     250     255
Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn
 260     265     270
Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Met Ser Gln
 275     280     285
Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala
 290     295     300
Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu
 305     310     315     320
Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr
 325     330     335
Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg
 340     345     350
Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met
 355     360     365
Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
 370     375     380
    
```

ES 2 751 423 T3

<210> 6
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia de ADNc de tPA
 <400> 6
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
 10 tcgcccagcg agatctcctt c 81
 <210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos tPA
 20 <400> 7
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Glu Ile Ser Phe
 20 25
 <210> 8
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de péptido antigénico
 30 <400> 8
 Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly
 1 5 10 15
 Asp Leu Gln Ser
 20
 <210> 9
 35 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de péptido antigénico
 <400> 9
 Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met
 1 5
 45 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia de péptido antigénico
 <400> 10
 Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met
 1 5
 55 <210> 11
 <211> 3376
 <212> ADN

ES 2 751 423 T3

<213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

<220>

<223> segmento S del virus de la coriomeningitis linfocítica, secuencia completa

5

<400> 11

```

cgaccggg atcctaggct tttggattg cgctttcctc tagatcaact ggggtgcag 60
ccctatccta cagaaggatg ggtcagattg tgacaatggt tgaggctctg cctcacatca 120
tcgatgaggt gatcaacatt gtcattattg tgcttatcgt gatcacgggt atcaaggctg 180
tctacaatth tgccacctgt gggatattcg cattgatcag tttcctactt ctggctggca 240
ggctctgtgg catgtacggg ctaaaggac ccgacattta caaaggagtt taccaattta 300
agtccagtga gtttgatag tcacatctga acctgacct gcccacgca tgttcagcca 360
acaactccca ccattacatc agtatgggga cttctggact agaattgacc ttcaccaatg 420
attccatcat cagtcacaac ttttgcaatc tgacctctgc cttcaacaaa aagacctttg 480
accacacact catgagtata gtttcgagcc tacacctcag tatcagaggg aactccaact 540
ataaggcagt atcctgcgag tcaacaatg gcataacct ccaatacaac ttgacattt 600
cagatcgaca aagtgcctcag agccagtgtg gaaccttcag aggtagagtc ctgatattg 660
ttagaactgc cttcgggggg aaatacatga ggagtggctg gggctggaca ggctcagatg 720
gcaagaccac ctgggttagc cagacgagtt accaatacct gattatacaa aatagaacct 780
gggaaaacca ctgcacatat gcaggtcctt ttgggatgtc caggattctc ctttcccaag 840
agaagactaa gttcctcact aggagactag cgggcacatt cacctggact ttgtcagact 900
cttcaggggt ggagaatcca ggtggttatt gcctgaccaa atggatgatt ctgtctgcag 960
agcttaagtg tttcgggaac acagcagttg cgaaatgcaa tghtaatcat gatgccgaat 1020
tctgtgacat gctgcgacta attgactaca acaaggctgc tttgagtaag ttcaaagagg 1080
acgtagaatc tgccttgcac ttattcaaaa caacagtgaa ttctttgatt tcagatcaac 1140
tactgatgag gaaccttg agagatctga tgggggtgcc atattgcaat tactcaaagt 1200
tttggtagct agaacatgca aagaccggcg aaactagtgt cccaagtgc tggcttgtca 1260
ccaatggttc ttacttaaat gagaccact tcagtgatca aatcgaacag gaagccgata 1320
acatgattac agagatggtg aggaaggatt acataaagag gcaggggagt acccccctag 1380
cattgatgga ccttctgatg tttccacat ctgcatatct agtcagcatc ttctctgacc 1440
ttgtcaaaat accaacacac aggcacataa aagggtgctc atgtccaaag ccacaccgat 1500
taaccaacaa aggaatttgt agttgtggtg catttaaggt gcctggtgta aaaaccgtct 1560
ggaaaagacg ctgaagaaca gcgcctccct gactctccac ctcgaagag gtggagagtc 1620
agggaggccc agagggtcct agagtgtcac aacatttggg cctctaaaaa ttaggtcatg 1680
tggcagaatg ttgtgaacag tttcagatc tgggagcctt gctttggagg cgctttcaaa 1740
aatgatgagc tccatgagtg cacagtgcgg ggtgatctct ttcttctttt tgtoccttac 1800
tattccagta tgcactttac acaaccagcc atatttgtcc cacactttgt cttcactctc 1860
cctcgaagct tccctggtca tttcaacatc gataagctta atgtccttcc tattctgtga 1920
gtccagaagc tttctgatgt catcggagcc ttgacagctt agaaccatcc cctgcggaag 1980
agcactata actgacgagg tcaaccgggg ttgcgcatg aagaggtcgg caagatccat 2040
gccgtgtgag tacttggaat cttgctttaa ttgttttga tcaaccgggtt cctgtataaa 2100
gtgtatgaac tgcccgttct gtggttggaa aattgctatt tccactggat cattaatct 2160
accctcaatg tcaatccatg taggagcgtt ggggtcaatt cctcccatga ggtcttttaa 2220
aagcattgtc tggctgtagc ttaagcccac ctgaggtgga cctgctgctc caggcgctgg 2280
cctgggtgaa ttgactgcag gtttctcgct tgtgagatca attgttgtgt ttcccatgc 2340
tctcccaca atcgatgttc tacaagctat gtatggccat ccttcacctg aaaggcaaac 2400
ttatagagg atgttttcat aagggttccct gtcccaact tggctgaaa caaacatgtt 2460
gagttttctc ttggcccga gaactgcctt caagaggtcc tcgctgttgc ttggcttgat 2520
caaaattgac tctaacatgt taccoccatc caacagggct gccctgcct tcacggcagc 2580
accaagacta aagttatagc cagaatggtt gatgctggac tgctgttcag tgatgacccc 2640
cagaactggg tgcttctctt tcagcctttc aagatcatta agatttggat acttgactgt 2700
gtaaagcaag ccaaggtctg tgagcgttg tacaacgtca ttgagcggag tctgtgactg 2760
tttggccata caagccatag tttagacttg cattgtgcca aattgattgt tcaaaagtga 2820
tgagtctttc acatcccaaa ctcttaccac accacttgca ccctgctgag gctttctcat 2880
cccaactatc tgtaggatct gagatctttg gtctagtgtc tgtgttgtta agttccccat 2940
atatacccct gaagcctggg gcctttcaga cctcatgatc ttggccttca gcttctcaag 3000
gtcagccgca agagacatca gttcttctgc actgagcctc cccactttca aacattctt 3060
ctttgatggt gactttaaata ccacaagaga atgtacagtc tggttgagac ttctgagctc 3120
ctgtagggtc ttgtcatctc tcttttctt cctcatgatc ctctgaacat tgtgtactc 3180
agagaagtcc aaccatcca gaaggttgg tgcactctta atgacagcag ccttcacatc 3240
tgatgtgaag ctctgcaatt ctcttctcaa tgcttgcgtc cattggaagc tcttaacttc 3300
cttagacaag gacatcttgt tgctcaatgg tttctcaaga caaatgcgca atcaaatgcc 3360
taggatccac tgtgcg 3376

```

10 <210> 12
 <211> 3377
 <212> ADN
 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

15 <220>

ES 2 751 423 T3

<223> segmento S del virus de la coriomeningitis linfocítica, secuencia completa

<400> 12

```

gcgcaccggg gatcctaggc tttttggatt gcgctttcct ctagatcaac tgggtgtcag 60
gccatctcct acagaaggat gggtcagatt gtgacaatgt ttgaggctct gcctcacatc 120
atcgatgagg tgatcaacat tgtcattatt gtgcttatcg tgatcacggg tatcaaggct 180
gtctacaatt ttgccacctg tgggatattc gcattgatca gtttctact tctggctggc 240
aggtcctgtg gcatgtacgg tcttaaggga cccgacatth acaaaggagt ttaccaatth 300
aagtcaagtg agtttgatat gtcacatctg aacctgacca tgcccaacgc atgttcagcc 360
aacaactccc accattacat cagtatgggg acttctggac tagaattgac cttcaccaat 420
gattccatca tcagtcacaa cttttgcaat ctgacctctg ctttcaacaa aaagacctth 480
gaccacacac tcatgagtat agtttcgagc ctacacctca gtatcagagg gaactccaac 540
tataaggcag tatcctgcga cttcaacaat ggcataacca tccaatacaa cttgacattc 600
tcagatgcac aaagtgtca gagccagtgt agaacctca gaggtagagt cctagatatg 660
tttagaactg ccttcggggg gaaatacatg aggagtggct ggggctggac aaatagaacc 720
ggcaagacca cctggtgtag ccagacgagt taccaatacc tgattataca aaatagaacc 780
tgggaaaacc actgcacata tgcaggtcct tttgggatgt ccaggattct cttttcccaa 840
gagaagacta agttcctcac taggagacta gcgggcacat tcacctggac tttgtcagac 900
tcttcagggg tggagaatcc aggtggttat tgacctacca aatggatgat tcttgctgca 960
gagcttaagt gtttcgggaa cacagcagtt gcgaaatgca atgtaaatca tgatgaagaa 1020
ttctgtgaca tgctgcgact aattgactac aacaaggctg ctttgagtaa gttcaaagag 1080
gacgtagaat ctgccttgca cttattcaaa acaacagtga attccttgat ttcagatcaa 1140
ctactgatga ggaaccactt gagagatctg atgggggtgc catattgcaa ttactcaaag 1200
ttttggtacc tagaacatgc aaagaccggc gaaactagtg tccccagtg ctggcttctc 1260
accaatggtt cttacttaaa tgagaccacc ttcagtgacc aaatcgaaca ggaagccgat 1320
aacatgatta cagagatggt gaggaaggat tacataaaga ggcaggggag taccctccta 1380
gcattgatgg accttctgat gttttocaca tctgcatatc tagtcagcat cttoctgcac 1440
ctgtcaaaa taccaacaca caggcacata aaaggtggct catgtccaaa gccacaccga 1500
ttaaccaaca aaggaatttg tagtgtggt gcatttaagg tgacctgggt aaaaaccgtc 1560
tggaaaagac gctgaagaac agcgcctccc tgactctcca cctcgaagaa ggtggagagt 1620
cagggaggcc cagagggtct tagagtgtca caacatttg gcctctaaa attaggtcat 1680
gtggcagaat gttgtgaaca gttttcagat ctgggagcct tgctttggag gcgctttcaa 1740
aatgatgca gtccatgagt gcacagtgc ggtgatctc tttcttctt ttgtccctta 1800
ctattccagt atgcatctta cacaaccagc catatttgc ccacactttg tcttcatact 1860
ccctcgaagc ttccctggtc atttcaacat cgataagctt aatgctctt ctattctgtg 1920
agtccagaag ctttctgatg tcatcggagc cttgacagct tagaacatc ccctcgggaa 1980
gagcacctat aactgacgag gtcaaccocg gttgcgcatt gaagaggctc gcaagatcca 2040
tgccgtgtga gtacttgaa tcttgcttga attgttttg atcaacgggt tccctgtaaa 2100
agtgtatgaa ctgccogtct tgtggttga aaattgctat ttccactgga tcattaaatc 2160
taccctcaat gtcaatccat gtaggagcgt tggggtcaat tccctccatg aggtctttta 2220
aaagcattgt ctggctgtag cttaaagccc cctgaggtgg acctgctgct ccaggcgctg 2280
gcctgggtga attgactgca ggtttctcgc ttgtgagatc aattgttgtg ttttcccatg 2340
ctctcccac aatcgatggt ctacaagcta tgtatggcca tccttcacct gaaaggcaaa 2400
ctttatagag gatgttttca taagggttcc tgtcccac ttggtctgaa acaaacatgt 2460
tgagtthtct cttggccccg agaactgcct tcaagaggtc ctgctgttg cttggcttga 2520
tcaaaattga ctctaacatg ttacccccat ccaacagggc tgcccctgcc ttcacggcag 2580
caccaagact aaagttatag ccagaaatgt tgatgctgga ctgctgttca gtgatgacc 2640
ccagaactgg gtgctgtct ttcagccttt caagatcatt aagatttga tacttgactg 2700
tgtaaagcaa gccaaggtct gtgagcctt gtacaacgtc attgagcggg gtctgtgact 2760
gtttggccat acaagccata gttagacttg gcattgtgcc aaattgattg ttcaaaagtg 2820
atgagtcttt cacatcccaa actcttacca caccactgac acctgctgga ggctttctca 2880
tcccactact ctgtaggatc tgagatcttt ggtctagtth ctgtgttgtt aagttcccca 2940
tatatacccc tgaagcctgg ggcctttcag acctatgat cttggccttc agcttctcaa 3000
ggtcagccgc aagagacatc agttcttctg cactgagcct ccccactttc aaaacattct 3060
tctttgatgt tgactttaa tccacaagag aatgtacagt ctggttgaga cttctgagtc 3120
tctgtaggtc tttgtcatct ctcttttct tctctatgat cctctgaaca ttgctgacct 3180
cagagaagtc caaccattc agaaggttgg ttgcatcctt aatgacagca gccttcacat 3240
ctgatgtgaa gctctgcaat tctcttctca atgcttgcgt ccattggaag ctcttaactt 3300
ccttagacaa ggacatctg ttgctcaatg gtttctcaag acaaatgcgc aatcaaatgc 3360
ctaggatcca ctgtgctg 3377

```

5

<210> 13

<211> 7229

<212> ADN

10 <213> Virus de la coriomeningitis linfocítica

<220>

<223> Segmento L del virus de la coriomeningitis linfocítica, secuencia completa

15 <400> 13

ES 2 751 423 T3

gcgcaccggg gatcctaggc gtttagttgc gctgtttggg tgcacaactt tcttcgtgag 60
 gctgtcagaa gtggacctgg ctgatagcga tgggtcaagg caagtccaga gaggagaaag 120
 gcaccaatag tacaacacagg gccgaaatcc taccagatac cacctatcct ggccctttaa 180
 gctgcaaate ttgctggcag aaatttgaca gcttggttaag atgccatgac cactaccttt 240
 gcaggcactg tttaaacctt ctgctgtcag tatccgacag gtgtcctcct tgtaaatatc 300
 cattaccaac cagattgaag atatcaacag cccaagctc tccacctccc tacgaagagt 360
 aacaccgtcc ggccccggcc cggacaaaca gccagcaca agggaaaccg acgtcaccca 420
 acgcacacag acacagcacc caacacagaa cacgcacaca cacacacaca cacaccaca 480
 cgcaagcgcc cccaccaccg gggggcgccc cccccgggg ggcggccccc cgggagcccg 540
 ggcggagccc cacggagatg cccatcagtc gatgtcctcg gccaccgacc cgcccagcca 600
 atcgtcgcag gacctcccct tgagtctaaa cctgcccccc actgtttcat acatcaaagt 660
 gctcctagat ttgctaaac aaagtctgca atccttaaag gcgaaccagt ctggcaaaag 720
 cgacagtgga atcagcagaa tagatctgtc tatacatagt tcctggagga ttacacttat 780
 ctctgaacct aacaaatggt caccagttct gaatcgatgc aggaagaggt tcccaggac 840
 atcactaatc ttttcatagc cctcaagtcc tgctagaaag actttcatgt ccttggctc 900
 cagcttcaca atgatatttt ggacaagggt tcttccttca aaaagggcac ccatctttac 960
 agtcagtggc acaggctccc actcaggtcc aactctctca aagtcaatag atctaatacc 1020
 atccagtatt cttttggagc ccaacaactc aagctcaaga gaatcaccaa gtatcaaggg 1080
 atcttccatg taatcctcaa actcttcaga tctgatatca aagacaccat cgttcacctt 1140
 gaagacagag tctgtcctca gtaagtggag gcattcatcc aacattcttc tatctatctc 1200
 acccttaaag aggtgagagc atgataaaag ttcagccaca cctggattct gtaattggca 1260
 cctaaccaag aatatcaatg aaaatttcct taaacagtca gtattattct gattgtgctg 1320
 aaagtccact gaaattgaaa actccaatac cccttttgtg tagttgagca tgtagtccca 1380
 cagatccttt aaggatttaa atgcctttgg gtttgtcagg ccctgcctaa tcaacatggc 1440
 agcattacac acaacatctc ccattcggta agagaaccac ccaaaaccaa actgcaaatc 1500
 attcctaaac ataggcctct ccacattttt gttcaccacc tttgagacaa atgattgaaa 1560
 ggggccagat gcctcagcac catcttcaga tggcatcatt tctttatgag ggaacctatg 1620
 aaaattgcct aatgtcctgg ttgttgaac aaattctcga acaaatgatt caaaatacac 1680
 ctgttttaag aagttcttgc agacatccct cgtgctaaca acaaattcat caaccagact 1740
 ggagtcagat cgctgatgag aattggcaag gtcagaaaac agaacagtgt aatgttcatc 1800
 ccttttccac ttaacaacat gagaatgag tgacaaggat tctgagttaa tatcaattaa 1860

ES 2 751 423 T3

aacacagagg tcaaggaatt taattctggg actccacctc atgttttttg agctcatgtc 1920
 agacataaat ggaagaagct gatcctcaaa gatcctggga tatagccgcc tcacagattg 1980
 aatcacttgg ttcaaatcca ctttgcctc cagtagcctt gagctctcag gctttccttg 2040
 tacataatca catgggttta agtgcttaag agttaggttc tcaactgtat cttcccttt 2100
 ggtcggttct gctaggacc ccaacaccca ctcaaaagag ttgctcaatg aaatacaaat 2160
 gtatgcccaa agaagaggcc ttaaaaggca tatatgatca cgggtggcct ctggatgaga 2220
 ctgtttgtca caaatgtaca gcggtatacc atcccgatg caaactcttg tcaatgatc 2280
 atctgtgggt agatcctcaa gcagcttttt gatatacaga tttccctat tttgtttct 2340
 cacacacctg cttcctagag ttttgcaaag gcctataaag ccagatgaga tacaactctg 2400
 gaaagctgac ttgttgattg cttctgacag cagcttctgt gcacccttg tgaatttact 2460
 acaaaagttg ttctggagtg tcttgatcaa tgatgggatt ctttccctt gaaagtc 2520
 cactgatgga taaaccact tttgtcttaa aaccatcctt aatgggaaca ttcattcaa 2580
 attcaaccag ttaacatctg ctaactgatt cagatcttct tcaagaccga ggaggctcc 2640
 caattgaaga atggcctcct ttttatctct gttaaatagg tctaagaaa atcttcatt 2700
 aaattcacca tttttgagct tatgatgcag tttccttaca agctttctta caaccttctg 2760
 ttcatatgga cacagtctct caatgagtct ttgtattctg taacctctag aacctccaag 2820
 ccaatctttc acatcagtgt tggatctcag tagaaatgga tccaaaggga aattggcata 2880
 ctttaggag tccagtgttc tcctttggat actattaact agggagactg ggacgccatt 2940
 tgcgatggct tgatctgcaa ttgtatctat tgtttcacia agttgatgtg gctctttaca 3000
 cttgacattg tgtagcgtct cagatacacia ctttgtgaga agagggactt cctcccaca 3060
 tacatagaat ctatagttta attctgcagc gaacctccca gccacacttt ttgggctgat 3120
 aaatttgttt aacaagccgc tcagatgaga ttggaattcc aacaggaca ggacttctc 3180
 cggatcactt acaaccaggt cactcagcct cctatcaaat aaagtgatct gatcatcact 3240
 tgatgtgtaa gcctctggct tttcgcacia gataacacca atgcagtgt tgatgaaact 3300
 ctgcataagc aaacctatga agtcagaagc attatgcaag attccctgcc ccatatcaat 3360
 aaggctggat atatgggatg gcactatccc catttcaaaa tattgtctga aaattctctc 3420
 agtaacagtt gtttctgaac ccctgagaag ttttagcttc gacttgacat atgatttcat 3480
 cttgctcatt acaacaggaa aggggacctc gacaagctta tgcagtgtcc aagttaaca 3540
 agtctaaca tgatctttcc cggaacgcac atactggtca tcacctagt ttgagattttg 3600
 tagaaacatt aagaacaaaa atgggcacat cattggtccc catttgctgt gatccatact 3660
 atagtttaag aaccttccc gcacattgat agtcattgac aagattgcat tttcaaatc 3720
 cttatcattg ttaaacaggt agcctgaaaa gaaactgaa aaagactcaa aataatctc 3780
 tattaacctt gtgaacattt ttgtcctcaa atctccaata tagagttctc ttttcccc 3840
 aacctgctct ttataagata gtgcaaattt cagcctcca gactcaggac ctactgaggt 3900
 gtatgatggt ggtgatcttt ctgagtagaa gcacagattt ttcaaagcag cactcataca 3960
 ttgtgtcatt gacagagctt tactaaggga ctcaagaatta ctttccctct cactgattct 4020
 cacgtcttct tccagtttgt cccagtcaaa tttgaaattc aagccttgc tttgcatatg 4080
 cctgtatttc cctgagtacg catttgcatt catttgcac agaatcatct tcacgaaga 4140
 aaaccaatca ttctcagaaa agaactttct acaaagttt tttgccatct catogaggcc 4200
 acatcattg ttaatgacta aggtgaaata caaagtgac agctctgtgg aacctcaac 4260
 agcctcacag ataaatttca tgtcatcatt ggtagacat gatgggtcaa agtcttctac 4320
 taaatggaaa gatatttctg acaagataac ttttcttaag tgagccatct tcctgttag 4380
 aataagctgt aaatgatgta gtccttttgt atttgtaagt ttttctccat ctcccttctc 4440
 attggccctc ctacctcttc tgtaccgtgc tattgtgggt ttgacctttt ctctgagact 4500
 tttgaagaag cttgtctctt cttctccatc aaaacatatt tctgccaggt tgtcttccga 4560
 tctccctgtc tcttctccct tggaaaccgat gaccaatcta gagactaaact tggaaacttt 4620
 atattcatag tctgagtggc tcaacttata cttttgtttt cttacgaaac tctccgtaat 4680
 ttgactcaca gcactaacia gcaatttgtt aaagtcatat tccagaagtc gttctccatt 4740
 tagatgctta ttaaccacca cacttttgtt actagcaaga tctaattgctg tcgcacatcc 4800
 agagttagtc atgggatcta ggctgtttag cttcttctct ctttgaaaa ttaaagtgcc 4860
 gttgttaaat gaagacacca ttaggctaaa ggcttccaga ttaacacctg gaggttgatg 4920
 ctgacagtca atttctttac tagtgaatct cttcatttgc tcatagaaca cacattctc 4980
 ctgaggagt attgcttctc tggggttgac aaaaaacca aattgacttt tgggctcaa 5040
 gaacttttca aaacatttta tctgatctgt tagcctgtca ggggtctcct ttgtgatcaa 5100
 atgacacag tatgacacat tcaacataaa tttaaatttt gcaactcaaca acaccttctc 5160
 accagtacca aaaatagttt ttattaggaa tctaagcagc ctaacaccca cttctcagc 5220
 aggtgtgatc agatcctccc tcaacttatc cattaatgat gtagatgaaa aatctgacac 5280
 tattgccatc accaaatctc tgacactctg tacctgcttt tgatttctct ttgttgggtt 5340
 ggtgagcatt agcaacaata gggctcctcag tgcaacctca atgtcgggtg gacagtcttt 5400
 caaatcagga catgatctaa tccatgaaat catgatgtct atcatattgt taagacctc 5460
 atctgaaaaa attggtaaaa agaacctttt aggatctgca tagaaggaaa ttaaatgacc 5520
 atccgggcct tgtatggagt agcaccttga agattctcca gtcttctgggt ataatagtg 5580
 gtattcttca gagtccagtt ttattacttg gcaaaacact tctttgactt ctaccacttg 5640

ES 2 751 423 T3

atatctcaca	gaccctat	gattttgcct	tagtctagca	actgagctag	ttttcatact	5700
gtttgttaag	gccagacaaa	cagatgataa	tcttctcagg	ctctgtatgt	tcttcagctg	5760
ctctgtgctg	ggttggaat	tgtaatcttc	aaacttcgta	taatacatta	tcgggtgagc	5820
tccaattttc	ataaagtct	caaattcagt	gaatggtag	tggcattctt	gctcaagggtg	5880
ttcagacagt	ccgtaatgct	cgaaactcag	tcccaccact	aacaggcatt	tttgaatttt	5940
tgcaatgaac	tcactaatag	atgccctaaa	caattcctca	aaagacacct	ttctaaacac	6000
ctttgacttt	tttctattcc	tcaaagtct	aatgaactcc	tctttagtgc	tgtgaaagct	6060
taccagccta	tcattcacac	tactatagca	acaaccacc	cagtgtttat	cattttttaa	6120
ccctttgaat	ttcgactggt	ttatcaatga	ggaaagacac	aaaacatcca	gatttaacaa	6180
ctgtctcctt	ctagtattca	acagtttcaa	actcttgact	ttgtttaaca	tagagaggag	6240
cctctcatal	tcagtgctag	tctcacttcc	cctttcgtgc	ccatgggtct	ctgcagttat	6300
gaatctcatc	aaaggacagg	attcgactgc	ctccctgctt	aatgttaaga	tatcatcact	6360
atcagcaagg	ttttcataga	gctcagagaa	ttccttgatc	aagccttcag	ggtttacttt	6420
ctgaaagttt	ctctttaatt	tcccactttc	taaactctctt	ctaaacctgc	tgaaaagaga	6480
gtttattcca	aaaaccacat	catcacagct	catggtgggg	ttgatgcctt	cgtggcacat	6540
cctcataatt	tcatcattgt	gagttgacct	cgcactcttc	agaattttca	tagagtccat	6600
accggagcgc	ttgtcgatag	tagtcttcag	ggactcacag	agtctaaaat	attcagactc	6660
ttcaaagact	ttctcatttt	ggttagaata	ctccaaaagt	ttgaataaaa	ggtctctaaa	6720
tttgaagttt	gccactctg	gcataaaaact	attatcataa	tcacaacgac	catctactat	6780
tggaactaat	gtgacacccg	caacagcaag	gtcttcctcg	atgcatgcca	atgtgttagt	6840
gtcctctata	aatttcttct	caaaactggc	tggagtgtct	ctaacaaaac	actcaagaag	6900
aatgagagaa	ttgtctatca	gcttgtaacc	atcaggaatg	ataagtggta	gtcctgggca	6960
tacaattcca	gactccacca	aaattgtttc	cacagactta	tcgtcgtggg	tgtgtgtgca	7020
gccactcttg	tctgactgt	ctatttcaat	gcagcgtgac	agcaacttga	gtccctcaat	7080
cagaaccatt	ctgggttccc	tttgtcccag	aaagttgagt	ttctgccttg	acaacctctc	7140
atcctgttct	atatagtta	aacataactc	tctcaattct	gagatgattt	catccattgc	7200
gcataaaaa	gcctaggatc	ctcggtgcg				7229

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso como una vacuna en un método para tratar o prevenir una infección con *M. tuberculosis* en un lactante, en donde la partícula comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano, en donde el antígeno micobacteriano es una proteína de fusión entre Ag85B y TB10.4, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y en donde el antígeno micobacteriano se fusiona a un péptido señal de un activador de plasminógeno tisular.
- 10 2. La partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso de la reivindicación 1, en donde el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular es un péptido señal N-terminal.
- 10 3. La partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso de la reivindicación 1, en donde el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular dirige el direccionamiento al retículo endoplásmico.
- 15 4. La partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso de la reivindicación 1, en donde el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7.
- 15 5. La partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular y la proteína de fusión comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.
- 20 6. La partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde un marco de lectura abierto del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.
- 20 7. La partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso de la reivindicación 6, en donde el marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.
- 25 8. La partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de virus infeccioso de la coriomeningitis linfocítica deficiente en la replicación y un vehículo farmacéuticamente inactivo para uso como una vacuna en un método para tratar o prevenir una infección con *M. tuberculosis* en un lactante, en donde la partícula comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno micobacteriano, en donde el antígeno micobacteriano es una proteína de fusión entre Ag85B y TB10.4, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y en donde el antígeno micobacteriano se fusiona a un péptido señal de un activador de plasminógeno tisular.
- 35 10. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9, en donde el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular es un péptido señal N-terminal.
- 35 11. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9, en donde el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular dirige el direccionamiento al retículo endoplásmico.
- 40 12. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9, en donde el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7.
- 40 13. La composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el péptido señal de un activador de plasminógeno tisular y la proteína de fusión comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.
- 45 14. La composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde un marco de lectura abierto del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.
- 45 15. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 14, en donde el marco de lectura abierto que codifica la glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica se elimina o se inactiva funcionalmente.
- 45 16. La composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 que comprende un segmento genómico, en donde el segmento genómico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.

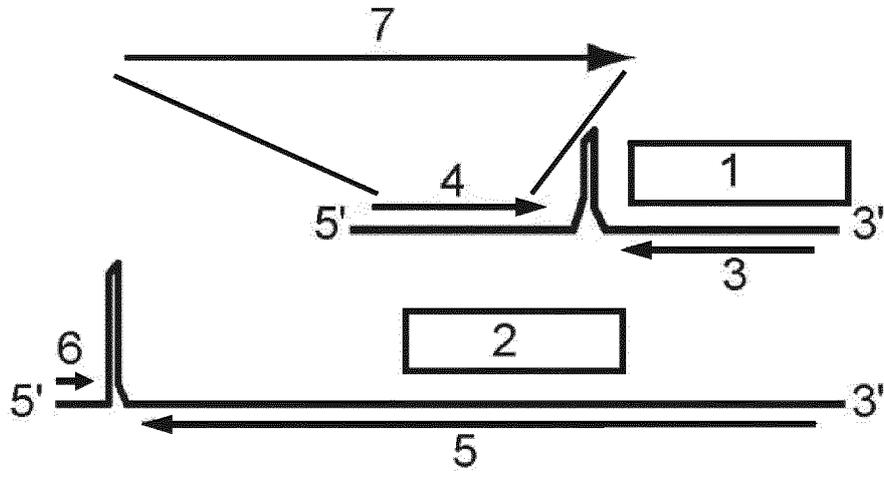


FIG. 1

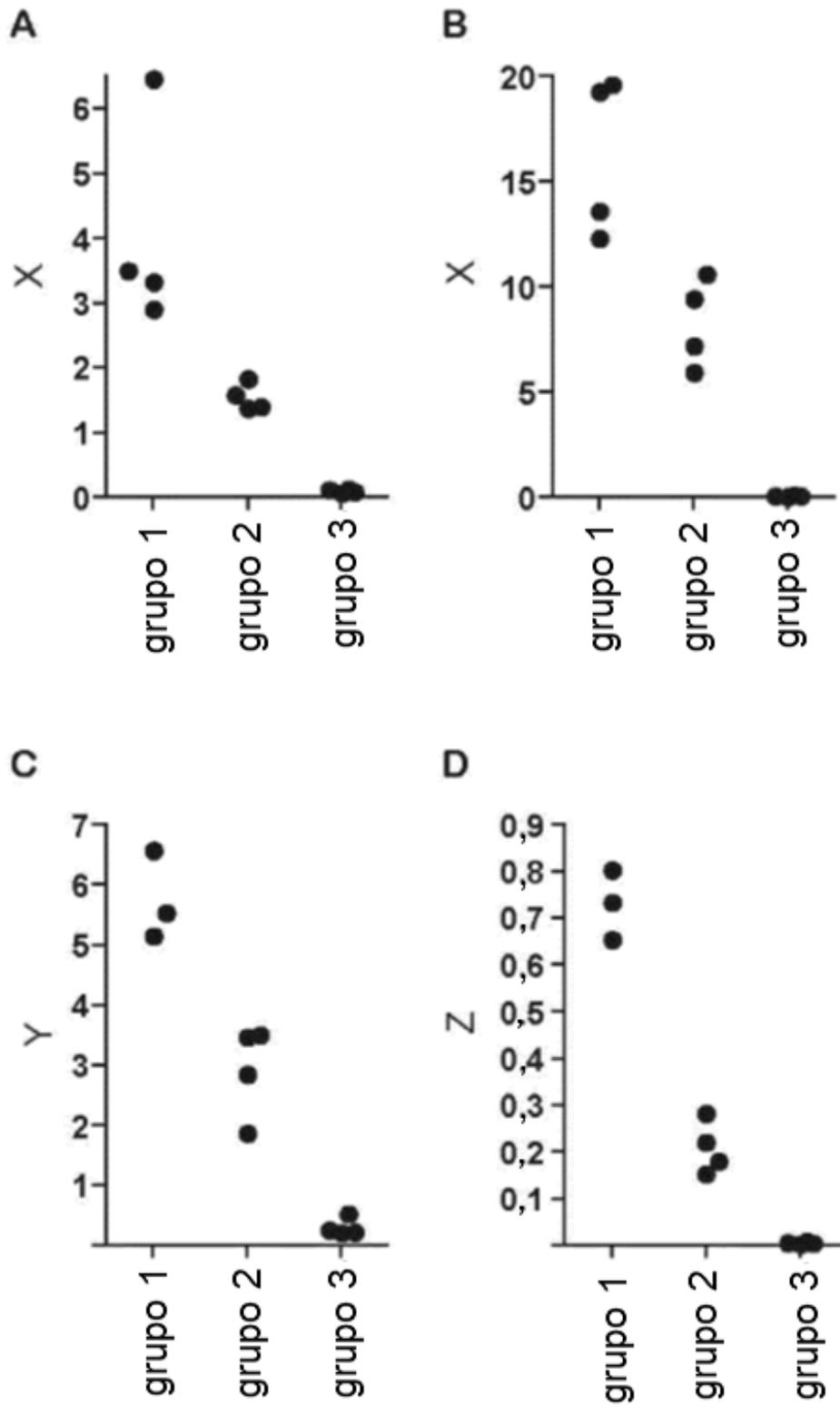


FIG. 2

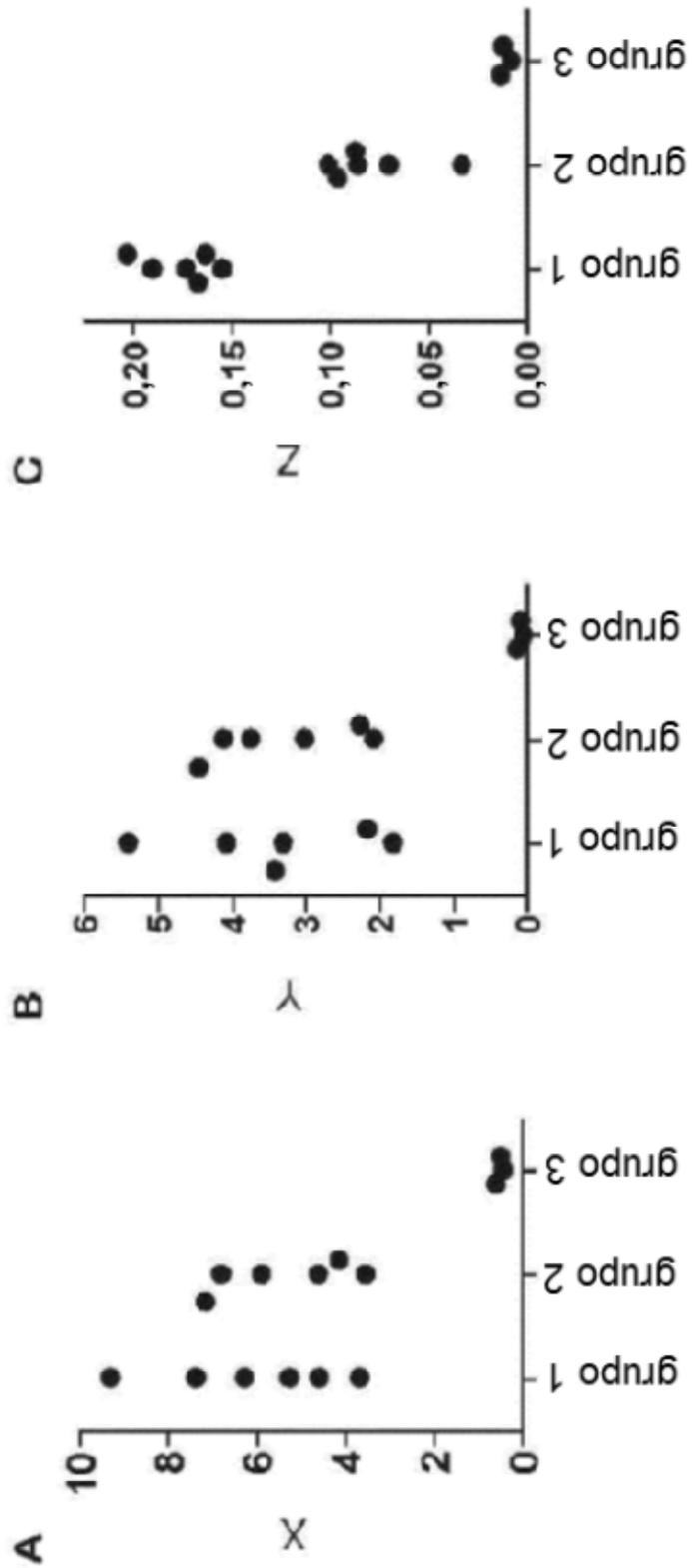


FIG. 3

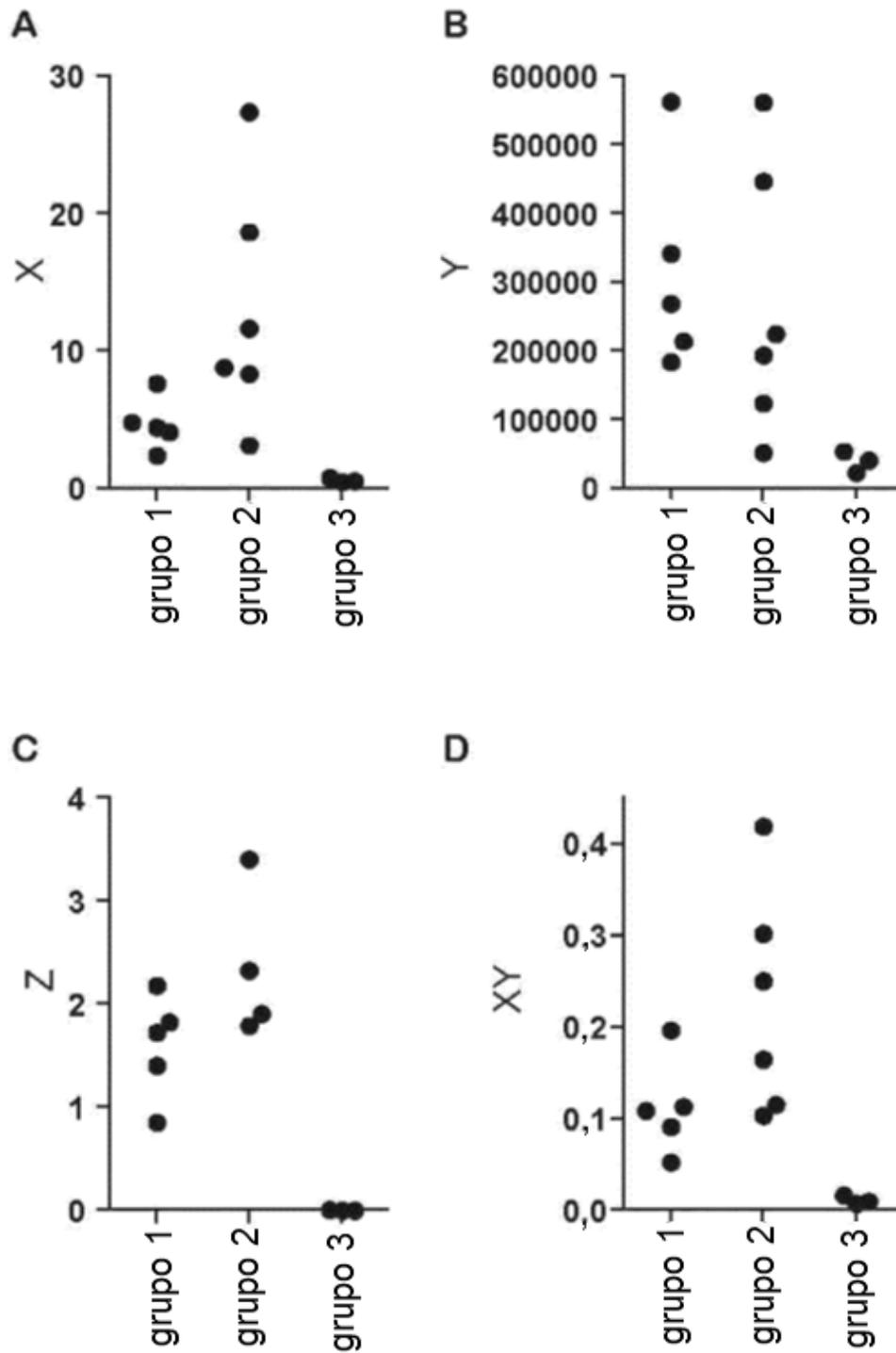


FIG. 4