



SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009231- -00000-0000

Fecha: 2011-01-27 16:29:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII Ev: 378 FASENACIONALI

Act 411 PRESENTACION Folios: 376

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO: **“COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 14/35**

71. SOLICITANTE: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. Y
GLAXO GROUP LIMITED

DOMICILIO: RIXENSART, BÉLGICA Y MIDDLESEX,
INGLATERRA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. _____

(FORMA P 10).

25.02.2011

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009231- -00000-0000

Fecha: 2011-01-27 16:29:30 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 378

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **GLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A. y GLAXO GROUP
LIMITED**

Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart, Bélgica y Glaxo Wellcome
House, Berkeley Avenue, Greenford
Middlesex UB6 0NN, Inglaterra.

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart,
Bélgica y Middlesex, Inglaterra.

Lugar de Constitución: Bélgica e
Inglaterra y Gales.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **BROWN, James; METTENS, Pascal y MURPHY, Dennis.**

Dirección: c/o GlaxoSmithKline, 1250 S. Collegeville Road, P.O. Box 5089,
Collegeville, Pennsylvania 19426 y GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de
l'Institut 89, B-1330 Rixensart.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Bélgica.

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/059580

Fecha: 24/07/09

Publicación Internacional No. WO 2010/010177 A1

Fecha: 28/01/10

⑥

Título (54) "COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/35

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

25-07-08

(31) Número de Solicitud

61/083,720

⑨

Comprobante de Pago No. 11-001940

Fecha: 12-01-2011

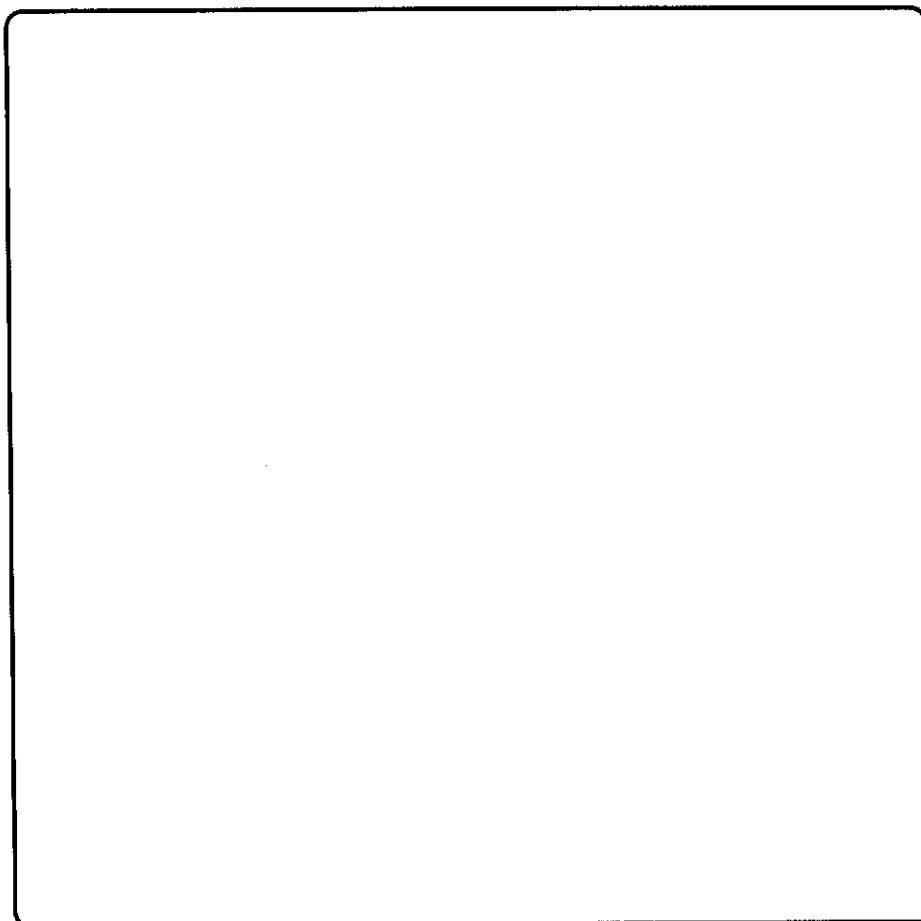
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Opinión Escrita y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 001940

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 07:38:42

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	142967230	11/01/2011	31.003.700.00

*** Conceptos Pagados ***

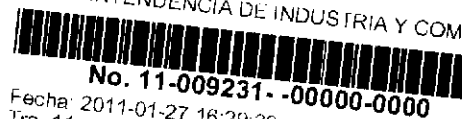
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009231-00000-0000

Fecha: 2011-01-27 16:29:30 Dep. 2020 DIR. NUEVASOR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 376

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 12 de 2011 - 07:39:04

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

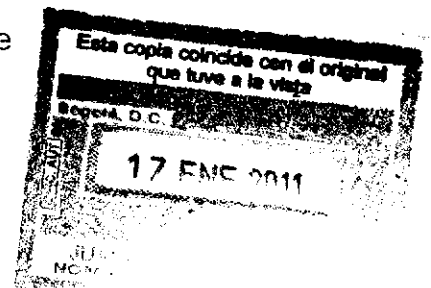
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **G 749037**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

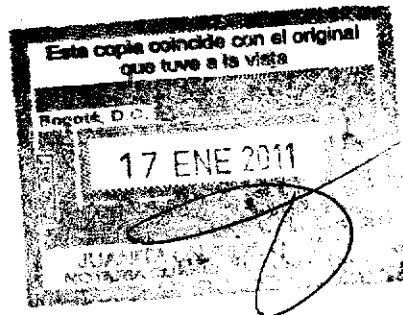
260567

Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

UES
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

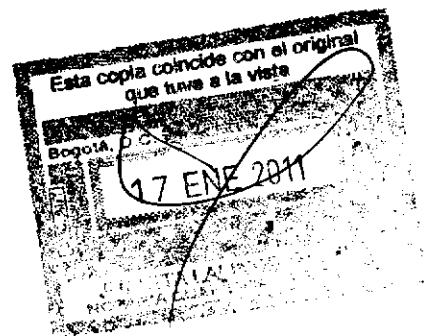
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**" (anteriormente denominada "**Smithkline Beecham Biologicals s.a.**"), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

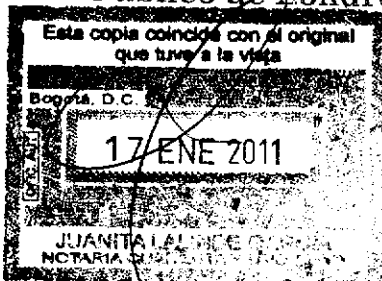
QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

Handwritten signature

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by a été signé par James Keef Milligan
3. acting in the capacity of agissant en qualité de Notary Public
4. bears the seal/stamp of est revêtu du sceau/timbre de Notary Public

Certified/Attesté

5. at London/à Londres 6. the/le 01 SEP 2004
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

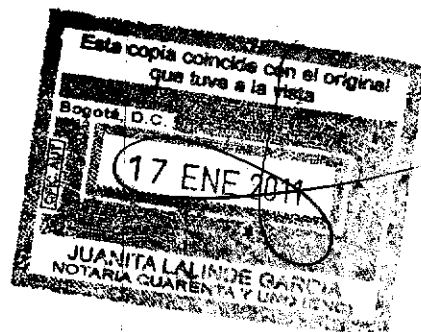
8. Number/sous No **G 749037**

9. Stamp:
timbre:



10. Signature: W GLASS

W Glass
For the Secretary of State/Pour le Secrétaire d'Etat



If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

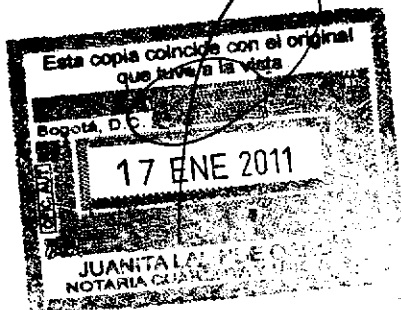
con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this

Marcus Jonathan William Dalton
Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder, que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

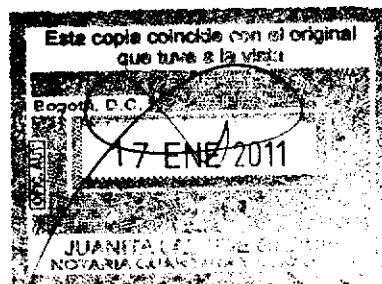
On this day of 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of

and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

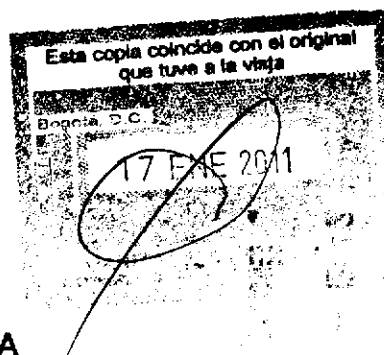


TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-02-440
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, Documento escrito en inglés y en español.

Notarización del documento es español.
Hay un sello rojo sobre una cinta verde.



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. Pais: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado por Martin E Buchner
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 26 de agosto de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número G499865
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)
- Sello de la Oficina de Asuntos
- M. Monaghan

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

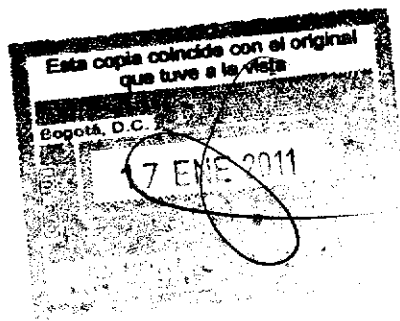
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258650
Ana Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2009 SET-3 P 0:12

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



Exteriores y del Commonwealth

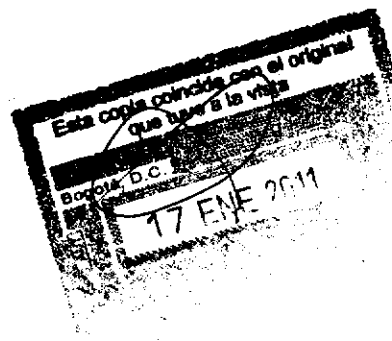
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse en la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es auténtica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido a mi mejor saber y entender, este día 2 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **Martin Emil BUCHNER**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **Peter John GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "**GLAXO GROUP LIMITED**", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número **305979**, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

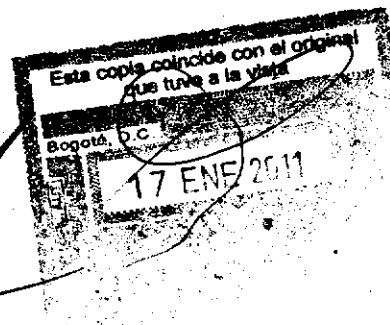
QUE el citado Señor Don **Peter John GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 30 de enero de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy veintiseis de agosto del año dos mil cuatro.



Martin Emil BUCHNER
Notario Publico de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Martin E Buchner**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

6. the/le **26 August 2004**

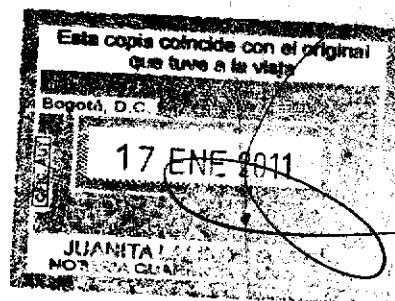
5. at London/à Londres

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G499865**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **M. Monaghan**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

Los abajo firmados, **GLAXO GROUP LIMITED**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Inglaterra y Gales..

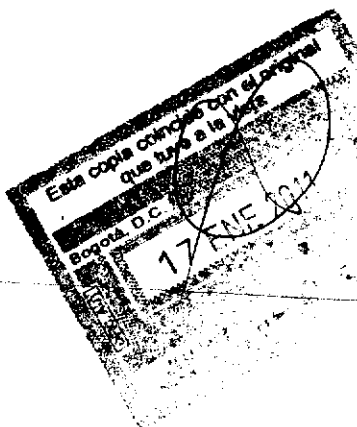
con domicilio en **Glaxo Wellcome House
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Inglaterra**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, **GLAXO GROUP LIMITED**, a corporation organized and existing under the laws of England and Wales.

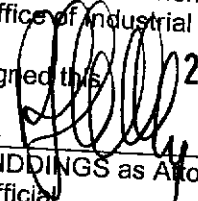
domiciled at **Glaxo Wellcome House
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Great Britain**

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this **23 AUG 2004**


Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorised Official
NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACION SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 14/35	
(22) Fecha de solicitud: 27-01-11		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. y GLAXO GROUP LIMITED	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/083,720	(32) Fecha 25-07-08	(33) Pais US
		(72) Inventor(es): BROWN, James; METTENS, Pascal y MURPHY, Dennis.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25-02-11		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 28-01-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 24-07-09		N° publicación: WO 2010/010177 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2009/059580			
(54) Titulo: COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un polipéptido aislado, el cual comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
 - (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
 - (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c,
- para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION **PCT** X **MODELO DE UTILIDAD** **DISEÑO INDUSTRIAL**

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 27-01-11

(51) Clasificación Internacional: C07K 14/35

(71) Solicitante(s) **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. y GLAXO GROUP LIMITED**

(72) Inventor(es) **BROWN, James; METTENS, Pascal y MURPHY, Dennis**

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

(32)

Fecha

(33) **País**

61/083,720

25-07-08

US

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25-02-2011

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **24-07-09**

No. de solicitud **PCT/EP2009/059580**

(87) Publicación internacional

Fecha: **28-01-10**

N° publicación: **WO 2010/010177 A1**

(54) Título: **"COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS"**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCIÓN

PCT X

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 27-01-11

(51) Clasificación Internacional: C07K 14/35

(71) Solicitante(s) **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. y GLAXO GROUP LIMITED**

(72) Inventor(es) **BROWN, James; METTENS, Pascal y MURPHY, Dennis**

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**
61/083,720

(32) **Fecha**
25-07-08

(33) **País**
US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 25-02-2011

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 24-07-09

No. De solicitud **PCT/EP2009/059580**

(87) Publicación internacional:

Fecha: 28-01-10

No. Publicación: **WO 2010/010177 A1**

FIGURA CARACTERISTICA

6 x 6 cm

(54) Título: **"COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Un polipéptido aislado, el cual comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
 - (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
 - (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c,
- para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AJT/VB63090	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2009/059580	International filing date (day/month/year) 24/07/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 25/07/2008
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/059580

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/059580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/35 A61K39/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data, COMPENDEX, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98/53075 A2 (CORIXA CORP [US]) 26 November 1998 (1998-11-26) cited in the application the whole document, in particular SEQ ID NOs: 137 and 138	1-86
Y	WO 01/62893 A2 (CORIXA CORP [US]; CAMPOS NETO ANTONIO [US]; SKEIKY YASIR [US]; OVENDAL) 30 August 2001 (2001-08-30) the whole document, in particular SEQ ID NOs: 137 and 138	1-86
Y	US 2004/086523 A1 (SKEIKY YASIR [US] ET AL) 6 May 2004 (2004-05-06) the whole document, in particular SEQ ID NOs: 28 and 29	1-86
--/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 9 November 2009		Date of mailing of the International search report 17/12/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bassias, Ioannis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/059580

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/197896 A1 (COLE STEWART [FR]) 7 October 2004 (2004-10-07) the whole document, in particular Table 2	1-86
Y	FORTUNE S M ET AL: "Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, no. 30, July 2005 (2005-07), pages 10676-10681, XP002554331 ISSN: 0027-8424 the whole document -& DATABASE EMBL [Online] 28 June 2005 (2005-06-28), "Integrating expression vector pALE2, complete sequence." XP002554336 retrieved from EBI accession no. EMBL:DQ086480 Database accession no. DQ086480	1-86
Y	WO 2008/007942 A1 (HET NL KANKER I [NL]; SPEELMAN-VAN DER WEL NICOLE NE [NL]; BRENNER MIC) 17 January 2008 (2008-01-17) see the whole document, in particular claims 11,12,18-23,25,26 and p.9, 3rd and 4th paragraph	1-86
Y	REED S ET AL: "Tuberculosis vaccine development; from mouse to man" MICROBES AND INFECTION, vol. 7, no. 5-6, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 922-931, XP004936675 ELSEVIER, PARIS, FR ISSN: 1286-4579 the whole document, in particular p. 924, right-hand column, second table	1-86
Y	MUSTAFA A S ET AL: "Immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis antigens in Mycobacterium bovis BCG-vaccinated and M-bovis-infected cattle" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 74, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 4566-4572, XP002554332 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-86
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/059580

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AL-ATTIYAH R ET AL: "In vitro cellular immune responses to complex and newly defined recombinant antigens of Mycobacterium tuberculosis" CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 138, no. 1, October 2004 (2004-10), pages 139-144, XP002554333 ISSN: 0009-9104 the whole document, in particular Tables 1,3,4 and 5	1-86
Y	MCLAUGHLIN BRYANT ET AL: "e105: A mycobacterium ESX-1-Secreted virulence factor with unique requirements for export" PLOS PATHOGENS, vol. 3, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 1051-1061, XP002554334 ISSN: 1553-7366 the whole document	1-86
A	RAVIGLIONE MC ET AL: "Chapter 150: Tuberculosis + TITELSEITE + ISBN SEITE" HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE (16TH EDITION), vol. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 953-966, XP009125114 MCGRAW-HILL, MEDICAL PUBLISHING DIVISION ISBN: 978-0-07-139140-5 cited in the application	
P,Y	SIMEONE R ET AL: "ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction" CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, vol. 12, no. 1, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 4-10, XP026194629 CURRENT BIOLOGY LTD, GB ISSN: 1369-5274 [retrieved on 2009-01-18] the whole document, in particular p.6	1-86
P,Y	RAGHAVAN SRIDHARAN ET AL: "Secreted transcription factor controls Mycobacterium tuberculosis virulence" NATURE, vol. 454, no. 7205, August 2008 (2008-08), page 717, XP002554335 (LONDON) ISSN: 0028-0836 the whole document	1-86

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/059580

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 46-73 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/059580

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9853075	A2	26-11-1998	AU 742751 B2	10-01-2002
			AU 7690798 A	11-12-1998
			BR 9809445 A	13-06-2000
			CA 2290774 A1	26-11-1998
			CZ 9904100 A3	17-05-2000
			EP 1012293 A2	28-06-2000
			HU 0003402 A2	28-12-2000
			JP 4162155 B2	08-10-2008
			JP 2002514084 T	14-05-2002
			KR 20060066139 A	15-06-2006
			KR 20070026886 A	08-03-2007
			KR 20080036663 A	28-04-2008
			NO 995689 A	18-01-2000
			NZ 501310 A	28-09-2001
			TR 200000115 T2	21-11-2000
WO 0162893	A2	30-08-2001	AU 4173801 A	03-09-2001
US 2004086523	A1	06-05-2004	AT 442866 T	15-10-2009
			AU 6867801 A	02-01-2002
			AU 2001268678 B2	16-11-2006
			CA 2413959 A1	27-12-2001
			EP 1542732 A2	22-06-2005
			JP 2004526405 T	02-09-2004
			WO 0198460 A2	27-12-2001
			US 2006193876 A1	31-08-2006
			US 2009004226 A1	01-01-2009
			US 2009018095 A1	15-01-2009
			US 2008161263 A1	03-07-2008
			US 2008317716 A1	25-12-2008
US 2004197896	A1	07-10-2004	AU 2002302919 A1	03-10-2002
			CA 2438279 A1	26-09-2002
			CN 1599751 A	23-03-2005
			EP 1401866 A2	31-03-2004
			WO 02074903 A2	26-09-2002
WO 2008007942	A1	17-01-2008	EP 2046952 A1	15-04-2009
			WO 2008007953 A1	17-01-2008
			US 2009263418 A1	22-10-2009

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
28 January 2010 (28.01.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/010177 A1

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/35 (2006.01) A61K 39/04 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2009/059580
- (22) International Filing Date:
24 July 2009 (24.07.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/083,720 25 July 2008 (25.07.2008) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN (GB).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **BROWN, James** [US/US]; GlaxoSmithKline, 1250 S. Collegeville Road, P O Box 5089, Collegeville, Pennsylvania 19426 (US). **METTENS, Pascal** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **MURPHY, Dennis** [US/US]; c/o GlaxoSmithKline, 1250 S. Collegeville Road, P O Box 5089, Collegeville, Pennsylvania 19426 (US).
- (74) Agents: **LOVATT, Victoria Jayne** et al.; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: NOVEL COMPOSITIONS AND METHODS

(57) Abstract: The present invention is directed to a polypeptide which comprises: (i) an Rv3616c protein sequence; (ii) a variant of an Rv3616c protein sequence; or (iii) an immunogenic fragment of an Rv3616c protein sequence for use in the treatment or prevention of latent TB. In other aspects the invention is directed to associated polynucleotides, fusion proteins and methods for the treatment or prevention of latent tuberculosis.

WO 2010/010177 A1

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2009/059580

International filing date (day/month/year)
24.07.2009

Priority date (day/month/year)
25.07.2008

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/35 A61K39/04

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1 (a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office

D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bassias, Ioannis

Telephone No. +49 89 2399-8106



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/059580

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/059580

Box No. II Priority

1. ☐ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/059580

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 46-73

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 46-73 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☒ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/059580

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-86</u>
	No: Claims	=
Inventive step (IS)	Yes: Claims	=
	No: Claims	<u>1-86</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-86</u>
	No: Claims	=

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2009/059580

Re Item II

1. It appears that the priority is validly claimed. Consequently, the documents cited in the International Search Report as "P/Y"-documents are not considered prior art.

- D11: SIMEONE R ET AL: "ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction" CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, GB, vol. 12, no. 1, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 4-10, XP026194629 ISSN: 1369-5274 [retrieved on 2009-01-18]
- D12: RAGHAVAN SRIDHARAN ET AL: "Secreted transcription factor controls Mycobacterium tuberculosis virulence" NATURE (LONDON), vol. 454, no. 7205, August 2008 (2008-08), page 717, XP002554335 ISSN: 0028-0836

Re Item III

1. Claims 46-73 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to patentability of the subject-matter of these claims.

Re Item V

1. The present application relates to the Rv3616c protein, the corresponding encoding polynucleotide and uses thereof in the treatment and/or prevention of latent tuberculosis.
2. Reference is made to the following documents (the document numbering corresponds to their order of citation in the International Search Report):
 - D1: WO 98/53075 A (CORIXA CORP [US]) 26 November 1998 (1998-11-26) cited in the application
 - D2: WO 01/62893 A (CORIXA CORP [US]; CAMPOS NETO ANTONIO [US]; SKEIKY YASIR [US]; OVENDAL) 30 August 2001 (2001-08-30)
 - D3: US 2004/086523 A1 (SKEIKY YASIR [US] ET AL) 6 May 2004 (2004-05-06)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2009/059580

- D4: US 2004/197896 A1 (COLE STEWART [FR]) 7 October 2004 (2004-10-07)
- D5: FORTUNE S M ET AL: "Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, no. 30, July 2005 (2005-07), pages 10676-10681, XP002554331 ISSN: 0027-8424
- D6: WO 2008/007942 A (HET NL KANKER I [NL]; SPEELMAN-VAN DER WEL NICOLE NE [NL]; BRENNER MIC) 17 January 2008 (2008-01-17)
- D7: REED S ET AL: "Tuberculosis vaccine development; from mouse to man" MICROBES AND INFECTION, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 7, no. 5-6, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 922-931, XP004936675 ISSN: 1286-4579
- D8: MUSTAFA A S ET AL: "Immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis antigens in Mycobacterium bovis BCG-vaccinated and M-bovis-infected cattle" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 74, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 4566-4572, XP002554332 ISSN: 0019-9567
- D9: AL-ATTIYAH R ET AL: "In vitro cellular immune responses to complex and newly defined recombinant antigens of Mycobacterium tuberculosis" CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 138, no. 1, October 2004 (2004-10), pages 139-144, XP002554333 ISSN: 0009-9104
- D10: MCLAUGHLIN BRYANT ET AL: "A mycobacterium ESX-1-Secreted virulence factor with unique requirements for export" PLOS PATHOGENS, vol. 3, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 1051-1061 URL, XP002554334 ISSN: 1553-7366(print) 1553-7374

3. The Rv3616c protein and its encoding nucleic acid molecule are well known in the prior art. All above mentioned documents (D1-D10) refer to said molecules and the corresponding amino acid and nucleic acid sequences (D1 and D2: SEQ ID NOs: 137 and 138; D3: SEQ ID NOs: 28 and 29) which are 100% identical with the corresponding sequences of the present application (SEQ ID NOs: 1 and 2) and their medical applications against tuberculosis. Different names are used in the prior art for the same molecule, namely Rv3636c, Mtb40, HTCC1, EspA. In D1-D3 the HTCC1 (MTB40) molecule is disclosed as a compound for immunotherapy and diagnosis of tuberculosis. In D4 Rv3636c is referred to as a potential drug target, diagnostic antigen or subunit vaccine component against tuberculosis. Fortune et al. (D5) discloses that EspA is secreted and is required for mycobacterial virulence. Immunogenic compositions comprising recombinant BCG

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2009/059580

mycobacteria which express espA are described in D6. Rv3616c as a priority antigen for tuberculosis is described in D7. D8 prioritizes said molecule as vaccine candidate. According to D9, Mtb40 as antigen induces secretion of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-12 and IL-10. Finally, D10 shows that Rv3616c is required for the secretion of different factors that are important for the virulence of Mycobacterium. Hence, all said prior art describes Rv3616c as a known molecule from Mycobacteria which is relevant for the virulence of said bacterium and which is important for the development and manifestation of tuberculosis. None of said prior art describes explicitly Rv3616c in medical applications in the treatment or prevention of latent tuberculosis. Consequently, claims 1-86 appear to meet the requirements of Article 33(2) PCT. However, it appears not to be possible to separate the active disease and the latent form since they seem to merge. Consequently, any subject-matter referring to said molecules and their medical uses in the treatment or prevention of latent tuberculosis appears to be obvious in view of the extensive teaching of the prior art (e.g. D1-D10) and thus claims 1-86 are not in accordance with Article 33(3) PCT.

4. It has furthermore to be emphasized that no experiments are shown which demonstrate that latent tuberculosis can be treated, prevented or diagnosed with Rv3616c. Consequently, the technical problem to provide a molecule which can be used for treatment, diagnosis or prevention of latent tuberculosis is not convincingly solved and thus no inventive activity can be acknowledged for the subject-matter of claims 1-86 (Article 33(3) PCT).
5. Additionally, it has to be stressed that the whole application is drawn in a very broad manner which renders the true scope of the application unclear (Article 6 PCT). For example claims referring only to a protein name without giving any function of said protein and without defining the amino acid sequence of said protein are not clear in the sense of Article 6 PCT since no clear technical features are provided. In order to define a protein with all required technical features the amino acid sequence and the corresponding nucleic acid sequence should be given in the claims.
Furthermore, broadening the scope of the claims (e.g. variants of the specific molecule with e.g. 70%, 90%, etc. identity, immunogenic fragments of only 10 or 20, etc. amino acids, polynucleotides which hybridize even under moderately stringent conditions to the complement of the specific polynucleotide, etc.) should

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2009/059580

be only allowed if the technical problem is solved over the whole breadth of the claim. However, this is not the case here and thus claims 1-86 do not fulfil the requirements of Article 33(3) PCT).

6. Claims 46-73 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. At the EPO for example, claims directed to a method of treatment or the use of a composition in a treatment are exempted from patentability, but a claim directed to a composition or substance for such use would be admissible.
7. Expressions like "incorporated herein/hereby by reference" used in the description (e.g on p. 25, 62, 71) render the true scope of the application unclear and are thus not in accordance with Article 6 PCT.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un polipéptido que
comprende: (i) una secuencia de proteína de Rv3616c; (ii) una
variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o (iii) un
fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c
para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis
10 (TB) latente. En otros aspectos, la invención se refiere a los
polinucleótidos, las proteínas de fusión, y los métodos asociados
para el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente.

* * * * *

15

20

25

COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a polipéptidos y
5 polinucleótidos para utilizarse en el tratamiento o en la prevención
de tuberculosis, en particular para utilizarse en el tratamiento o en la
prevención de tuberculosis latente, y en la prevención o demora de
la reactivación de tuberculosis (y también a los métodos
relacionados). La presente invención se refiere además a
10 composiciones farmacéuticas e inmunogénicas que comprenden
estos polipéptidos y polinucleótidos, y a métodos para el diagnóstico
de tuberculosis (en particular de tuberculosis latente).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica
15 causada por la infección con *Mycobacterium tuberculosis* y otras
especies de *Mycobacterium*. Es una enfermedad mayor en los países
en desarrollo, así como un problema creciente en las áreas
desarrolladas del mundo. Se cree que más de 2 mil millones de
personas son infectadas con los bacilos de tuberculosis (TB), con
20 aproximadamente 9.2 millones de casos nuevos de tuberculosis (TB)
y 1.7 millones de muertes cada año. El 10 por ciento de las personas
infectadas con los bacilos de tuberculosis (TB) desarrollarán la
tuberculosis (TB) activa, infectando cada persona con la tuberculosis
(TB) activa a un promedio de 10 a 15 personas más por año. Aunque
25 los índices de incidencia anuales han llegado a su pico globalmente,

todavía se está elevando el número de muertes y casos debido al crecimiento de la población (World Health Organisation (Organización Mundial de la Salud) *Tuberculosis Facts* 2008).

Mycobacterium tuberculosis infecta a los individuos a través de las vías respiratorias. Los macrófagos alveolares engolfan la bacteria, pero ésta es capaz de sobrevivir y proliferarse mediante la inhibición de la fusión del fagosoma con los lisosomas ácidos. Sigue una compleja respuesta inmunitaria que involucra a las células-T CD4+ y CD8+, dando como resultado finalmente la formación de un granuloma. De manera central al éxito de la *Mycobacterium tuberculosis* como un patógeno, está el hecho de que la bacteria aislada, pero no erradicada, puede persistir durante largos períodos, dejando al individuo vulnerable al desarrollo posterior de la tuberculosis (TB) activa.

Menos del 5 por ciento de los individuos infectados desarrollan la tuberculosis (TB) activa en los primeros años después de la infección. El granuloma puede persistir durante décadas, y se cree que contiene la *Mycobacterium tuberculosis* viva en un estado de latencia, privada de oxígeno y nutrientes. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la mayoría de las bacterias en el estado latente se localizan en los tipos de células que no son macrófagos, dispersadas a través de todo el cuerpo (Locht y colaboradores, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007 7(11): 1665-1677). El desarrollo de tuberculosis (TB) activa se presenta cuando cambia el equilibrio entre la inmunidad natural del huésped y el patógeno, por

ejemplo, como un resultado de un evento inmunosupresor (Anderson P *Trends in Microbiology* 2007 15(1): 7-13; Ehlers S *Infection* 2009 37(2): 87-95).

5 También se ha propuesto una hipótesis dinámica que describe el equilibrio entre la tuberculosis (TB) latente y la tuberculosis (TB) activa (Cardana P-J *Inflammation & Allergy – Drug Targets* 2006 6: 27-39; Cardana P-J *Infection* 2009 37(2): 80-86).

10 Aunque una infección puede ser asintomática durante un período de tiempo considerable, la enfermedad activa se manifiesta más comúnmente como una inflamación aguda de los pulmones, que da como resultado cansancio, pérdida de peso, fiebre y una tos persistente. Si no se trata, típicamente resultan serias complicaciones y la muerte.

15 En términos generales, la tuberculosis se puede controlar empleando una terapia extendida con antibióticos, aunque este tratamiento no es suficiente para prevenir la extensión de la enfermedad. Los individuos infectados pueden ser asintomáticos, pero contagiosos, durante algún tiempo. En adición, aunque el cumplimiento con el régimen de tratamiento es crítico, es difícil
20 monitorear el comportamiento del paciente. Algunos pacientes no llevan a cabo el curso de tratamiento, lo cual puede conducir a un tratamiento inefectivo y al desarrollo de resistencia al fármaco.

25 La tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) es una forma que fracasa para responder a los medicamentos de primera línea. El 5 por ciento de todos los casos de tuberculosis (TB)

son de tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB), presentándose cada año una estimación de 490,000 nuevos casos de tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB). La tuberculosis (TB) extensamente resistente a los fármacos (XDR-TB) se presenta cuando se desarrolla la resistencia a los medicamentos de segunda línea en la parte superior de la tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB). Se estima que se presentan 40,000 nuevos casos de tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) virtualmente no tratable anualmente (World Health Organisation (Organización Mundial de la Salud) *Tuberculosis Facts* 2008).

Aún cuando se lleve a cabo el tratamiento con antibiótico, la infección con *M. tuberculosis* puede no ser erradicada del individuo infectado, y puede permanecer como una infección latente que puede ser reactivada.

Con el objeto de control la extensión de la tuberculosis, es de suma importancia una vacunación efectiva y un diagnóstico oportuno preciso de la enfermedad.

El diagnóstico de la infección latente de tuberculosis (TB) se logra comúnmente utilizando la prueba de tuberculina de piel, la cual involucra la exposición intradérmica al derivado purificado de proteína tuberculina (PPD). Las respuestas de células-T específicas del antígeno dan como resultado una induración mensurable en el sitio de la inyección de 48 a 72 horas después de la inyección, lo cual indica la exposición a los antígenos micobacterianos. Sin embargo, con esta prueba, la sensibilidad y la especificidad han sido

un problema, y los individuos vacunados con BCG no siempre se pueden distinguir fácilmente de los individuos infectados (esto es en particular importante a la luz del hecho de que la BCG no protege contra la infección latente). En general, los individuos que han recibido BCG pero no que están infectados por *M. tuberculosis* muestran una reacción al PPD por debajo de 10 milímetros de diámetro, mientras que se considera que las personas que tienen una reacción al PPD por arriba de 10 milímetros de diámetro, han sido infectadas por *M. tuberculosis*. Sin embargo, esta regla no es aplicable a los individuos con inmunosupresión debido a la infección por VIH, lo cual puede dar como resultado una reacción al PPD por debajo de 10 milímetros de diámetro; o en los países endémicos, en donde las personas infectadas por micobacterias que no son de tuberculosis, pueden mostrar una reacción al PPD por arriba de 10 milímetros de diámetro.

El progreso en los años recientes ha sido el desarrollo de ensayos basados en células-T *in vitro*, basados en la liberación del interferón-gamma, y utilizando antígenos que son más específicos para *M. tuberculosis* que el PPD, es decir, ESAT-6 y CFP-10. Estas pruebas de alta especificidad parecen ser cuando menos tan sensibles como la prueba de tuberculina de piel, y también demuestran menos reactividad cruzada debido a la vacunación con BCG. Véase Pai M y colaboradores, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006 6(3): 413-422 para una revisión reciente del diagnóstico de tuberculosis (TB) latente. Sin embargo, debido a que ESAT-6/CFP-10

son antígenos en etapa temprana, los ensayos basados en ESAT-6/CFP-10 pueden sólo funcionar de manera óptima en las personas recientemente infectadas. En consecuencia, la identificación de nuevos antígenos específicamente asociados con tuberculosis latente puede ayudar al desarrollo de ensayos más sensibles que podrían detectar las infecciones latentes de plazo más largo.

Sigue existiendo una necesidad de estrategias efectivas para el tratamiento y la prevención de tuberculosis, en particular el tratamiento y la prevención de tuberculosis (TB) latente, y la prevención de la reactivación de tuberculosis (TB).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere, en términos generales, a la identificación de Rv3616c como un antígeno de tuberculosis (TB) latente, y a los métodos relacionados y usos en la prevención y el tratamiento de tuberculosis (TB) latente, y en la prevención o demora de la reactivación de tuberculosis (TB).

La presente invención proporciona un polipéptido, el cual comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c.

para utilizarse como un medicamento, en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método

para el tratamiento o la prevención de tuberculosis (TB) latente, el cual comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- 5 (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c;

a un sujeto que lo necesite, en donde el polipéptido induce una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta inmunitaria contra
10 *Mycobacterium tuberculosis*.

El uso de un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína
15 de Rv3616c;

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de tuberculosis (TB) latente, representa otro aspecto de la invención.

También se proporciona un polinucleótido, el cual comprende
20 una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína
25 de Rv3616c;

para utilizarse como un medicamento, en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de tuberculosis (TB), el cual
5 comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de un polinucleótido, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- 10 (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c;

a un sujeto que lo necesite, en donde el polinucleótido induce una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta inmunitaria contra *Mycobacterium tuberculosis*.

15 El uso de un polinucleótido, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína
20 de Rv3616c;

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de tuberculosis (TB) latente, representa otro aspecto de la invención.

Adicionalmente, se proporciona una composición farmacéutica,
25 la cual comprende:

- (a) un polipéptido que comprende:
- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
 - (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
 - 5 (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c; o

(b) un polinucleótido, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de (a);

y

- 10 (c) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para utilizarse como un medicamento, en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

Además, se proporciona una composición inmunogénica, la cual comprende:

- 15 (a) un polipéptido que comprende:
- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
 - (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
 - (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de
 - 20 proteína de Rv3616c; o

(b) un polinucleótido, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de (a);

y

- (c) un potenciador de respuesta inmunitaria no específica,
- 25 para utilizarse como un medicamento, en el tratamiento o en la

prevención de tuberculosis (TB) latente.

Adicionalmente, se proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se enlaza específicamente a un polipéptido que comprende:

- 5 (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c,

para utilizarse en el diagnóstico de tuberculosis (TB) latente
10 (tal como en métodos para el diagnóstico de tuberculosis latente, el cual comprende determinar la presencia de un anticuerpo o fragmento del mismo que se enlace específicamente a los polipéptidos de la invención en una muestra biológica a partir de un sujeto de prueba).

15 También se proporciona un método para el tratamiento de tuberculosis (TB) latente, el cual comprende los pasos de:

- (i) identificar un sujeto por tener una infección por tuberculosis (TB) latente (por ejemplo, mediante ensayos de PPD o basados en células-T); y
- 20 (ii) administrar al sujeto una cantidad segura y efectiva de un polipéptido o de un polinucleótido como se describe en la presente (tal como en la forma de una composición farmacéutica o de una composición inmunogénica).

También se proporciona el uso de un polipéptido de la presente
25 invención, en la elaboración de un kit de diagnóstico para la

identificación de tuberculosis (TB) latente en un sujeto de prueba.

En una modalidad, el sujeto que reciba un polipéptido, polinucleótido, o una composición, puede tener tuberculosis activa (por ejemplo, infección activa por *M. tuberculosis*). En una segunda
5 modalidad, el sujeto puede tener tuberculosis latente (por ejemplo, infección latente por *M. tuberculosis*). En una tercera modalidad, el sujeto puede estar libre de tuberculosis (por ejemplo, libre de la infección por *M. tuberculosis*).

Un sujeto que reciba un polipéptido, polinucleótido o una
10 composición, puede haber sido previamente vacunado para tuberculosis (por ejemplo, vacunado contra la infección por *M. tuberculosis*), tal como que haya sido vacunado con *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). De una manera alternativa, un sujeto que reciba un polipéptido, polinucleótido o una composición de la
15 invención, puede no haber sido vacunado previamente para tuberculosis (por ejemplo, no vacunado contra la infección por *M. tuberculosis*), tal como que no haya sido vacunado con *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Figura 1: Alineación del péptido de Rv3616c con la secuencia de longitud completa.

Figura 2: Respuestas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a los péptidos de Rv3616c.

Figura 3: Porcentaje de células CD4 y CD8 a partir de
25 ratones CB6F1 inmunizados que expresan citoquinas de IFN-gamma

y/o IL-2 y/o TNF-alfa en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización).

Figura 4: Perfil de citoquina en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización) de la respuesta de CD4 específica del antígeno en los ratones CB6F1 inmunizados.

Figura 5: Perfil de citoquina en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización) de la respuesta de CD8 específica del antígeno en los ratones CB6F1 inmunizados.

Figura 6: Porcentaje de células CD4 y CD8 a partir de ratones CB6F1 inmunizados que expresan citoquinas de IFN-gamma y/o IL-2 y/o TNF-alfa en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización).

Figura 7: Perfil de citoquina en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización) de la respuesta de CD4 específica del antígeno en los ratones CB6F1 inmunizados.

Figura 8: Perfil de citoquina en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización) de la respuesta de CD8 específica del antígeno en los ratones CB6F1 inmunizados.

Figura 9: Porcentaje de células CD4 y CD8 a partir de ratones C57BL/6 inmunizados que expresan citoquinas de IFN-gamma y/o IL-2 y/o TNF-alfa en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización).

Figura 10: Perfil de citoquina en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización) de la respuesta de CD4 específica del antígeno en los ratones C57BL/6 inmunizados.

Figura 11: Porcentaje de células CD4 y CD8 a partir de ratones C57BL/6 inmunizados que expresan citoquinas de IFN-gamma y/o IL-2 y/o TNF-alfa en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización).

5 Figura 12: Perfil de citoquina en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización) de la respuesta de CD4 específica del antígeno en los ratones C57BL/6 inmunizados.

Figura 13: Perfil de citoquina en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización) de la respuesta de CD8
10 específica del antígeno en los ratones C57BL/6 inmunizados.

Figura 14: Respuestas de células-T CD4 específicas del antígeno en seres humanos limpios y latentemente infectados.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS ENLISTADAS

SEQ ID No: 1: secuencia de polipéptido de Rv3616c a partir
15 de *M. tuberculosis*, cepa H37Rv.

SEQ ID No: 2: secuencia de polinucleótido de Rv3616c a partir de *M. tuberculosis*, cepa H37Rv.

SEQ ID No: 3: secuencia de polipéptido de Rv3616c a partir de *M. tuberculosis*, cepa CDC1551.

20 SEQ ID No: 4: secuencia de polipéptido de Rv3616c a partir de *M. tuberculosis*, cepa F11.

SEQ ID No: 5: secuencia de polipéptido de Rv3616c a partir de *M. tuberculosis*, cepa Haarlem A.

SEQ ID No: 6: secuencia de polipéptido de Rv3616c a partir
25 de *M. tuberculosis*, cepa C.

- SEQ ID No: 7: secuencia de polipéptido de Rv3616c a partir de BCG.
- SEQ ID No: 8: secuencia de polipéptido de Mtb8.4.
- SEQ ID No: 9: secuencia de polipéptido de Mtb9.8.
- 5 SEQ ID No: 10: secuencia de polipéptido de Mtb9.9.
- SEQ ID No: 11: secuencia de polipéptido de Ra12.
- SEQ ID No: 12: secuencia de polipéptido de Ra35.
- SEQ ID No: 13: secuencia de polipéptido de TbH9.
- SEQ ID No: 14: secuencia de polipéptido de Mtb41.
- 10 SEQ ID No: 15: secuencia de polipéptido de ESAT-6.
- SEQ ID No: 16: secuencia de polipéptido de Ag85A.
- SEQ ID No: 17: secuencia de polipéptido de Ag85B.
- SEQ ID No: 18: secuencia de polipéptido de alfa-cristalino.
- SEQ ID No: 19: secuencia de polipéptido de MPT64.
- 15 SEQ ID No: 20: secuencia de polipéptido de Mtb32A.
- SEQ ID No: 21: secuencia de polipéptido de Mtb32A maduro mutado en Ser/Ala.
- SEQ ID No: 22: secuencia de polipéptido de TB10.4.
- SEQ ID No: 23: secuencia de polipéptido de Mtb72f.
- 20 SEQ ID No: 24: secuencia de polipéptido de M72.
- SEQ ID No: 25: secuencia de polipéptido de Mtb71f.
- SEQ ID No: 26: secuencia de polipéptido de fusión de M92.
- SEQ ID No: 27: secuencia de polipéptido de fusión de M103.
- SEQ ID No: 28: secuencia de polipéptido de fusión de M114.
- 25 SEQ ID No: 29: epítipo de células CD4 humano supuesto 1.

	SEQ ID No: 30:	epítopo de células CD4 humano supuesto 2.
	SEQ ID No: 31:	epítopo de células CD4 humano supuesto 3.
	SEQ ID No: 32:	epítopo de células CD4 humano supuesto 4.
	SEQ ID No: 33:	epítopo de células CD4 humano supuesto 5.
5	SEQ ID No: 34:	epítopo de células CD4 humano supuesto 6.
	SEQ ID No: 35:	epítopo de células CD4 humano supuesto 7.
	SEQ ID No: 36:	epítopo de células CD4 humano supuesto 8.
	SEQ ID No: 37:	epítopo de células CD4 humano supuesto 9.
	SEQ ID No: 38:	epítopo de células CD4 humano supuesto 10.
10	SEQ ID No: 39:	epítopo de células CD4 humano supuesto 11.
	SEQ ID No: 40:	epítopo de células CD4 humano supuesto 12.
	SEQ ID No: 41:	epítopo de células CD4 humano supuesto 13.
	SEQ ID No: 42:	epítopo de células CD4 humano supuesto 14.
	SEQ ID No: 43:	epítopo de células CD4 humano supuesto 15.
15	SEQ ID No: 44:	epítopo de células CD4 humano supuesto 16.
	SEQ ID No: 45:	epítopo de células CD4 humano supuesto 17.
	SEQ ID No: 46:	epítopo de células CD4 humano supuesto 18.
	SEQ ID No: 47:	epítopo de células CD4 humano supuesto 19.
	SEQ ID No: 48:	epítopo de células CD8 humano supuesto 1.
20	SEQ ID No: 49:	epítopo de células CD8 humano supuesto 2.
	SEQ ID No: 50:	epítopo de células CD8 humano supuesto 3.
	SEQ ID No: 51:	epítopo de células CD8 humano supuesto 4.
	SEQ ID No: 52:	epítopo de células CD8 humano supuesto 5.
	SEQ ID No: 53:	epítopo de células CD8 humano supuesto 6.
25	SEQ ID No: 54:	epítopo de células CD8 humano supuesto 7.

	SEQ ID No: 55:	epítipo de células CD8 humano supuesto 8.
	SEQ ID No: 56:	epítipo de células CD8 humano supuesto 9.
	SEQ ID No: 57:	epítipo de células CD8 humano supuesto 10.
	SEQ ID No: 58:	epítipo de células CD8 humano supuesto 11.
5	SEQ ID No: 59:	epítipo de células CD8 humano supuesto 12.
	SEQ ID No: 60:	epítipo de células CD8 humano supuesto 13.
	SEQ ID No: 61:	epítipo de células CD8 humano supuesto 14.
	SEQ ID No: 62:	epítipo de células CD8 humano supuesto 15.
	SEQ ID No: 63:	epítipo de células CD8 humano supuesto 16.
10	SEQ ID No: 64:	epítipo de células CD8 humano supuesto 17.
	SEQ ID No: 65:	epítipo de células CD8 humano supuesto 18.
	SEQ ID No: 66:	epítipo de células CD8 humano supuesto 19.
	SEQ ID No: 67:	epítipo de células CD8 humano supuesto 20.
	SEQ ID No: 68:	epítipo de células CD8 humano supuesto 21.
15	SEQ ID No: 69:	epítipo de células CD8 humano supuesto 22.
	SEQ ID No: 70:	epítipo de células CD8 humano supuesto 23.
	SEQ ID No: 71:	epítipo de células CD8 humano supuesto 24.
	SEQ ID No: 72:	epítipo de células CD8 humano supuesto 25.
	SEQ ID No: 73:	epítipo de células CD8 humano supuesto 26.
20	SEQ ID No: 74:	epítipo de células CD8 humano supuesto 27.
	SEQ ID No: 75:	epítipo de células CD8 humano supuesto 28.
	SEQ ID No: 76:	epítipo de células CD8 humano supuesto 29.
	SEQ ID No: 77:	epítipo de células CD8 humano supuesto 30.
	SEQ ID No: 78:	epítipo de células CD8 humano supuesto 31.
25	SEQ ID No: 79:	epítipo de células CD8 humano supuesto 32.

- SEQ ID No: 80: epítipo de células CD8 humano supuesto 33.
- SEQ ID No: 81: epítipo de células CD8 humano supuesto 34.
- SEQ ID No: 82: epítipo de células CD8 humano supuesto 35.
- SEQ ID No: 83: epítipo de células CD8 humano supuesto 36.
- 5 SEQ ID No: 84: epítipo de células CD8 humano supuesto 37.
- SEQ ID No: 85: epítipo de células CD8 humano supuesto 38.
- SEQ ID No: 86: epítipo de células CD8 humano supuesto 39.
- SEQ ID No: 87: epítipo de células CD8 humano supuesto 40.
- SEQ ID No: 88: epítipo de células CD8 humano supuesto 41.
- 10 SEQ ID No: 89: epítipo de células CD8 humano supuesto 42.
- SEQ ID No: 90: epítipo de células CD8 humano supuesto 43.
- SEQ ID No: 91: epítipo de células CD8 humano supuesto 44.
- SEQ ID No: 92: epítipo de células CD8 humano supuesto 45.
- SEQ ID No: 93: epítipo de células CD8 humano supuesto 46.
- 15 SEQ ID No: 94: epítipo de células CD8 humano supuesto 47.
- SEQ ID No: 95: epítipo de células CD8 humano supuesto 48.
- SEQ ID No: 96: epítipo de células CD8 humano supuesto 49.
- SEQ ID No: 97: epítipo de células CD8 humano supuesto 50.
- SEQ ID No: 98: epítipo de células CD8 humano supuesto 51.
- 20 SEQ ID No: 99: epítipo de células CD8 humano supuesto 52.
- SEQ ID No: 100: epítipo de células CD8 humano supuesto 53.
- SEQ ID No: 101: epítipo de células CD8 humano supuesto 54.
- SEQ ID No: 102: epítipo de células CD8 humano supuesto 55.
- SEQ ID No: 103: epítipo de células CD8 humano supuesto 56.
- 25 SEQ ID No: 104: epítipo de células CD8 humano supuesto 57.

- SEQ ID No: 105: epítipo de células CD8 humano supuesto 58.
- SEQ ID No: 106: epítipo de células CD8 humano supuesto 59.
- SEQ ID No: 107: epítipo de células CD8 humano supuesto 60.
- SEQ ID No: 108: epítipo de células CD8 humano supuesto 61.
- 5 SEQ ID No: 109: epítipo de células CD8 humano supuesto 62.
- SEQ ID No: 110: epítipo de células CD8 humano supuesto 63.
- SEQ ID No: 111: epítipo de células CD8 humano supuesto 64.
- SEQ ID No: 112: epítipo de células CD8 humano supuesto 65.
- SEQ ID No: 113: epítipo de células CD8 humano supuesto 66.
- 10 SEQ ID No: 114: epítipo de células CD8 humano supuesto 67.
- SEQ ID No: 115: epítipo de células CD8 humano supuesto 68.
- SEQ ID No: 116: epítipo de células CD8 humano supuesto 69.
- SEQ ID No: 117: epítipo de células CD8 humano supuesto 70.
- SEQ ID No: 118: epítipo de células CD8 humano supuesto 71.
- 15 SEQ ID No: 119: epítipo de células CD8 humano supuesto 72.
- SEQ ID No: 120: epítipo de células CD8 humano supuesto 73.
- SEQ ID No: 121: epítipo de células CD8 humano supuesto 74.
- SEQ ID No: 122: epítipo de células CD8 humano supuesto 75.
- SEQ ID No: 123: epítipo de células CD8 humano supuesto 76.
- 20 SEQ ID No: 124: epítipo de células CD8 humano supuesto 77.
- SEQ ID No: 125: epítipo de células CD8 humano supuesto 78.
- SEQ ID No: 126: epítipo de células CD8 humano supuesto 79.
- SEQ ID No: 127: péptido 1.
- SEQ ID No: 128: péptido 2.
- 25 SEQ ID No: 129: péptido 3.

SEQ ID No: 130: péptido 4.
SEQ ID No: 131: péptido 5.
SEQ ID No: 132: péptido 6.
SEQ ID No: 133: péptido 7.
5 SEQ ID No: 134: péptido 8.
SEQ ID No: 135: péptido 9.
SEQ ID No: 136: péptido 10.
SEQ ID No: 137: péptido 11.
SEQ ID No: 138: péptido 12.
10 SEQ ID No: 139: péptido 13.
SEQ ID No: 140: péptido 14.
SEQ ID No: 141: péptido 15.
SEQ ID No: 142: péptido 16.
SEQ ID No: 143: péptido 17.
15 SEQ ID No: 144: péptido 18.
SEQ ID No: 145: péptido 19.
SEQ ID No: 146: péptido 20.
SEQ ID No: 147: péptido 21.
SEQ ID No: 148: péptido 22.
20 SEQ ID No: 149: péptido 23.
SEQ ID No: 150: péptido 24.
SEQ ID No: 151: péptido 25.
SEQ ID No: 152: péptido 26.
SEQ ID No: 153: péptido 27.
25 SEQ ID No: 154: péptido 28.

SEQ ID No: 155: péptido 29.

SEQ ID No: 156: péptido 30.

SEQ ID No: 157: secuencia de polipéptido de Rv1753c a partir de *M. tuberculosis*, cepa H37Rv.

5 SEQ ID No: 158: secuencia de polipéptido de Rv2386c a partir de *M. tuberculosis*, cepa H37Rv.

SEQ ID No: 159: secuencia de polipéptido de Rv2707c a partir de *M. tuberculosis*, cepa H37Rv.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 Actualmente, la vacunación con bacterias vivas es el método más eficiente para inducir la inmunidad protectora. La *Mycobacterium* más común empleada para este propósito es *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), una cepa avirulenta de *M. bovis* que fue desarrollada hace 60 años. Sin embargo, la seguridad y eficacia de la BCG es una
15 fuente de controversia - aunque protege contra la manifestación de la enfermedad grave en los niños, la BCG no previene el establecimiento de la tuberculosis (TB) latente o la reactivación de la enfermedad pulmonar en la vida adulta. Adicionalmente, algunos países, tales como los Estados Unidos, no vacunan al público en
20 general con este agente.

Casi todas las vacunas de tuberculosis (TB) de nueva generación que están actualmente en desarrollo clínico se han diseñado como vacunas previas a la exposición. Éstas incluyen as vacunas subunitarias, las cuales han sido particularmente efectivas
25 para reforzar la inmunidad inducida mediante la vacunación previa

con BCG, y mediante las vacunas micobacterianas vivas avanzadas que tienen como objetivo reemplazar la BCG con cepas más eficientes y/o más seguras. Aunque estas vacunas tienen como objetivo mejorar la resistencia a la infección, tienen probabilidades de ser menos efectivas como vacunas posteriores a la exposición o terapéuticas en los casos de tuberculosis (TB) latente (Lin MY y colaboradores, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets* 2008 8: 15-29).

Se ha demostrado que algunas de las proteínas que se expresan fuertemente durante las etapas tempranas de la infección por *Mycobacterium* proporcionan una fuerte eficacia protectora en los modelos de vacunación de animales. Sin embargo, la vacunación con antígenos que se expresan altamente durante las etapas tempranas de la infección puede no proporcionar una respuesta inmunitaria óptima para tratar con las etapas posteriores de la infección. El control adecuado durante las etapas posteriores de la infección puede requerir de células-T que sean específicas para los antígenos particulares que se expresan en ese momento.

Las vacunas posteriores a la exposición que se dirigen directamente hacia las bacterias persistentes latentes pueden ayudar a proteger contra la reactivación de la tuberculosis (TB), mejorando de esta manera el control de la tuberculosis (TB), o inclusive haciendo posible la eliminación de la infección. Por consiguiente, una vacuna que se dirija hacia la tuberculosis (TB) latente podría reducir de una manera significativa y económica los índices globales

de infección por tuberculosis (TB).

También se podrían utilizar las vacunas subunitarias basadas en los antígenos de etapa tardía en combinación con los antígenos de etapa temprana, para proporcionar una vacuna de múltiples fases.

- 5 De una manera alternativa, los antígenos de etapa tardía se podrían utilizar para complementar y mejorar la vacunación con BCG (ya sea mediante el refuerzo de la respuesta a la BCG, o bien a través del desarrollo de cepas de BCG recombinantes avanzadas).

- 10 Rv3616c, también conocido como Mtb40 ó HTCC1, se ha implicado anteriormente en las respuestas inmunitarias asociadas con tuberculosis (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO98/53075). Al-Attayah y colaboradores, *Clin. Exp. Immunol.* 2004 138: 139-144, han demostrado que Rv3616c es bien reconocido (a través de la proliferación de las células mononucleares
- 15 de sangre periférica (PBMC) y de la producción de IFN-gamma) por los pacientes de tuberculosis pulmonar. Mustafa y colaboradores, *Infect. Immun.* 2006 74(8): 4566-4572, han investigado el reconocimiento de Rv3616c por el ganado infectado por *M. Bovis* y vacunado con BCG.

- 20 Recientemente, se ha propuesto un número de vacunas de *M. tuberculosis* candidatas, basándose en un análisis bioinformático del genoma entero de *M. tuberculosis* (Zvi y colaboradores, *BMC Medical Genetics* 2008 1: 18), y en la prueba de las proteínas diferencialmente expresadas en los individuos activamente y
- 25 latentemente infectados (Schuck SD y colaboradores, *PLoS ONE*

2009 4(5): e5590).

Aunque se ha demostrado que los macrófagos actúan como los
efectores principales de la inmunidad a *Mycobacterium*, las células-T
son los inductores predominantes de esta inmunidad. La función
5 esencial de las células-T en la protección contra la tuberculosis se
ilustra por el aumento en los índices de la reactivación de la
tuberculosis (TB) en los individuos infectados con el virus de
inmunodeficiencia humana, debido al agotamiento asociado de las
células-T CD4+. Adicionalmente, se ha demostrado que la
10 transferencia adoptiva de las células-T CD4+ tomadas a la altura de
la respuesta inmunitaria primaria a la *M. tuberculosis* confiere
protección contra la *M. tuberculosis* en los ratones deficientes en
células-T (Orme y colaboradores, *J. Exp. Med.* 1983 158: 74-83).

Se ha demostrado que las células-T CD4+ que reaccionan con
15 *Mycobacterium* son potentes productoras de interferón- γ (IFN- γ), el
cual, a su vez, se ha demostrado que desencadena los efectos anti-
micobacterianos de los macrófagos en los ratones (Flynn y
colaboradores, *J. Exp. Med.* 1993 178: 2249-2254). Aunque está
menos clara la función del IFN- γ en los seres humanos, los estudios
20 han demostrado que la 1,25-dihidroxi-vitamina D3, ya sea sola o bien
en combinación con el IFN- γ o con el factor de necrosis tumoral-alfa,
activa los macrófagos humanos para inhibir la infección por *M.*
tuberculosis. Adicionalmente, se sabe que el IFN- γ estimula a los
macrófagos humanos para hacer la 1,25-dihidroxi-vitamina D3. De
25 una manera similar, se ha demostrado que la interleucina-12 (IL-12)

tiene una función en la estimulación de la resistencia a la infección por *M. tuberculosis*. Para una revisión de la inmunología de la infección por *M. tuberculosis*, véase Chan y Kaufmann, *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control* (Bloom, Editor, 1994),
5 *Tuberculosis* (2ª Edición, Rom y Garay, Editores, 2003), y *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Capítulo 150, páginas 953-966 (16ª Edición, Braunwald y colaboradores, Editores, 2005).

La presente invención se refiere en términos generales a la identificación de Rv3616c como un antígeno de tuberculosis (TB), el
10 cual está asociado con tuberculosis (TB) latente, y a los métodos y usos relacionados en la prevención y el tratamiento de tuberculosis (TB) latente, y en la prevención o demora de la reactivación de tuberculosis (TB).

La invención, por consiguiente, proporciona una proteína de
15 Rv3616c, una variante de la misma, o un fragmento inmunogénico de la misma, o un polinucleótido que codifica esta proteína, variante o fragmento, para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente. De una manera adecuada, el uso puede ser específicamente en el tratamiento de tuberculosis (TB) latente. De
20 una manera alternativa, el uso puede ser en la prevención o demora de la reactivación de tuberculosis (TB) (en especial la demora de la reactivación de tuberculosis (TB), por ejemplo por un período de meses, años, o incluso indefinidamente).

El término "especie de *Mycobacterium* del complejo de
25 tuberculosis" incluye las especies que tradicionalmente se

consideran como causantes de la enfermedad de tuberculosis, así como las especies ambientales y oportunistas de *Mycobacterium* que provocan la tuberculosis y la enfermedad pulmonar en los pacientes inmuno-comprometidos, tales como los pacientes con SIDA, por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, o *M. africanum*, BCG, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. celatum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. vaccae*, *M. fortuitum*, y *M. scrofulaceum* (véase, por ejemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Capítulo 150, páginas 953-966 (16ª Edición, Braunwald y colaboradores, Editores, 2005). La presente invención se refiere en particular a la infección con *M. tuberculosis*.

El término "infección activa" se refiere a una infección (por ejemplo, una infección por *M. tuberculosis*) con los síntomas y/o lesiones evidentes de la enfermedad (de una manera adecuada, con los síntomas manifestados de la enfermedad).

Los términos "infección inactiva", "infección letárgica" o "infección latente" se refieren a una infección (por ejemplo, a una infección por *M. tuberculosis*) sin los síntomas y/o lesiones evidentes de la enfermedad (de una manera adecuada, sin los síntomas manifestados de la enfermedad).

El término "tuberculosis primaria" se refiere a la enfermedad clínica (la manifestación de los síntomas de la enfermedad) directamente en seguida de la infección (por ejemplo, la infección por *M. tuberculosis*). Véase, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Capítulo 150, páginas 953-966 (16ª Edición, Braunwald y

colaboradores, Editores, 2005).

Los términos "tuberculosis secundaria" o "tuberculosis post-primaria" se refieren a la reactivación de una infección letárgica, inactiva o latente (por ejemplo, una infección por *M. tuberculosis*). Véase, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Capítulo 150, páginas 953-966 (16ª Edición, Braunwald y colaboradores, Editores, 2005).

El término "reactivación de tuberculosis" se refiere a la manifestación posterior de los síntomas de la enfermedad en un individuo en quien se prueba positiva la infección (por ejemplo, en una prueba de tuberculina de piel, de una manera adecuada en un ensayo basado en células-T *in vitro*) pero que no tiene los síntomas evidentes de la enfermedad. La prueba de diagnóstico positiva indica que el individuo está infectado; sin embargo, el individuo puede o no haber manifestado anteriormente los síntomas de la enfermedad activa que se hubieran tratado lo suficiente para llevar a la tuberculosis hasta un estado inactivo o latente. Se reconocerá que se pueden iniciar métodos para la prevención, demora, o tratamiento de la reactivación de tuberculosis en un individuo que manifieste los síntomas activos de la enfermedad.

El término tuberculosis "resistente a fármacos" se refiere a una infección (por ejemplo, una infección por *M. tuberculosis*), en donde la cepa infecciosa no se mantiene estática ni es aniquilada por (es decir, es resistente a) uno o más de los denominados como agentes quimioterapéuticos "de línea frontal" efectivos en el tratamiento de

tuberculosis (por ejemplo, isoniazida, rifampina, etambutol, estreptomicina, y pirazinamida).

El término tuberculosis "resistente a múltiples fármacos" se refiere a una infección (por ejemplo, una infección por *M. tuberculosis*), en donde la cepa infecciosa es resistente a dos o más de los agentes quimioterapéuticos "de la línea frontal" efectivos en el tratamiento de tuberculosis.

Un "agente quimioterapéutico" se refiere a un agente farmacológico conocido y usado en la materia para tratar tuberculosis (por ejemplo, la infección por *M. tuberculosis*). Los agentes farmacológicos ejemplificados utilizados para tratar la tuberculosis incluyen, pero no se limitan a, amicacina, ácido amino-salicílico, capreomicina, cicloserina, etambutol, etionamida, isoniazida, canamicina, pirazinamida, rifamicinas (es decir, rifampina, rifapentina y rifabutina), estreptomicina, ofloxacina, ciprofloxacina, claritromicina, azitromicina y fluoro-quinolonas. Los agentes quimioterapéuticos "de primera línea" o "de línea frontal" utilizados para tratar la tuberculosis que no es resistente a fármacos incluyen isoniazida, rifampina, etambutol, estreptomicina, y pirazinamida. Los agentes quimioterapéuticos "de segunda línea" utilizados para tratar la tuberculosis que ha demostrado resistencia a fármacos, es decir, a uno o más fármacos "de primera línea" incluyen ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, ácido amino-salicílico, cicloserina, amicacina, canamicina y capreomicina. Estos agentes farmacológicos se revisan en el Capítulo 48 de *Goodman y Gilman's*

The Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman y Limbird, Editores, 2001.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de
5 residuos de aminoácidos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido que se presenta naturalmente correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos que se presentan naturalmente y a los polímeros de
10 aminoácidos que no se presentan naturalmente. De una manera adecuada, un polipéptido de acuerdo con la presente invención consistirá solamente en residuos de aminoácidos que se presentan naturalmente, en especial los aminoácidos codificados por el código genético.

15 El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos que se presentan naturalmente y sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se presentan naturalmente. Los aminoácidos que se presentan naturalmente son aquéllos
20 codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxi-glutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta naturalmente, es decir, un carbono α
25 que se enlaza a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y

un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina-metil-sulfonio. Estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras base de péptidos modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta naturalmente. Miméticos de aminoácidos se refieren a los compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido que se presenta naturalmente. De una manera adecuada, un aminoácido es un aminoácido que se presenta naturalmente o un análogo de aminoácido, en especial un aminoácido que se presenta naturalmente, y en particular los aminoácidos codificados por el código genético.

"Ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos, ya sea en la forma de una sola cadena o de doble cadena. El término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos de estructura base modificada o enlaces, los cuales son sintéticos, se presentan naturalmente, y no se presentan naturalmente, los cuales tienen propiedades de enlace similares a aquéllas del ácido nucleico de referencia, y los cuales se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de estos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil-fosfonatos, metil-fosfonatos quirales, ribonucleótidos de 2-O-metilo, ácidos nucleicos peptídicos

(PNAs). De una manera adecuada, el término "ácido nucleico" se refiere a los desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que se presentan naturalmente, y a los polímeros de los mismos.

A menos que se indique de otra manera, una secuencia de
5 ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes conservadoramente modificadas de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada (de una manera adecuada, se refiere a la secuencia explícitamente
10 indicada). De una manera específica, las sustituciones de codones degenerados se puede lograr mediante la generación de secuencias en donde la tercera posición de uno o más (o todos) codones degenerados está sustituida con residuos de base mixta y/o de desoxi-inosina (Batzner y colaboradores, *Nucleic Acid Res.* 19: 5081
15 (1991); Ohtsuka y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini y colaboradores, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). El término "ácido nucleico" se utiliza de una manera intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido, y polinucleótido.

20 Los aminoácidos pueden ser referidos en la presente ya sea mediante sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos, o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Biochemical Nomenclature Commission (Comisión de Nomenclatura Bioquímica) de IUPAC-IUB. De la misma manera, los nucleótidos pueden ser
25 referidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

El término "secuencia de proteína de Rv3616c", como se utiliza en la presente, significa la secuencia de polipéptido proporcionada en la SEQ ID No: 1 o un homólogo de la misma a partir de una especie de *Mycobacterium* del complejo de tuberculosis, por ejemplo, una especie tal como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, o *M. africanum*, o una especie de *Mycobacterium* que sea del medio ambiente u oportunista, o que provoque infecciones oportunistas, tales como infecciones pulmonares en los huéspedes inmuno-comprometidos (por ejemplo, los pacientes con SIDA), por ejemplo, BCG, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. celatum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. vaccae*, *M. fortuitum*, y *M. scrofulaceum* (véase, por ejemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Capítulo 150, páginas 953-966, 16ª Edición, Braunwald y colaboradores, Editores, 2005).

Con el fin de asegurar un alto índice de eficacia entre los huéspedes vacunados, los componentes de una vacuna deben ser bien conservados entre las cepas de significado clínico. De una manera adecuada, la proteína de Rv3616c se deriva a partir de *M. tuberculosis* H37Rv (es decir, la secuencia de polipéptido proporcionada en la SEQ ID No: 1) o un homólogo de la misma a partir de otra cepa de *M. tuberculosis* (tal como CDC1551, F11, Haarlem cepas A y C). Las cepas de *M. tuberculosis* que están asociadas con la resistencia a fármacos (por ejemplo, MDR, o en especial XDR), son una base particularmente valiosa para la secuencia de proteína de Rv3616c. Las cepas de interés incluyen:

CDC1551 - Cepa transmisible y virulenta

Familia Haarlem (tal como Haarlem A) - Cepas resistentes a fármacos encontradas en las poblaciones humanas populosas. Se han encontrado miembros de la familia Haarlem de las cepas de *M. tuberculosis* en muchas partes del mundo. El primer representante de la familia se descubrió en Haarlem, Holanda.

KZN4207 - Aislado sensible a fármacos a partir de los pacientes de KwaZulu-Natal, Sudáfrica.

KZN1435 - Aislado resistente a múltiples fármacos (MDR) a partir de los pacientes de KwaZulu-Natal, Sudáfrica.

KZN605 - Aislado extensamente resistente a fármacos (XDR) a partir de los pacientes de KwaZulu-Natal, Sudáfrica.

C - Altamente transmitido en la Ciudad de Nueva York. En un estudio, se encontró que esta cepa es más común entre los usuarios de fármacos de inyección y resistente a los intermediarios de nitrógeno reactivo (Friedman y colaboradores, *J. Infect. Dis.* 1997 176(2): 478-84)

94_M4241A - Aislado en San Francisco en 1994 a partir de un paciente nacido en China. Esta cepa se analizó anteriormente mediante el análisis de agotamiento genómico (Gagneux y colaboradores, *PNAS* 2006 103(8): 2869-2873).

02_1987 - Aislado en San Francisco en 2002 a partir de un paciente nacido en Corea del Sur. Esta cepa se analizó anteriormente mediante el análisis de agotamiento genómico (Gagneux y colaboradores, *PNAS* 2006 103(8): 2869-2873).

T92 - Aislado en San Francisco en 1999 a partir de un paciente nacido en Las Filipinas. Esta cepa se publicó en Hirsh y colaboradores, *PNAS* 2004 101: 4871-4876).

5 T85 - Aislado en San Francisco en 1998 a partir de un paciente nacido en China. Esta cepa se publicó en Hirsh y colaboradores, *PNAS* 2004 101: 4871-4876).

EAS054 - Aislado en San Francisco en 1993 a partir de un paciente nacido en India. Esta cepa se analizó anteriormente mediante el análisis de agotamiento genómico (Gagneux y
10 colaboradores, *PNAS* 2006 103(8): 2869-2873).

Gagneux y colaboradores, *PNAS* 2006 103(8): 2869-2873 y Herbert y colaboradores, *Infect. Immun.* 2007 75(12): 5798-5805 proporcionan valiosos antecedentes sobre el rango de cepas de *M. tuberculosis* que se sabe que existen.

15 De una manera más adecuada, la proteína de Rv3616c se selecciona a partir de las secuencias de polipéptidos proporcionadas en las SEQ ID Nos: 1 y 3 a 7, en particular en las SEQ ID Nos: 1 y 3 a 6, tal como la SEQ ID NO: 1.

20 Los polinucleótidos de un interés particular son aquéllos que comprenden (tal como que consisten en) una secuencia que codifica:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c.

25 Los polinucleótidos adecuadamente comprenderán (tal como

consistirán en) una variante de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la SEQ ID NO: 2 que codifique un fragmento inmunogénico de una proteína de Rv3616c.

COMBINACIONES

5 Los polipéptidos de Rv3616c relacionados útiles en la presente invención pueden comprender además otros componentes diseñados para mejorar su inmunogenicidad o para mejorar estos antígenos en otros aspectos. Por ejemplo, se puede facilitar un mejor aislamiento de los antígenos de polipéptido a través de la adición de un
10 estiramiento de los residuos de histidina (comúnmente conocido como una marca his) hacia un extremo del antígeno.

 El término "marca-his" se refiere a una hilera de residuos de histidina, típicamente de seis residuos, que se insertan dentro de la secuencia de referencia. Para minimizar la alteración de la actividad
15 asociada con la secuencia de referencia, típicamente se inserta una marca-his en el término N, usualmente inmediatamente después del residuo de metionina de inicio, o de otra manera, en el término C. Usualmente son heterólogos para la secuencia nativa, pero se incorporan debido a que facilitan el aislamiento mediante la mejora
20 del enlace de la proteína a las resinas de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Hablando en términos generales, la presencia o ausencia de una marca-his no es significativa desde el punto de vista de provocar una respuesta inmunitaria deseable contra la proteína de referencia. Sin embargo, con el objeto de evitar
25 el riesgo de una reacción adversa contra la marca-his misma, se

considera mejor minimizar la longitud de la marca-his, por ejemplo, hasta cuatro o menos residuos, en particular hasta dos residuos (o excluir el uso de una marca-his totalmente).

5 Con el fin de mejorar la magnitud y/o el alcance de la respuesta inmunitaria provocada, las composiciones, polipéptidos y ácidos nucleicos pueden comprender múltiples copias del antígeno de la invención y/o polipéptidos heterólogos adicionales (o polinucleótidos que los codifiquen) a partir de las especies de *Mycobacterium* (en particular *M. tuberculosis*).

10 Un experto en este campo reconocerá que, cuando se utilizan un número de componentes en combinación, se puede variar la presentación precisa. Por ejemplo, se podría presentar un componente de Rv3616c y una copia adicional del antígeno o de un componente de antígeno heterólogo adicional:

- 15 como dos componentes de polipéptido individuales;
como una proteína de fusión que comprende ambos componentes de polipéptido;
como un polipéptido y un componente de polinucleótido;
como dos componentes de polinucleótido individuales;
20 como un solo polinucleótido que codifica dos componentes de polipéptido individuales; o
como un solo polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende ambos componentes de polipéptido.

25 Esta flexibilidad se aplica igualmente a las situaciones en donde se utilizan tres o más componentes en combinación. Sin

embargo, para mayor conveniencia, con frecuencia es deseable que, cuando están presentes un número de componentes, están contenidos dentro de una sola proteína de fusión o de un polinucleótido que codifique una sola proteína de fusión. En una
5 modalidad de la invención, todos los componentes de antígeno se proporcionan como polipéptidos (por ejemplo, dentro de una sola proteína de fusión). En una modalidad alternativa de la invención, todos los componentes de antígeno se proporcionan como polinucleótidos (por ejemplo, un solo polinucleótido, tal como uno
10 que codifique una sola proteína de fusión).

El término "heterólogo", cuando se utiliza con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación unas con otras en la naturaleza. Por ejemplo, el
15 ácido nucleico se produce típicamente de una manera recombinante, teniendo dos o más secuencias a partir de genes no relacionados configurados para hacer un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor a partir de una fuente, y una región codificante a partir de otra fuente. De una manera similar, una proteína
20 heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación unas con otras en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

"Polipéptido de fusión" o "proteína de fusión" se refiere a una proteína que tiene cuando menos dos polipéptidos heterólogos (por
25 ejemplo, cuando menos dos polipéptidos de especies de

Mycobacterium) covalentemente enlazados, ya sea directamente o bien por medio de un enlazador de aminoácido. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión típicamente enlazan el término C al término N, aunque también puede enlazar el término C al término C, el término N al término N, o el término N al término C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Este término también se refiere a las variantes conservadoramente modificadas, variantes polimórficas, alelos, mutantes, fragmentos inmunogénicos, y homólogos inter-especies de los antígenos que forman la proteína de fusión. Los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* se describen en Coler y colaboradores, *Nature* 393: 537 (1998), el cual da a conocer el genoma entero de *Mycobacterium tuberculosis*. Los antígenos a partir de otras especies de *Mycobacterium* que corresponden a los antígenos de *M. tuberculosis* se pueden identificar, por ejemplo, utilizando algoritmos de comparación de secuencias, como se describen en la presente, u otros métodos conocidos por los expertos en este campo, por ejemplo, ensayos de hibridación y ensayos de enlace de anticuerpos.

El término "fusionado" se refiere al enlace covalente entre dos polipéptidos en una proteína de fusión. Los polipéptidos típicamente se unen por medio de un enlace peptídico, ya sea directamente a uno al otro o bien por medio de un enlazador de aminoácidos. Opcionalmente, los péptidos se pueden unir por medio de enlaces covalentes no peptídicos conocidos por los expertos en este campo.

Los antígenos de *M. tuberculosis* de ejemplo que se pueden

combinar con Rv3616c incluyen uno o más de (por ejemplo, de 1 a 5, tal como de 1 a 3, en particular 1) los siguientes (tales como uno o más de (i) a (xii)):

(i) Mtb8.4 (también conocido como DPV y Rv1174c), cuya
5 secuencia de polipéptido se describe en la SEQ ID No: 102 de la
Publicación Internacional Número WO97/09428 (ADNc en la SEQ ID
No: 101), y en Coler y colaboradores, *Journal of Immunology* 1998
161: 2356-2364. Es de un interés particular la secuencia de Mtb8.4
madura, la cual está ausente en el péptido de señal delantero (es
10 decir, en los residuos de aminoácidos 15 a 96 de la SEQ ID No: 102
de la Publicación Internacional Número WO97/09428). La secuencia
del polipéptido de longitud completa de Mtb8.4 se muestra en la SEQ
ID No: 8;

(ii) Mtb9.8 (también conocido como MSL y Rv0287), cuya
15 secuencia de polipéptido se describe en la SEQ ID No: 109 de la
Publicación Internacional Número WO98/53075 (los fragmentos de
MSL se dan a conocer en las SEQ ID NOs: 110 a 124 de la
Publicación Internacional Número WO98/53075, siendo de un interés
particular las SEQ ID NOs: 119 y 120), y también en Coler y
20 colaboradores, *Vaccine* 2009 27: 223-233 (en particular los
fragmentos reactivos mostrados en la Figura 2 del mismo). La
secuencia del polipéptido de longitud completa para Mtb9.8 se
muestra en la SEQ ID No: 9;

(iii) Mtb9.9 (también conocido como Mtb9.9A, MTI, MTI-A y
25 Rv1793), cuya secuencia de polipéptido se describe en la SEQ ID

No: 19 de la Publicación Internacional Número WO98/53075 y en Alderson y colaboradores, *Journal of Experimental Medicine* 2000 7: 551-559 (los fragmentos de MTI se dan a conocer en las SEQ ID NOs: 17 y 51 a 66 de la Publicación Internacional Número WO98/53075, siendo de un interés particular las SEQ ID NOs: 17, 51, 52, 53, 56 y 62 a 65). Un número de variantes del polipéptido de MTI se describen en las SEQ ID NOs: 21, 23, 25, 27, 29 y 31 de la Publicación Internacional Número WO98/53075 y en Alderson y colaboradores, *Journal of Experimental Medicine* 2000 7: 551-559. La secuencia del polipéptido de longitud completa para Mtb9.9 se muestra en la SEQ ID No: 10;

(iv) Ra12 (también conocido como el antígeno C-terminal Mtb32A), cuya secuencia de polipéptido se describe en la SEQ ID No: 10 de la Publicación Internacional Número WO01/98460 y en Skeiky y colaboradores, *Journal of Immunology* 2004 172: 7618-7682. La secuencia del polipéptido de longitud completa para Ra12 se muestra en la SEQ ID No: 11;

(v) Ra35 (también conocido como el antígeno N-terminal Mtb32A), cuya secuencia de polipéptido se describe en la SEQ ID No: 8 de la Publicación Internacional Número WO01/98460 y en Skeiky y colaboradores, *Journal of Immunology* 2004 172: 7618-7682. La secuencia del polipéptido de longitud completa para Ra35 se muestra en la SEQ ID No: 12;

(vi) TbH9 (también conocido como Mtb39, Mtb39A, TbH9FL y Rv1196), cuya secuencia de polipéptido se describe en la SEQ ID

No: 107 de la Publicación Internacional Número WO97/09428, y también en Dillon y colaboradores, *Infection and Immunity* 1999 67(6): 2941-2950, y en Skeiky y colaboradores, *Journal of Immunology* 2004 172: 7618-7682. La secuencia del polipéptido de longitud completa para TbH9 se muestra en la SEQ ID No: 13;

(vii) Mtb41 (también conocido como MTCC2 y Rv0915c), cuya secuencia de polipéptido se describe en la SEQ ID No: 142 de la Publicación Internacional Número WO98/53075 (ADNc en la SEQ ID No: 140), y en Skeiky y colaboradores, *Journal of Immunology* 2000 165: 7140-7149. La secuencia del polipéptido de longitud completa para Mtb41 se muestra en la SEQ ID No: 14;

(viii) ESAT-6 (también conocido como esxA y Rv3875), cuya secuencia de polipéptido se describe en la SEQ ID No: 103 de la Publicación Internacional Número WO97/09428 (ADNc en la SEQ ID No: 104), y en Sorensen y colaboradores, *Infection and Immunity* 1995 63(5): 1710-1717. La secuencia del polipéptido de longitud completa para ESAT-6 se muestra en la SEQ ID No: 15;

(ix) Antígenos complejos Ag85 (por ejemplo, Ag85A, también conocido como fbpA y Rv3804c; o Ag85B, también conocido como fbpB y Rv1886c), los cuales se discuten, por ejemplo, en Content y colaboradores, *Infection and Immunity* 1991 59: 3205-3212 y en Huygen y colaboradores, *Nature Medicine* 1996 2(8): 893-898. La secuencia del polipéptido de longitud completa para Ag85A se muestra en la SEQ ID No: 16 (la proteína madura de los residuos 43 a 338, es decir, que carecen del péptido de señal, que es de un

interés particular). La secuencia del polipéptido de longitud completa para Ag85B se muestra en la SEQ ID No: 17 (la proteína madura de los residuos 41 a 325, es decir, que carece del péptido de señal, que es de un interés particular);

5 (x) Alfa-cristalino (también conocido como hspX y Rv2031c), el cual se describe en Verbon y colaboradores, *Journal of Bacteriology* 1992 174: 1352-1359, y en Friscia y colaboradores, *Clinical and Experimental Immunology* 1995 102: 53-57 (son de un interés particular los fragmentos correspondientes a los residuos 71
10 a 91, 21 a 40, 91 a 110 y 111 a 130). La secuencia del polipéptido de longitud completa para alfa-cristalino se muestra en la SEQ ID No: 18;

 (xi) Mpt64 (también conocido como Rv1980c), el cual se describe en Roche y colaboradores, *Scandinavian Journal of*
15 *Immunology* 1996 43: 662-670. La secuencia del polipéptido de longitud completa para MPT64 se muestra en la SEQ ID No: 19 (la proteína madura de los residuos 24 a 228, es decir, que carece del péptido de señal, que es de un interés particular):

 (xii) Mtb32A, cuya secuencia de polipéptido se describe en la
20 SEQ ID No: 2 (longitud completa), y los residuos 8 a 330 de la SEQ ID NO: 4 (madura) de la Publicación Internacional Número WO01/98460, en especial las variantes que tienen cuando menos uno de los triad catalíticos mutados (por ejemplo, el residuo catalítico de serina, el cual, por ejemplo, se puede mutar hasta
25 alanina). La secuencia del polipéptido de longitud completa para

Mtb32A se muestra en la SEQ ID No: 20. La forma madura del Mtb32A que tiene una mutación de Ser/Ala se muestra en la SEQ ID No: 21;

(xiii) TB10.4, la secuencia del polipéptido de longitud completa para TB10.4 se muestra en la SEQ ID No: 22;

(xiv) Rv1753c, la secuencia del polipéptido de longitud completa para Rv1753c a partir de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se muestra en la SEQ ID No: 157;

(xv) Rv2386c, la secuencia del polipéptido de longitud completa para Rv2386c a partir de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se muestra en la SEQ ID No: 158; y/o

(xvi) Rv2707c, la secuencia del polipéptido de longitud completa para Rv2707c a partir de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se muestra en la SEQ ID No: 159;

o combinaciones de los mismos, tales como (por ejemplo, las combinaciones tales como (a) a (g)):

(a) una combinación de los componentes Ra12, TbH9 y Ra35, por ejemplo, en la forma de una proteína de fusión, tal como Mtb72f. La secuencia de polipéptido de Mtb72f se describe en la SEQ ID No: 6 de la Publicación Internacional Número WO2006/117240 (ADNc en la SEQ ID No: 5), y en Skeiky y colaboradores, *Journal of Immunology* 2004 172: 7618-7682 (en donde incorpora una marca-His opcional para ayudar a la purificación, cuando se utiliza en la presente invención de una manera adecuada, Mtb72f está ausente de los residuos opcionales

de histidina). La secuencia de polipéptido para Mtb72f se muestra en la SEQ ID No: 23;

(b) una combinación de los componentes Ra12, TbH9 y Ra35 mutado con Ser/Ala (es decir, en donde el residuo catalítico de serina ha sido reemplazado con alanina), por ejemplo en la forma de una proteína de fusión, tal como M72. La secuencia de polipéptido de M72 se describe en la SEQ ID No: 4 de la Publicación Internacional Número WO2006/117240 (ADNc en la SEQ ID No: 3), en donde incorpora una doble histidina opcional para ayudar a la elaboración; cuando se utiliza en la presente invención, M72 también puede incorporar una doble histidina, aunque adecuadamente en M72 está ausente la doble histidina opcional (es decir, los residuos 4 a 725 de la SEQ ID No: 4 de la Publicación Internacional Número WO2006/117240 son de un interés particular). La secuencia de polipéptido para M72 se muestra en la SEQ ID No: 24;

(c) una combinación de los componentes Mtb8.4, Mtb9.8, Mtb9.9 y Mtb41, por ejemplo en la forma de una proteína de fusión, tal como Mtb71f. La secuencia de polipéptido de Mtb71f se describe en la SEQ ID No: 16 de la Publicación Internacional Número WO99/051748 (ADNc en la SEQ ID No: 15), en donde incorpora una marca-His opcional para ayudar a la purificación; cuando se utiliza en la presente invención de una manera adecuada, Mtb71f corresponde a los residuos de aminoácidos 9 a 710 de la SEQ ID NO: 16 de la Publicación Internacional Número WO99/051748. La secuencia de polipéptido para Mtb71f se muestra en la SEQ ID No:

25;

(d) una combinación de Mtb72f o M72 (de una manera adecuada sin residuos opcionales de histidina para ayudar a la expresión) con Mtb9.8 y Mtb9.9, por ejemplo, en una proteína de fusión. La secuencia de polipéptido para una fusión de M72-Mtb9.9-Mtb9.8 se muestra en la SEQ ID No: 26 (fusión de M92); cuando se utiliza en la presente invención, la fusión de M72-Mtb9.9-Mtb9.8 puede incorporar opcionalmente una doble histidina en seguida del residuo de metionina de inicio para ayudar a la elaboración;

10 (e) una combinación de Mtb72f o M72 (de una manera adecuada sin residuos opcionales de histidina para ayudar a la expresión) con Ag85B, por ejemplo en una proteína de fusión, tal como Mtb103f. La secuencia de polipéptido de Mtb103f se describe en la SEQ ID No: 18 de la Publicación Internacional Número
15 WO03/070187 (ADNc en la SEQ ID No: 10), en donde incorpora una marca-His opcional para ayudar a la purificación; cuando se utiliza en la presente invención, de una manera adecuada, Mtb103f corresponde a los residuos de aminoácidos 8 a 1016 de la SEQ ID NO: 18 de la Publicación Internacional Número WO03/070187.
20 También es de un interés particular M103, es decir, Mtb103f que incorpora una mutación de Ser/Ala en el componente Ra35; cuando se utiliza en la presente invención, de una manera adecuada, M103 corresponde a los residuos de aminoácidos 8 a 1016 de la SEQ ID NO: 18 de la Publicación Internacional Número WO03/070187, en
25 donde el residuo Ser en la posición 710 ha sido reemplazado con

Ala. La secuencia de polipéptido para M103 se muestra en la SEQ ID No: 27; cuando se utiliza en la presente invención, la fusión de M72-Mtb9.9-Mtb9.8 puede incorporar opcionalmente una doble histidina en seguida del residuo de metionina de inicio para ayudar a la
5 elaboración;

(f) una combinación de Mtb72f o M72 (de una manera adecuada sin residuos opcionales de histidina para ayudar a la expresión) con Mtb41, por ejemplo, en una proteína de fusión, tal como Mtb114f. La secuencia de polipéptido de Mtb114f se describe
10 en la SEQ ID No: 16 de la Publicación Internacional Número WO03/070187 (ADNc en la SEQ ID No: 9), en donde incorpora una marca-His opcional para ayudar a la purificación; cuando se utiliza en la presente invención, de una manera adecuada, Mtb114f corresponde a los residuos de aminoácidos 8 a 1154 de la SEQ ID
15 NO: 16 de la Publicación Internacional Número WO03/070187. También es de un interés particular M114, es decir, Mtb114f que incorpora una mutación de Ser/Ala en el componente Ra35; cuando se utiliza en la presente invención, de una manera adecuada, M114 corresponde a los residuos de aminoácidos 8 a 1154 de la SEQ ID
20 NO: 16 de la Publicación Internacional Número WO03/070187, en donde el residuo Ser en la posición 710 ha sido reemplazado con Ala. La secuencia de polipéptido para M114 se muestra en la SEQ ID No: 28; cuando se utiliza en la presente invención, la fusión de M72-Mtb9.9-Mtb9.8 puede incorporar opcionalmente una doble histidina
25 en seguida del residuo de metionina de inicio para ayudar a la

elaboración;

(g) una combinación de los componentes Ag85B y ESAT-6, tal como en una fusión descrita en Doherty y colaboradores, *Journal of Infectious Diseases* 2004 190: 2146–2153; y/o

5 (h) una combinación de los componentes Ag85B y TB10.4, tal como en una fusión descrita en Dietrich y colaboradores, *Journal of Immunology* 2005 174(10): 6332-6339 190: 2146–2153.

Las combinaciones de un componente Rv3616c y un componente Rv1753c son de un interés particular. Obviamente, estas
10 combinaciones podrían contener opcionalmente otros componentes de antígeno adicionales (por ejemplo, un componente de M72).

Otra combinación de interés comprende un componente Rv3616c y un componente M72.

Una combinación adicional de interés comprende un
15 componente Rv3616c y un componente Rv2386c.

Otras combinaciones de interés incluyen aquéllas que comprenden un componente Rv3616c y un componente Rv2707c.

Una combinación adicional de interés comprende un componente Rv3616c y un componente alfa-cristalino.

20 La persona experta reconocerá que las combinaciones no necesitan apoyarse en las secuencias específicas descritas anteriormente en (i) a (xvi), y (a) a (h), y que se pueden utilizar las variantes conservadoramente modificadas (por ejemplo, que tienen cuando menos el 70 por ciento de identidad, tal como cuando menos
25 el 80 por ciento de identidad, en particular cuando menos el 90 por

ciento de identidad, y en especial cuando menos el 95 por ciento de identidad) o los fragmentos inmunogénicos (por ejemplo, cuando menos el 20 por ciento del antígeno de longitud completa, tal como cuando menos el 50 por ciento del antígeno, en particular cuando
 5 menos el 70 por ciento, y en especial cuando menos el 80 por ciento) de las secuencias descritas, para lograr el mismo efecto práctico.

Cada una de las secuencias de antígenos individuales anteriores también se da a conocer en Cole y colaboradores, *Nature* 1998 393: 537-544 y en Camus, *Microbiology* 2002 148: 2967-2973.
 10 El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv está públicamente disponible, por ejemplo, en el sitio web de Wellcome Trust Sanger Institute (www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/), y en cualquier otra parte.

Muchos de los antígenos anteriores también se dan a conocer
 15 en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números 08/523,435, 08/523,436, 08/658,800, 08/659,683, 08/818,111, 08/818,112, 08/942,341, 08/942,578, 08/858,998, 08/859,381, 09/056,556, 09/072,596, 09/072,967, 09/073,009, 09/073,010, 09/223,040, 09/287,849, en las Solicitudes de Patente
 20 del TCP Números PCT/US98/10407, PCT/US98/10514, PCT/US99/03265, PCT/US99/03268, PCT/US99/07717, y en las Publicaciones Internacionales Números WO97/09428, WO97/09429, WO98/16645, y WO98/16646, cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia.

25 Las composiciones, polipéptidos, y ácidos nucleicos de la

invención también pueden comprender polipéptidos adicionales a partir de otras fuentes. Por ejemplo, las composiciones y las proteínas de fusión de la invención pueden incluir polipéptidos o ácidos nucleicos que codifiquen polipéptidos, en donde el polipéptido mejora la expresión del antígeno, por ejemplo, NS1, una proteína del virus de influenza (véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Números WO99/40188 y WO93/04175). Los ácidos nucleicos de la invención se pueden diseñar basándose en la preferencia de codones en una especie de elección, por ejemplo, en los seres humanos (en el caso de la expresión *in vivo*) o en una bacteria particular (en el caso de la producción de polipéptidos).

El componente Rv3616c también se puede administrar con uno o más agentes quimioterapéuticos efectivos contra la tuberculosis (por ejemplo, contra la infección por *M. tuberculosis*). Los ejemplos de estos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, amicacina, ácido amino-salicílico, capreomicina, cicloserina, etambutol, etionamida, isoniazida, canamicina, pirazinamida, rifamicinas (es decir, rifampina, rifapentina y rifabutina), estreptomicina, ofloxacina, ciprofloxacina, claritromicina, azitromicina y fluoro-quinolonas. La quimioterapia es determinada por el juicio del médico tratante utilizando las combinaciones de fármacos preferidas. Los agentes quimioterapéuticos de "primera línea" utilizados para tratar tuberculosis (por ejemplo, la infección por *M. tuberculosis*) que no sea resistente a los fármacos, incluyen isoniazida, rifampina, etambutol, estreptomicina y pirazinamida. Los

agentes quimioterapéuticos de "segunda línea" utilizados para tratar tuberculosis (por ejemplo, la infección por *M. tuberculosis*) que haya demostrado resistencia a uno o más fármacos de la "primera línea", incluyen ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, ácido amino-salicílico, cicloserina, amicacina, canamicina y capreomicina.

Los agentes quimioterapéuticos convencionales se administran en general durante un período relativamente largo (aproximadamente 9 meses). La combinación de los agentes quimioterapéuticos convencionales con la administración de un componente Rv3616c de acuerdo con la presente invención, puede hacer posible que se reduzca el período del tratamiento quimioterapéutico (por ejemplo, hasta 8 meses, 7 meses, 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses o menos) sin una disminución en la eficacia.

Es de un interés particular el uso de un componente Rv3616c en conjunto con el *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). Por ejemplo, en la forma de un BCG modificado que exprese de una manera recombinante el Rv3616c (o una variante o un fragmento del mismo, como se describe en la presente). De una manera alternativa, el componente Rv3616c se puede utilizar para mejorar la respuesta de un sujeto a la vacunación con BCG, ya sea mediante su co-administración o bien mediante el refuerzo de una vacunación previa con BCG. Cuando se utiliza para mejorar la respuesta de un sujeto a la vacunación con BCG, el componente Rv3616c se puede proporcionar obviamente en la forma de un polipéptido o de un polinucleótido (opcionalmente en conjunto con componentes

antigénicos adicionales, como se describen anteriormente).

La persona experta reconocerá que las combinaciones de los componentes no se necesitan administrar juntas, y que se pueden aplicar: por separado o en combinación; al mismo tiempo, en
5 secuencia o dentro de un período corto; a través de la misma o de diferentes vías. No obstante, para mayor conveniencia, en general es deseable (cuando los regímenes de administración son compatibles) administrar una combinación de componentes como una sola composición.

10 Los polipéptidos, polinucleótidos y composiciones de la presente invención usualmente se administrarán a seres humanos, pero son efectivos en otros mamíferos, incluyendo mamíferos domésticos (por ejemplo, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, cobayos, hámsters, chinchillas), y mamíferos agrícolas (por ejemplo,
15 reses, cerdos, ovejas, cabras, caballos).

FRAGMENTOS INMUNOGÉNICOS

Los epítomos de células-T son estiramientos contiguos cortos de aminoácidos que son reconocidos por las células-T (por ejemplo, las células-T CD4+ o CD8+). La identificación de los epítomos de
20 células-T se puede lograr a través de experimentos de mapeo de epítomos que son bien conocidos por la persona experta en la materia (véase, por ejemplo, Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª Edición, 243-247 (1993); Beißbarth y colaboradores, *Bioinformatics* 2005 21 (Suplemento 1): i29-i37).

25 De una manera alternativa, los epítomos se pueden predecir

empleando los planteamientos discutidos en los Ejemplos.

Como un resultado de la involucración crucial de la respuesta de células-T en la tuberculosis, es fácilmente evidente que los fragmentos del polipéptido de Rv3616c de longitud completa que
5 contengan cuando menos un epítipo de células-T serán inmunogénicos y pueden contribuir a la inmunoprotección. Estos fragmentos son referidos en la presente como fragmentos inmunogénicos.

Los fragmentos inmunogénicos de acuerdo con la presente
10 invención típicamente comprenderán cuando menos 9 aminoácidos contiguos a partir de la secuencia del polipéptido de longitud completa (por ejemplo, de cuando menos 10), tal como de cuando menos 12 aminoácidos contiguos (por ejemplo, de cuando menos 15 ó de cuando menos 20 aminoácidos contiguos), en particular, de
15 cuando menos 50 aminoácidos contiguos, tal como de cuando menos 100 aminoácidos contiguos (por ejemplo de cuando menos 200 aminoácidos contiguos). De una manera adecuada, los fragmentos inmunogénicos serán cuando menos el 20 por ciento, tal como cuando menos el 50 por ciento, cuando menos el 70 por ciento, o
20 cuando menos el 80 por ciento de la longitud de la secuencia del polipéptido de longitud completa.

Se entenderá que, en una población exógama diversa, tal como en los seres humanos, diferentes tipos de HLA significan que los epítopos específicos pueden no ser reconocidos por todos los
25 miembros de la población. En consecuencia, con el fin de maximizar

el nivel de reconocimiento y escala de respuesta inmunitaria a un polipéptido, en general es deseable que un fragmento inmunogénico contenga una pluralidad de los epítomos a partir de la secuencia de longitud completa (de una manera adecuada, todos los epítomos).

5 Los fragmentos particulares de la proteína de Rv3616c donde pueden ser útiles incluyen aquéllos que contengan cuando menos un epítomo de CD4+, de una manera adecuada cuando menos dos epítomos de CD4+, y en especial todos los epítomos de CD4+ (tales como los epítomos descritos en los Ejemplos y en las SEQ ID NOs: 10 28 a 47, en particular aquéllos asociados con una pluralidad de alelos de HLA, por ejemplo, aquéllos asociados con 2, 3, 4, 5 o más alelos).

 Otros fragmentos de la proteína de Rv3616c donde pueden ser útiles incluyen aquéllos que contengan cuando menos un epítomo de 15 CD8, de una manera adecuada cuando menos dos epítomos de CD8, y en especial todos los epítomos de CD8 (tales como los epítomos descritos en los Ejemplos y en las SEQ ID NOs: 48 a 126, en particular aquéllos asociados con una pluralidad de alelos de HLA, por ejemplo, aquéllos asociados con 2, 3, 4, 5 o más alelos).

20 Cuando se utiliza un fragmento individual del polipéptido de longitud completa, se considera que este fragmento es inmunogénico cuando provoca una respuesta que es cuando menos el 20 por ciento, de una manera adecuada cuando menos el 50 por ciento, y en especial cuando menos el 75 por ciento (tal como cuando menos el 25 90 por ciento) de la actividad de la secuencia de referencia en un

ensayo de re-estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o de sangre entera con los antígenos específicos (por ejemplo, una re-estimulación durante un período de entre varias horas hasta dos semanas, tal como hasta un día, de 1
5 día a 1 semana o de 1 a 2 semanas), midiendo la activación de las células por medio de linfoproliferación, producción de citoquinas en el sobrenadante de cultivo (medidas mediante ELISA, CBA, etc.) o caracterización de respuestas de células T y B mediante teñido intra- y extra-celular (por ejemplo, utilizando anticuerpos específicos para
10 inmuno-marcadores, tales como CD3, CD4, CD8, IL2, TNFa, IFNg, CD40L, CD69, etc.), seguido por el análisis con un citómetro de flujo. De una manera adecuada, se considera que un fragmento es inmunogénico cuando provoca una respuesta que es cuando menos el 20 por ciento, de una manera adecuada cuando menos el 50 por
15 ciento, y en especial cuando menos el 75 por ciento (tal como cuando menos el 90 por ciento) de la actividad de la secuencia de referencia en un ensayo de proliferación de células-T y/o de producción de IFN-gamma.

En algunas circunstancias, se puede utilizar una pluralidad de
20 fragmentos del polipéptido de longitud completa (los cuales pueden o no estar traslapados, y los cuales pueden o no cubrir la totalidad de la secuencia de longitud completa) para obtener una respuesta biológica equivalente a la secuencia de longitud completa misma. Por ejemplo, cuando menos dos fragmentos inmunogénicos (tal como
25 tres, cuatro, o cinco) como se describe anteriormente, que en

combinación proporcionen cuando menos el 50 por ciento, de una manera adecuada cuando menos el 75 por ciento, y en especial cuando menos el 90 por ciento de la actividad de la secuencia de referencia en un ensayo de re-estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o de sangre entera (por ejemplo, un ensayo de proliferación de células-T y/o de producción de IFN-gamma).

Los péptidos de las SEQ ID Nos: 127 a 156 son fragmentos de un interés particular (en especial aquéllos de las SEQ ID Nos: 127 a 133 y 143 a 156).

VARIANTES

"Variantes" o "variantes conservadoramente modificadas" se aplica a las secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes conservadoramente modificadas se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, hasta secuencias esencialmente idénticas.

Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por consiguiente, en cada posición en donde se una alanina sea especificada por un codón, el codón se puede alterar hasta cualquiera de los codones

correspondientes descritos, sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos conducen a variantes "silenciosas" o "degeneradas", las cuales son una especie de variaciones conservadoramente modificadas. Cada secuencia de
5 ácido nucleico de la presente que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, el cual es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, el cual es ordinariamente el único codón para triptófano) se
10 puede modificar para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. De conformidad con lo anterior, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Un polinucleótido de la invención puede contener un número de
15 variaciones silenciosas (por ejemplo, se pueden alterar de 1 a 50, tal como de 1 a 25, en particular de 1 a 5, y en especial 1 codón(es)) cuando se compara con la secuencia de referencia. Un polinucleótido de la invención puede contener un número de variaciones conservadoras no silenciosas (por ejemplo, se pueden alterar de 1 a
20 50, tal como de 1 a 25, en particular de 1 a 5, y en especial 1 codón(es)) cuando se compara con la secuencia de referencia. Las variaciones no silenciosas son aquellas que dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada (ya sea a través de la sustitución, supresión, o adición de los residuos de
25 aminoácidos). Los expertos en este campo reconocerán que una

secuencia de polinucleótido particular puede contener variaciones conservadoras tanto silenciosas como no silenciosas.

Con respecto a las variantes de una secuencia de proteína, la persona experta reconocerá que las sustituciones, supresiones, o adiciones individuales al polipéptido, que alteren, agreguen, o supriman un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos son una "variante conservadoramente modificada", en donde las alteraciones dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido funcionalmente similar, o la sustitución/supresión/adición de los residuos que no impacten sustancialmente la función biológica de la variante.

Las tablas de sustituciones conservadoras, que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares, son bien conocidas en este campo. Estas variantes conservadoramente modificadas son en adición a, y no excluyen, las variantes polimórficas, los homólogos inter-especies, y los alelos de la invención.

Un polipéptido de la invención puede contener un número de sustituciones conservadoras (por ejemplo, se pueden alterar de 1 a 50, tal como de 1 a 25, en particular de 1 a 10, y en especial 1 residuo(s) de aminoácidos) cuando se compara con la secuencia de referencia. En general, estas sustituciones conservadoras caerán dentro de una de las agrupaciones de aminoácidos especificadas más adelante, aunque en algunas circunstancias, son posibles otras sustituciones sin afectar sustancialmente las propiedades inmunogénicas del antígeno. Los siguientes ocho grupos cada uno

contienen aminoácidos que son típicamente sustituciones conservadoras unos de otros:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 5 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 10 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* 1984).

De una manera adecuada estas sustituciones no se presentan en la región de un epítipo y, por consiguiente, no tienen un impacto significativo sobre las propiedades inmunogénicas del antígeno.

- 15 Las variantes de proteína también pueden incluir aquéllas en donde se insertan aminoácidos adicionales comparándose con la secuencia de referencia, por ejemplo, estas inserciones pueden presentarse en 1 a 10 localizaciones (tal como de 1 a 5 localizaciones, de una manera adecuada 1 ó 2 localizaciones, en particular 1 localización) y, por ejemplo, pueden involucrar la adición
- 20 de 50 ó menos aminoácidos en cada localización (tal como 20 ó menos, en particular 10 ó menos, en especial 5 ó menos). De una manera adecuada, estas inserciones no se presentan en la región de un epítipo y, por consiguiente, no tienen un impacto significativo
- 25 sobre las propiedades inmunogénicas del antígeno. Un ejemplo de

inserciones incluye un estiramiento corto de residuos de histidina (por ejemplo, de 2 a 6 residuos) para ayudar a la expresión y/o purificación del antígeno en cuestión.

Las variantes de proteína incluyen aquéllas en donde se han
5 suprimido aminoácidos, comparándose con la secuencia de referencia, por ejemplo, estas supresiones pueden presentarse en 1 a 10 localizaciones (tal como en 1 a 5 localizaciones, de una manera adecuada en 1 ó 2 localizaciones, en particular en 1 localización) y, por ejemplo, pueden involucrar la supresión de 50 ó menos
10 aminoácidos en cada localización (tal como 20 ó menos, en particular 10 ó menos, en especial 5 ó menos). De una manera adecuada, estas supresiones no se presentan en la región de un epítipo y, por consiguiente no tienen un impacto significativo sobre las propiedades inmunogénicas del antígeno.

15 La persona experta reconocerá que una variante de proteína particular puede comprender sustituciones, supresiones y adiciones (o cualquier combinación de las mismas).

Los métodos para determinar las regiones de epítipo de un antígeno se describen y se ejemplifican en los Ejemplos.

20 Variantes de preferencia exhiben cuando menos aproximadamente el 70 por ciento de identidad, más preferiblemente cuando menos aproximadamente el 80 por ciento de identidad, y de una manera muy preferible cuando menos aproximadamente el 90 por ciento de identidad (tal como cuando menos aproximadamente el
25 95 por ciento, cuando menos aproximadamente el 98 por ciento, o

cuando menos aproximadamente el 99 por ciento) con la secuencia de referencia asociada.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o sub-secuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, identidad del 70 por ciento, opcionalmente identidad del 75 por ciento, del 80 por ciento, del 85 por ciento, del 90 por ciento, del 95 por ciento, del 98 por ciento, o del 99 por ciento sobre una región especificada), al compararse y alinearse para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o una región diseñada como se mida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante alineación manual e inspección visual. Entonces se dice que estas secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que sea de cuando menos aproximadamente 25 a aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, u opcionalmente sobre una región que sea de 75 a 100 aminoácidos o nucleótidos de longitud. De una manera adecuada, la comparación se lleva a cabo sobre una ventana correspondiente a toda la longitud de la secuencia de referencia.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan

las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en una computadora, se designan las coordenadas de la sub-secuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar los parámetros del programa por omisión, o se pueden designar parámetros alternativos. Entonces el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencias para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se utiliza en la presente, hace referencia a un segmento en donde se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se alinean óptimamente las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede conducir, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI),

o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y colaboradores, editores, suplemento 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo útil es el PILEUP. PILEUP crea una
5 alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de
secuencias relacionadas, utilizando alineaciones progresivas por
pares, para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de
secuencias. También grafica un árbol o dendograma que muestra las
relaciones de agrupación utilizadas para crear la alineación. PILEUP
10 utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de
Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987). El método
empleado es similar al método descrito por Higgins y Sharp, *CABIOS*
5: 151-153 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias,
cada una de una longitud máxima de 5,000 nucleótidos o
15 aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple empieza con la
alineación por pares de las dos secuencias más similares,
produciendo un racimo de dos secuencias alineadas. Este racimo se
alinea entonces con la siguiente secuencia más relacionada o racimo
de secuencias alineadas. Dos racimos de secuencias se alinean
20 mediante una extensión simple de la alineación por pares de dos
secuencias individuales. La alineación final se logra mediante una
serie de alineaciones progresivas por pares. El programa se ejecuta
mediante la designación de secuencias específicas y sus
coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para las regiones de
25 comparación de secuencias, y mediante la designación de los

parámetros del programa. Utilizando PILEUP, se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de prueba para determinar la relación del porcentaje de identidad de secuencias, utilizando los siguientes parámetros: peso de hueco por omisión (3.00), peso de longitud de hueco por omisión (0.10), y huecos de extremo ponderados. PILEUP se puede obtener del paquete de software de análisis de secuencias GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Devereaux y colaboradores, *Nuc. Acids Res.* 12: 387-395 (1984)).

Otro ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias, son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y colaboradores, *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 (1977), y Altschul y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990), respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (sitio web en www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo involucra identificar primeramente los pares de secuencias de alto puntaje (HSPs), mediante la identificación de palabras cortas de una longitud W en la secuencia requerida, que concuerden o satisfagan algún puntaje umbral de valor positivo T al alinearse con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T es referido como el umbral de puntaje de palabra vecina (Altschul y colaboradores, *supra*). Estos impactos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas con el fin de encontrar HSPs más largos que las contengan. Los impactos de

palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por tanto como se pueda aumentar el puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativos se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre >0) y N (puntaje de multa para los residuos mal emparejados; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de los impactos de palabra en cada dirección se detienen cuando: el puntaje de alineación acumulativo cae fuera por la cantidad X desde su máximo valor alcanzado; el puntaje acumulativo llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T, y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por omisión una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por omisión una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89: 10915 (1989)), alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y

Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual ocurriría un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos por azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0.2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0.01 y de una manera muy preferible menor de aproximadamente 0.001.

La presente invención también se extiende a los polinucleótidos que comprenden una primera secuencia de nucleótidos que se hibrida selectivamente bajo condiciones moderadamente restrictivas (tal como bajo condiciones altamente restrictivas) al complemento de una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c,

para el tratamiento o la prevención de tuberculosis (TB) latente.

La frase "condiciones de hibridación altamente restrictivas" se refiere a las condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará a

su sub-secuencia objetivo, típicamente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero no a otras secuencias. Las condiciones altamente restrictivas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Se encuentra una extensa guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology -- Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridisation and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En términos generales, las condiciones altamente restrictivas se seleccionan para ser de aproximadamente 5 a 10°C más bajos que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a un pH de concentración iónica definida. La T_m es la temperatura (bajo el pH de concentración iónica definida la concentración de ácido nucleico) en donde el 50 por ciento de las sondas complementarias para el objetivo se hibridan a la secuencia objetivo en equilibrio (debido a que las secuencias objetivo están presentes en exceso, a la T_m , el 50 por ciento de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones altamente restrictivas serán aquellas en donde la concentración de sal sea menor de aproximadamente 1.0 M de ion de sodio, típicamente una concentración de aproximadamente 0.01 a 1.0 M de ion de sodio (u otras sales) a un pH de 7.0 a 8.3, y la temperatura sea de cuando menos aproximadamente 30°C para las sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos), y de cuando menos aproximadamente 60°C para las sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos).

Las condiciones altamente restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es una hibridación de cuando menos dos veces el fondo, opcionalmente 10 veces el fondo.

Las condiciones de hibridación altamente restrictivas de ejemplo pueden ser como sigue: formamida al 50 por ciento, 5x SSC, y SDS al 1 por ciento, incubación a 42°C, o 5x SSC, SDS al 1 por ciento, incubación a 65°C, con lavado en 0.2x SSC, y SDS al 0.1 por ciento a 65°C.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan unos a otros bajo condiciones altamente restrictivas son todavía funcionalmente equivalentes si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos típicamente se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente restrictivas.

Las "condiciones de hibridación moderadamente restrictivas" de ejemplo incluyen una hibridación en un regulador de formamida al 40 por ciento, NaCl 1 M, SDS al 1 por ciento, a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva es cuando menos dos veces el fondo. Aquellos de una experiencia ordinaria reconocerán fácilmente que se pueden emplear condiciones alternativas de hibridación y lavado para proporcionar condiciones de una

restringencia similar.

La frase "se hibrida selectivamente (o específicamente) a", se refiere al enlace, duplexión, o hibridación de una molécula solamente a una secuencia de nucleótidos particular, bajo condiciones de hibridación restringentes, cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total o de biblioteca).

En cualquier caso, las variantes de una secuencia de polipéptido tendrán esencialmente la misma actividad que la secuencia de referencia (en el caso de los polinucleótidos, las secuencias de polinucleótidos variantes codificarán un polipéptido que tenga esencialmente la misma actividad que la secuencia de referencia). Esencialmente la misma actividad significa una actividad de cuando menos el 50 por ciento, de una manera adecuada de cuando menos el 75 por ciento, y en especial de cuando menos el 90 por ciento de la secuencia de referencia en un ensayo de re-estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o de sangre entera con antígenos específicos (por ejemplo, re-estimulación durante un período de entre varias horas hasta dos semanas, tal como hasta un día, de 1 día a 1 semana, o de 1 a 2 semanas), que mide la activación de las células por medio de linfoproliferación, producción de citoquinas en el sobrenadante de cultivo (medidas mediante ELISA, CBA, etc.), o caracterización de respuestas de células T y B mediante tinte intra- y extra-celular (por ejemplo, utilizando anticuerpos específicos para inmuno-marcadores, tales

como CD3, CD4, CD8, IL2, TNFa, IFNg, CD40L, CD69, etc.), seguido por análisis con un citómetro de flujo. De una manera adecuada, esencialmente la misma actividad significa una actividad de cuando menos el 50 por ciento, de una manera adecuada de cuando menos el 75 por ciento, y en especial de cuando menos el 90 por ciento de la secuencia de referencia en un ensayo de proliferación de células-T y/o de producción de IFN-gamma.

COMPOSICIONES DE POLINUCLEÓTIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula que se ha aislado para liberarse del ADN genómico total de una especie particular. Por consiguiente, un polinucleótido que codifique un polipéptido se refiere a un segmento de polinucleótido que contiene una o más secuencias de codificación, y no obstante, está sustancialmente aislado de, o purificado para liberarse de, el ADN genómico total de la especie a partir de la cual se obtenga el polinucleótido.

Como será entendido por los expertos en este campo, los polinucleótidos útiles en esta invención pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extra-genómicas y codificadas por plásmidos, y segmentos genéticos diseñados más pequeños que expresen, o que se puedan adaptar para expresar, proteínas, polipéptidos, péptidos, y similares. Estos segmentos se pueden aislar naturalmente, o pueden ser modificados sintéticamente por la mano del hombre.

"Aislado", como se utiliza en la presente, significa que un

polinucleótido está sustancialmente lejos de otras secuencias de codificación, y que el polinucleótido no contiene porciones grandes de ADN codificante no relacionado, tales como los fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de polipéptidos. Un ácido nucleico aislado se separa de otros marcos de lectura abierta que flanquean el gen y que codifican proteínas diferentes del gen. Por supuesto, esto se refiere al segmento de ADN como se aisló originalmente, y no excluye a los genes o a las regiones codificantes agregadas posteriormente al segmento por la mano del hombre.

Como será reconocido por el experto, los polinucleótidos pueden ser de una sola cadena (codificante o anti-sentido) o de doble cadena, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc, o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de HnARN, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de una manera de uno a uno, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Puede haber secuencias codificantes o no codificantes adicionales, pero no es necesario, presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede, pero no necesita, estar enlazado a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifique un antígeno de *Mycobacterium* o una porción del mismo), o pueden comprender una variante, o un equivalente biológico o funcional de esta secuencia.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, supresiones, y/o inserciones, como se describe adicionalmente más adelante, de preferencia de tal manera que no se disminuya la inmunogenicidad del polipéptido codificado en relación la proteína de referencia. El efecto sobre la inmunogenicidad del polipéptido codificado se puede evaluar en general como se describe en la presente.

En las modalidades adicionales, la presente invención proporciona polinucleótidos y polipéptidos aislados que comprenden diferentes longitudes de estiramientos contiguos de secuencia idénticos a, o complementarios para, una o más de las secuencias dadas a conocer en la presente. Por ejemplo, esta invención proporciona polinucleótidos que comprenden cuando menos 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, ó 1,000 o más nucleótidos contiguos de la secuencia de referencia dada a conocer en la presente, así como los tramos intermedios entre los mismos. Se entenderá fácilmente que "tramos intermedios", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tal como 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los enteros hasta 200-500; 500-1,000, y similares.

Más aún, será apreciado por los expertos ordinarios en este campo que, como un resultado de la degeneración del código genético, puede haber muchas secuencias de nucleótidos que codifiquen un polipéptido como se describe en la presente. Algunos

de estos polinucleótidos tienen una identidad relativamente baja con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, la presente invención contempla específicamente los polinucleótidos que varíen debido a las diferencias en el uso de codones, por ejemplo, los polinucleótidos que se optimicen para la selección de codones humanos y/o de primates. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como un resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones, y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultante pueden, pero no necesitan, tener una estructura o función alterada. Los alelos se pueden identificar empleando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación, y/o comparación de secuencias de bases de datos).

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLINUCLEÓTIDOS

Los polinucleótidos se pueden identificar, preparar, y/o manipular empleando cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas. Por ejemplo, un polinucleótido se puede identificar, como se describe con mayor detalle más adelante, mediante el rastreo de un microarreglo de ADNcs. Estos rastreos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, utilizando un microarreglo de Synteni (Palo Alto, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (y esencialmente como es descrito por Schena y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 93:10614-10619 (1996), y Heller y

colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 94:2150-2155 (1997)). De una manera alternativa, los polinucleótidos se pueden amplificar a partir del ADNc preparado a partir de células que expresen las proteínas descritas en la presente, tales como las células de *M. tuberculosis*. Estos polinucleótidos se pueden amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para este planteamiento, se pueden diseñar cebadores específicos de la secuencia, basándose en las secuencias proporcionadas en la presente, y se pueden comprar o sintetizar.

Se puede utilizar una porción amplificada de un polinucleótido para aislar un gen de longitud completa a partir de una biblioteca adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de *M. tuberculosis*), empleando técnicas bien conocidas. Dentro de estas técnicas, se rastrea una biblioteca (ADNc o genómico) utilizando una o más sondas de polinucleótido o cebadores adecuados para la amplificación. De preferencia, se selecciona por tamaños una biblioteca para incluir moléculas más grandes. También se pueden preferir las bibliotecas cebadas aleatoriamente para identificar las regiones 5' y corriente arriba de los genes. Se prefieren las bibliotecas genómicas para obtener intrones y extender las secuencias 5'.

Para las técnicas de hibridación, una secuencia parcial se puede marcar (por ejemplo, mediante traducción de apriete o marcado de extremo con ^{32}P) empleando técnicas bien conocidas. Entonces se rastrea en general una biblioteca bacteriana o de

bacteriófagos mediante filtros de hibridación que contienen colonias bacterianas desnaturalizadas (o pistas que contienen placas de fagos) con la sonda marcada (véase Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2000)). Las colonias o
5 placas que se hibridan se seleccionan y se expanden, y se aísla el ADN para un análisis adicional. Los clones de ADNc se pueden analizar para determinar la cantidad de secuencia adicional, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa, utilizando un cebador a partir de la secuencia parcial y un cebador a partir del
10 vector. Se pueden generar mapas de restricción y secuencias parciales para identificar uno o más clones traslapados. Entonces se puede determinar la secuencia completa empleando técnicas convencionales, las cuales pueden involucrar la generación de una serie de clones de supresión. Luego se pueden ensamblar las
15 secuencias traslapadas resultantes en una sola secuencia contigua. Se puede generar una molécula de ADNc de longitud completa mediante el ligamiento de los fragmentos adecuados, empleando técnicas bien conocidas.

De una manera alternativa, existen numerosas técnicas de
20 amplificación para obtener una secuencia de codificación de longitud completa a partir de una secuencia de ADNc parcial. Dentro de estas técnicas, la amplificación se lleva a cabo en general mediante reacción en cadena de la polimerasa. Se puede emplear cualquiera de una variedad de los kits comercialmente disponibles para llevar a
25 cabo el paso de amplificación. Se pueden diseñar cebadores

256

utilizando, por ejemplo, software bien conocido en la técnica. Los cebadores de preferencia son de 22 a 30 nucleótidos de longitud, tienen un contenido de GC de cuando menos el 50 por ciento, y se templan a la secuencia objetivo a temperaturas de aproximadamente 68°C a 72°C. La región amplificada se puede secuenciar como se describe anteriormente, y se ensamblan las secuencias traslapadas en una secuencia contigua.

Una de estas técnicas de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa inversa (véase Triglia y colaboradores, *Nucl. Acids Res.* 16:8186 (1988)), la cual utiliza enzimas de restricción para generar un fragmento en la región conocida del gen. Entonces se circulariza el fragmento mediante ligamiento intramolecular, y se utiliza como una plantilla para la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores divergentes derivados a partir de la región conocida. Dentro de un planteamiento alternativo, las secuencias adyacentes a una secuencia parcial se pueden recuperar mediante amplificación con un cebador para una secuencia enlazadora y un cebador específico para una región conocida. Las secuencias amplificadas típicamente se someten a una segunda ronda de amplificación con el mismo cebador enlazador y un segundo cebador específico para la región conocida. En la Publicación Internacional Número WO 96/38591, se describe una variación sobre este procedimiento, que emplea dos cebadores que inician la extensión en direcciones opuestas desde la secuencia conocida. Otra de estas técnicas se conoce como "amplificación rápida de los

extremos del ADNc" o RACE. Esta técnica involucra el uso de un cebador interno y un cebador externo, que se hibrida a una región poliA o a una secuencia de vector, para identificar las secuencias que sean 5' y 3' de una secuencia conocida. Las técnicas adicionales
5 incluyen reacción en cadena de la polimerasa de captura (Lagerstrom y colaboradores, *PCR Methods Applic.* 1:111-19 (1991)), y reacción en cadena de la polimerasa caminante (Parker y colaboradores, *Nucl. Acids. Res.* 19:3055-60 (1991)). También se pueden emplear otros métodos que empleen amplificación con el fin
10 de obtener una secuencia de ADNc de longitud completa.

En ciertos casos, es posible obtener una secuencia de ADNc de longitud completa mediante el análisis de las secuencias proporcionadas en una base de datos de marca de secuencia expresada (EST), tal como la que está disponible en GenBank. Las
15 búsquedas de las ESTs traslapadas se pueden llevar a cabo en general empleando programas bien conocidos (por ejemplo, búsquedas de NCBI BLAST), y estas ESTs se pueden utilizar para generar una secuencia de longitud completa contigua. También se pueden obtener secuencias de ADN de longitud completa mediante el
20 análisis de los fragmentos genómicos.

EXPRESIÓN DE POLINUCLEÓTIDOS EN CÉLULAS HUÉSPED

Se pueden utilizar secuencias de polinucleótidos o fragmentos de las mismas que codifiquen los polipéptidos, o proteínas de fusión o sus equivalentes funcionales, en moléculas de ADN recombinante,
25 para dirigir la expresión de un polipéptido en células huésped

apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, se pueden producir otras secuencias de ADN que codifiquen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente, y estas
5 secuencias se pueden utilizar para clonar y expresar un polipéptido dado.

Como será entendido por los expertos en la materia, puede ser conveniente, en algunos casos, producir secuencias de nucleótidos que codifiquen polipéptidos que posean codones que no se
10 presenten naturalmente. Por ejemplo, se pueden seleccionar los codones preferidos por un huésped procariótico o eucariótico particular para aumentar el índice de expresión de proteína, o para producir una transcripción de ARN recombinante que tenga las propiedades deseables, tales como una vida media que sea más
15 larga que aquélla de una transcripción generada a partir de la secuencia que se presente naturalmente.

Más aún, las secuencias de polinucleótidos se pueden diseñar empleando métodos generalmente conocidos en la técnica, con el objeto de alterar las secuencias de codificación de polipéptidos por
20 una variedad de razones, incluyendo, pero no limitándose a, alteraciones que modifiquen la clonación, procesamiento, y/o expresión del producto genético. Por ejemplo, se puede emplear mezcla de ADN mediante fragmentación aleatoria y reensamble de fragmentos de genes y oligonucleótidos sintéticos mediante reacción
25 en cadena de la polimerasa, para diseñar secuencias de nucleótidos.

En adición, se puede emplear mutagénesis dirigida al sitio para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glicosilación, cambiar la preferencia de codones, producir variantes de empalme, o introducir mutaciones, etc.

5 Las secuencias de ácidos nucleicos naturales, modificadas, o recombinantes se pueden ligar a una secuencia heteróloga, para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, con el fin de rastrear las bibliotecas de péptidos para determinar los inhibidores de la actividad del polipéptido, puede ser útil codificar una proteína
10 quimérica que pueda ser reconocida por un anticuerpo comercialmente disponible. También se puede diseñar una proteína de fusión para que contenga un sitio de disociación localizado entre la secuencia de codificación del polipéptido y la secuencia de proteína heteróloga, de tal manera que el polipéptido se pueda
15 disociar y purificar a partir de la fracción heteróloga.

Se pueden sintetizar secuencias que codifiquen un polipéptido deseado, del todo o en parte, empleando métodos químicos bien conocidos en la materia (véase Caruthers, M. H. y colaboradores, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* páginas 215-223 (1980), Horn y
20 colaboradores, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* páginas 225-232 (1980)).

De una manera alternativa, la proteína misma se puede producir empleando métodos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o una porción de la misma. Por
25 ejemplo, se puede llevar a cabo síntesis de péptidos empleando

diferentes técnicas en fase sólida (Roberge y colaboradores, *Science* 269:202-204 (1995)), y se puede lograr la síntesis automatizada, por ejemplo, empleando el Sintetizador de Péptidos ABI 431A (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

5 Un péptido recién sintetizado se puede purificar sustancialmente mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de preparación (por ejemplo, Creighton, *Proteins, Structures and Molecular Principles* (1983)), u otras técnicas comparables disponibles en este campo. La composición de los
10 péptidos sintéticos se puede confirmar mediante análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman). Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o cualquier parte de la misma, se puede alterar durante la síntesis directa, y/o se puede combinar
15 empleando métodos químicos con secuencias de otras proteínas, o cualquier parte de las mismas, para producir un polipéptido variante.

 Con el objeto de expresar un polipéptido deseado, las secuencias de nucleótidos que codifiquen al polipéptido, o sus equivalentes funcionales, se pueden insertar en un vector de
20 expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Se pueden emplear los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifiquen un polipéptido
25 de interés y elementos de control de transcripción y de traducción

apropiados. Estos métodos incluyen las técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Estas técnicas se describen en Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2000), y Ausubel y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology* (actualizado anualmente).

Se pueden utilizar una variedad de vectores de expresión/ sistemas huésped para contener y expresar las secuencias de polinucleótidos. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante de bacteriófagos, plásmidos, o cósmidos, levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células de plantas transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco; TMV), o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, los plásmidos Ti ó pBR322); o sistemas de células de animales.

Los "elementos de control" o las "secuencias reguladoras" presentes en un sistema de expresión, son las regiones no traducidas del vector - potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3' - que interactúan con las proteínas celulares huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Estos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y del huésped utilizado, se puede utilizar

4/12

cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden utilizar promotores inducibles, tales como el promotor lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.), o el plásmido PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), y similares. En los sistemas celulares de mamífero, en general se prefieren los promotores a partir de genes de mamífero o a partir de virus de mamífero. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifique un polipéptido, convenientemente se pueden utilizar vectores basados en SV40 ó EBV, con un marcador seleccionable apropiado.

En los sistemas bacterianos, se puede seleccionar un número de vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades, por ejemplo para la inducción de anticuerpos, se pueden utilizar vectores que dirijan una expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, los vectores de clonación y expresión en *E. coli* multifuncionales, tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en donde la secuencia que codifica el polipéptido de interés se puede ligar en el vector dentro del marco con secuencias para el Met amino-terminal y los siguientes 7 residuos de β -galactosidasa, de tal manera que se produce una proteína híbrida; vectores pIN ((Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509 (1989)); y similares. También se

112

pueden utilizar los vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con S-transferasa de glutatona (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de las
5 células lisadas mediante adsorción en perlas de glutatona-agarosa, seguido por elución en la presencia de glutatona libre. Las proteínas hechas en estos sistemas se pueden diseñar para incluir sitios de disociación de heparina, trombina, o proteasa de factor XA, de tal manera que se pueda liberar el polipéptido clonado de interés a
10 partir de la fracción GST al gusto.

En la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden utilizar un número de vectores que contengan promotores constitutivos o inducibles, tales como factor alfa, alcohol, oxidasa, y PGH. Otros vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles
15 incluyen GAP, PGK, GAL, y ADH. Para las revisiones, véase Ausubel y colaboradores (*supra*), y Grant y colaboradores, *Methods Enzymol.* 153: 516-544 (1987), y Romas y colaboradores, *Yeast* 8 423-88 (1992).

En los casos en donde se utilizan vectores de expresión en
20 plantas, la expresión de las secuencias que codifiquen los polipéptidos se puede impulsar mediante cualquiera de un número de promotores. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores virales, tales como los promotores 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia líder omega a partir de TMV (Takamatsu, *EMBO J.*
25 6:307-311 (1987)). De una manera alternativa, se pueden utilizar

promotores de plantas, tales como la subunidad pequeña de RUBISCO, o los promotores de choque por calor (Coruzzi y colaboradores, *EMBO J.* 3: 1671-1680 (1984); Broglie y colaboradores, *Science* 224: 838-843 (1984); y Winter y colaboradores, *Results Probl. Cell Differ.* 17: 85-105 (1991)). Estas construcciones se pueden introducir en células de plantas mediante la transformación del ADN directa, o mediante transfección mediada por patógeno. Estas técnicas se describen en un número de revisiones generalmente disponibles (véase, por ejemplo, Hobbs, en 10 *McGraw Hill Yearbook of Science and Technology*, páginas 191-196 (1992)).

También se puede utilizar un sistema de insecto para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de estos sistemas, se utiliza el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños en células de 15 *Spodoptera frugiperda* o en *Trichoplusia larvae*. Las secuencias que codifiquen el polipéptido se pueden clonar en la región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y se ponen bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción con éxito de la secuencia decodificación del polipéptido hará que el gen de polihedrina se 20 inactive y produzca el virus recombinante careciendo de proteína de recubrimiento. Entonces se pueden utilizar los virus recombinantes para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o *Trichoplusia larvae*, en donde se puede expresar el polipéptido de interés 25 (Engelhard y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 91:3224-

3227 (1994)).

En las células huésped de mamífero, en general hay un número de sistemas de expresión basados en virus disponibles. Por ejemplo, en los casos en donde se utiliza un adenovirus como un vector de expresión, se pueden ligar las secuencias que codifiquen un polipéptido de interés en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus consistente en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Se puede emplear la inserción en una región E1 ó E3 no esencial del genoma viral para obtener un virus viable, el cual es capaz de expresar el polipéptido en las células huésped infectadas (Logan y Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 81:3655-3659 (1984)). En adición, se pueden utilizar potenciadores de transcripción, tales como el potenciador de virus de sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células huésped de mamífero. Los métodos y protocolos para trabajar con vectores de adenovirus se revisan en Wold, *Adenovirus Methods and Protocols*, 1998. Las referencias adicionales con respecto al uso de vectores de adenovirus se pueden encontrar en *Adenovirus: A Medical Dictionary, Bibliography, and Annotated Research Guide to Internet References*, 2004.

También se pueden utilizar señales de inicio específicas para lograr una traducción más eficiente de las secuencias que codifiquen un polipéptido de interés. Estas señales incluyen el codón de inicio de ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en donde se inserten secuencias que codifiquen el polipéptido, su codón de inicio, y las secuencias corriente arriba, en el vector de expresión

apropiado, pueden no necesitarse señales de control de transcripción o de traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en donde solamente se inserte la secuencia de codificación, o una porción de la misma, se deben proporcionar señales de control de traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio de ATG. Adicionalmente, el codón de inicio debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción del inserto entero. Los elementos de traducción exógenos y los codones de inicio pueden ser de diferentes orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular particular que se utilice, tales como los descritos en la literatura (Scharf y colaboradores, *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162 (1994)).

En adición, se puede seleccionar una cepa de células huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas, o para procesar la proteína expresada en la forma deseada. Estas modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. También se puede emplear el procesamiento posterior a la traducción que disocie una forma "prepro" de la proteína, para facilitar la inserción correcta, el pliegue, y/o la función. Se pueden seleccionar diferentes células huésped, tales como CHO, HeLa, MDCK, HEK293, y WI38, las cuales tienen una maquinaria celular específica y los mecanismos característicos para estas actividades posteriores a la traducción, con el fin de asegurar

la modificación correcta y el procesamiento de la proteína extraña.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, en general se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresen establemente un
5 polinucleótido de interés, se pueden transformar utilizando vectores de expresión, los cuales pueden contener orígenes de réplica virales y/o elementos de expresión endógenos, y un gen marcador seleccionable, sobre el mismo vector o sobre un vector separado. En seguida de la introducción del vector, se puede permitir que las
10 células crezcan durante 1 a 2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse al medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de las células que expresen con éxito las secuencias introducidas. Los clones resistentes de las
15 células establemente transformadas se pueden proliferar empleando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula.

Se puede utilizar cualquier número de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Éstas incluyen, pero no se limitan a, los genes de cinasa de timidina del virus de
20 herpes simplex (Wigler y colaboradores, *Cell* 11:223-32 (1977)), y de fosfo-ribosil-transferasa de adenina (Lowy y colaboradores, *Cell* 22:817-23 (1990)), los cuales se pueden emplear en células tk.sup. ó aprt.sup., respectivamente. También, se puede utilizar la resistencia a antimetabolitos, a antibióticos, o a herbicidas como la base para la
25 selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia al metotrexato

(Wigler y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 77:3567-70 (1980)); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 150:1-14 (1981)); y als ó pat, que confieren resistencia al
5 clorosulfurón y a la acetil-transferasa de fosfinotricina, respectivamente (Murry, *supra*). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, ó hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan,
10 *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 85:8047-51 (1988)). Recientemente, el uso de marcadores visibles ha ganado popularidad con marcadores tales como antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, que se utilizan ampliamente no sólo para identificar los transformantes, sino también para cuantificar
15 la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes y colaboradores, *Methods Mol. Biol.* 55:121-131 (1995)).

Aunque la presencia/ausencia de la expresión del gen marcador sugiere que también está presente el gen de interés, se
20 puede necesitar confirmar su presencia y su expresión. Por ejemplo, si la secuencia que codifique un polipéptido se inserta dentro de una secuencia del gen marcador, se pueden identificar las células recombinantes que contengan las secuencias por la ausencia de la función del gen marcador. De una manera alternativa, se puede
25 colocar un gen marcador en fila con una secuencia que codifique al

polipéptido bajo el control de un solo promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o a la selección, normalmente indica la expresión del gen en fila también.

De una manera alternativa, se pueden identificar células huésped que contengan y expresen una secuencia de polinucleótido deseada, mediante una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hibridaciones de ADN-ADN ó de ADN-ARN, y técnicas de bioensayo o inmunoensayo de proteínas, las cuales incluyen las tecnologías basadas en membrana, en solución, o en chip, para la detección y/o cuantificación del ácido nucleico o de la proteína.

En la técnica se conocen una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de los productos codificados por los polinucleótidos, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos incluyen el ensayo de inmunoabsorción enlazado con enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y selección de células activada por fluorescencia (FACS). Para algunas aplicaciones, se puede preferir un inmunoensayo basado en monoclonal, de dos sitios, que utilice anticuerpos monoclonales que reaccionen con dos epítomos no interferentes sobre un polipéptido dado, pero también se puede emplear un ensayo de enlace competitivo. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton y colaboradores, *Serological Methods, a Laboratory Manual* (1990), y en Maddox y colaboradores, *J. Exp. Med.* 158:1211-1216 (1983).

Los expertos en este campo conocen una amplia variedad de marcas y técnicas de conjugación, y se pueden utilizar en diferentes ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada o sondas de reacción en cadena de la polimerasa para detectar secuencias relacionadas con los polinucleótidos incluyen oligomarcado, traducción de apriete, marcado de extremo, o amplificación con reacción en cadena de la polimerasa utilizando un nucleótido marcado. De una manera alternativa, las secuencias, o cualesquiera porciones de las mismas, se pueden clonar en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Estos vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles, y se pueden utilizar para sintetizar sondas de ARN *in vitro*, mediante la adición de una polimerasa de ARN apropiada, tal como T7, T3, ó SP6, y nucleótidos marcados. Estos procedimientos se pueden conducir empleando una variedad de kits comercialmente disponibles. Las moléculas reporteras o marcas adecuadas que se pueden utilizar incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimiluminiscentes, o cromogénicos, así como sustratos, co-factores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

Las células huésped transformadas con una secuencia de polinucleótido de interés se pueden cultivar bajo condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede ser secretada o contenida intracelularmente,

dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado. Como será entendido por los expertos en la materia, se pueden diseñar vectores de expresión que contengan los polinucleótidos para contener secuencias de señales que dirijan la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana celular procariótica o eucariótica. Se pueden utilizar otras construcciones recombinantes para unir las secuencias que codifiquen un polipéptido de interés a la secuencia de nucleótidos que codifique un dominio de polipéptido que facilite la purificación de las proteínas solubles. Estos dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metales, tales como los módulos de histidina-triptófano, que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, los dominios de la proteína A que permiten la purificación sobre la inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de extensión/purificación por afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). La inclusión de secuencias enlazadoras dissociables, tales como aquellas específicas para el factor XA o la enterocinasa (Invitrogen, San Diego, Calif.) entre el dominio de purificación y el polipéptido codificado, se pueden utilizar para facilitar la purificación. Uno de estos vectores de expresión proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de interés, y un ácido nucleico que codifica seis residuos de histidina precedentes a una tiorredoxina o a un sitio de disociación de enterocinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación en la IMIAC (cromatografía por afinidad de ión de metal inmovilizado),

como se describe en Porath y colaboradores, *Prot. Exp. Purif.* 3:263-281 (1992), mientras que el sitio de disociación de enterocinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido deseado a partir de la proteína de fusión. Una discusión de los vectores que
5 contienen proteínas de fusión se proporciona en Kroll y colaboradores, *DNA Cell Biol.* 12: 441-453 (1993)).

TÉCNICAS DE SUMINISTRO DE POLINUCLEÓTIDOS *IN VIVO*

En las modalidades adicionales, se introducen construcciones genéticas que comprendan uno o más de los polinucleótidos de la
10 invención en las células *in vivo*. Esto se puede lograr empleando cualquiera de una variedad de planteamientos bien conocidos, varios de los cuales se ilustran en seguida para propósitos de ilustración.

1. *Adenovirus*

Uno de los métodos preferidos para el suministro *in vivo* de una
15 o más secuencias de ácidos nucleicos involucra el uso de un vector de expresión de adenovirus. "Vector de expresión de adenovirus" pretende incluir las construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para: (a) soportar el empaque de la construcción, y (b) expresar un polinucleótido que se haya clonado
20 en el mismo en una orientación en sentido o anti-sentido. Desde luego, en el contexto de una construcción anti-sentido, la expresión no requiere que se sintetice el producto genético.

El vector de expresión comprende una forma genéticamente diseñada de un adenovirus. El conocimiento de la organización
25 genética del adenovirus, un virus de ADN de doble cadena, lineal, de

36 kb, permite la sustitución de pedazos grandes de ADN adenoviral con secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992). En contraste con el retrovirus, la infección adenoviral de las células huésped no da como resultado una integración cromosómica, debido a que el ADN adenoviral puede replicarse de una manera episomal sin una genotoxicidad potencial. También, los adenovirus son estructuralmente estables, y no se ha detectado ninguna reconfiguración del genoma después de una extensa amplificación. El adenovirus puede infectar virtualmente a todas las células epiteliales, independientemente de su etapa en el ciclo celular. Hasta ahora, la infección adenoviral parece estar ligada solamente a la enfermedad leve, tal como la enfermedad respiratoria aguda en seres humanos.

El adenovirus es particularmente adecuado para utilizarse como un vector de transferencia de genes, debido a su genoma de tamaño mediano, a su facilidad de manipulación, a su alta titulación, a su amplio intervalo de células objetivo, y a su alta infectividad. Ambos extremos del genoma viral contienen repeticiones invertidas (ITRs) de 100 a 200 pares de bases, que son elementos *cis* necesarios para la réplica y el empaque del ADN. Las regiones temprana (E) y tardía (L) del genoma contienen diferentes unidades de transcripción, que se dividen mediante el establecimiento de la réplica del ADN viral. La región E1 (E1A y E1B) codifica las proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma viral y unos cuantos genes celulares. La expresión de la

región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de las proteínas para la réplica del ADN viral. Estas proteínas están involucradas en la réplica del ADN, en la expresión tardía del gen, y en la desactivación de la célula huésped (Renan, 1990). Los productos de los genes tardíos, incluyendo la mayoría de las proteínas de capsida virales, se expresan solamente después de un procesamiento significativo de una sola transcripción primaria emitida por el promotor tardío mayor (MLP). El MLP (localizado a 16.8 m.u.) es particularmente eficiente durante la fase tardía de la infección, y todo el ARNm emitido desde este promotor posee una secuencia líder tripartita-5' (TPL) que lo convierte en el ARNm preferido para la traducción.

En un sistema actual, se genera el adenovirus recombinante a partir de recombinación homóloga entre el vector de lanzamiento y el vector de pro-virus. Debido a la posible recombinación entre dos vectores pro-virales, se puede generar el adenovirus de tipo silvestre a partir de este proceso. Por consiguiente, es crítico aislar un solo clon del virus a partir de una placa individual, y examinar su estructura genómica.

La generación y propagación de los vectores de adenovirus actuales, que son deficientes en réplica, dependen de una línea celular auxiliar única, designada como 293, que se transformó a partir de células de riñón embrionario humano, mediante fragmentos de ADN Ad5, y que expresa constitutivamente las proteínas E1 (Graham y colaboradores, 1977). Debido a que se puede prescindir

de la región E3 del genoma de adenovirus (Jones y Shenk, 1978), los vectores de adenovirus actuales, con la ayuda de las células 293, llevan ADN extraño ya sea en la región E1, en la región D3, o en ambas regiones (Graham y Prevec, 1991). En la naturaleza, el
5 adenovirus puede empacar aproximadamente el 105 por ciento del genoma de tipo silvestre (Ghosh-Choudhury y colaboradores, 1987), proporcionando la capacidad para aproximadamente 2 kB extra de ADN. Combinado con las aproximadamente 5.5 kB de ADN que son reemplazables en las regiones E1 y E3, la máxima capacidad del
10 vector de adenovirus actual está debajo de 7.5 kB, o aproximadamente el 15 por ciento de la longitud total del vector. Más del 80 por ciento del genoma viral del adenovirus permanece en la estructura base del vector, y es la fuente de la citotoxicidad surgida del vector. También, la deficiencia en réplica del virus con E1
15 suprimida es incompleta. Por ejemplo, se ha observado una filtración de la expresión del gen viral con los vectores actualmente disponibles en altas multiplicidades de infección (MOI) (Mulligan, 1993).

Las líneas celulares auxiliares se pueden derivar a partir de
20 células humanas, tales como células de riñón embrionario humano, células de músculo, células hematopoiéticas, u otras células mesenquimales o epiteliales embrionarias humanas. De una manera alternativa, las células auxiliares se pueden derivar a partir de las células de otras especies de mamífero que sean permisivas para el
25 adenovirus humano. Estas células incluyen, por ejemplo, las células

726

Vero u otras células mesenquimales o epiteliales embrionarias de mono. Como se mencionó anteriormente, la línea celular auxiliar actualmente preferida es la 293.

Recientemente, Racher y colaboradores (1995) han dado a
5 conocer mejores métodos para cultivar las células 293 y propagar el
adenovirus. En un formato, se cultivan agregados celulares naturales
mediante la inoculación de las células individuales en matraces
centrífugos siliconizados de 1 litro (Techne, Cambridge, Reino
Unido) conteniendo de 100 a 200 mililitros del medio. En seguida de
10 la agitación a 40 revoluciones por minuto, se estima la viabilidad
celular con azul de tripano. En otro formato, se emplean
microportadores Fibra-Cel (Bibby Sterlin, Stone, Reino Unido) (5
gramos/litro) como sigue. Se agrega un inóculo celular, resuspendido
en 5 mililitros del medio, al portador (50 mililitros) en un matraz
15 Erlenmeyer de 250 mililitros, y se deja estacionario, con agitación
ocasional, durante 1 a 4 horas. Luego se reemplaza el medio con 50
mililitros de medio fresco, y se inicia la agitación. Para la producción
del virus, se permite que las células crezcan hasta aproximadamente
una confluencia del 80 por ciento, después de cuyo tiempo, se
20 reemplaza el medio (hasta el 25 por ciento del volumen final), y se
agrega el adenovirus a una multiplicidad de infección de 0.05. Los
cultivos se dejan estacionarios durante la noche, en seguida de lo
cual, se aumenta el volumen hasta el 100 por ciento, y se comienza
la agitación durante otras 72 horas.

25 De una forma diferente que no sea el requerimiento de que el

vector de adenovirus sea defectuoso en réplica, o cuando menos condicionalmente defectuoso, no se cree que la naturaleza del vector de adenovirus sea crucial para la práctica con éxito de la invención. El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos conocidos diferentes o subgrupos A-F. El adenovirus tipo 5 o subgrupo C es el material de partida preferido con el objeto de obtener un vector de adenovirus defectuoso en réplica condicional para utilizarse en la presente invención, debido a que el adenovirus tipo 5 es un adenovirus humano acerca del cual se conoce una gran cantidad de información bioquímica y genética, e históricamente se ha utilizado para la mayoría de las construcciones que emplean adenovirus como un vector.

Como se mencionó anteriormente, el vector típico de acuerdo con la presente invención es defectuoso en réplica, y no tendrá una región de adenovirus E1. Por lo tanto, será más conveniente introducir el polinucleótido que codifique el gen de interés en la posición a partir del cual se hayan removido las secuencias que codifiquen E1. Sin embargo, la posición de inserción de la construcción dentro de las secuencias de adenovirus no es crítica para la invención. El polinucleótido que codifique el gen de interés también se puede insertar en lugar de la región E3 suprimida, en los vectores de reemplazo de E3, como es descrito por Karlsson y colaboradores (1986), o en la región E4, en donde una línea celular auxiliar o un virus auxiliar complementa al defecto de E4.

El adenovirus es fácil de cultivar y manipular, y exhibe un

amplio rango de huéspedes *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus se puede obtener en altas titulaciones, por ejemplo, de 10^9 a 10^{11} unidades formadoras de placas por mililitro, y son altamente infecciosos. El ciclo de vida del adenovirus no requiere de la
5 integración en el genoma de la célula huésped. Los genes extraños suministrados por los vectores de adenovirus son episomales, y por consiguiente, tienen una baja genotoxicidad para las células huésped. No se han reportado efectos secundarios en los estudios de vacunación con adenovirus de tipo silvestre (Couch y
10 colaboradores, 1963; Top y colaboradores, 1971), demostrando su seguridad y su potencial terapéutico como vectores de transferencia genética *in vivo*.

Los vectores de adenovirus se han utilizado en la expresión de genes eucarióticos (Levrero y colaboradores, 1991; Gomez-Foix y
15 colaboradores, 1992), y el desarrollo de vacunas (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1992). Recientemente, estudios con animales sugirieron que se podría utilizar el adenovirus recombinante para la terapia genética (Stratford-Perricaudet y
Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet y colaboradores, 1990; Rich
20 y colaboradores, 1993). Los estudios en la administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen instilación en la traquea (Rosenfeld y colaboradores, 1991; Rosenfeld y
colaboradores, 1992), inyección muscular (Ragot y colaboradores, 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993), e
25 inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle y

colaboradores, 1993).

Los vectores de adenovirus se pueden originar a partir de adenovirus humanos. De una manera alternativa, se pueden originar a partir de adenovirus de otras especies, por ejemplo de chimpancé, que pueden tener la ventaja de que los vectores virales no se neutralizan por los anticuerpos contra los adenovirus humanos que circulan en muchos sujetos humanos (véase, por ejemplo, Tatsis N. y colaboradores *Gene Therapy* 2006 13: 421-429).

El adenovirus tipo 35, el cual es relativamente poco común, y por consiguiente hay bajos niveles de inmunidad previamente existente para el vector mismo, se ha utilizado como un sistema de suministro en ciertas vacunas de tuberculosis que se están desarrollando (véase, por ejemplo, Radosevic y colaboradores, *Infection and Immunity* 2007 75(8): 4105-4115). El adenovirus tipo 35 también puede ser de un valor particular en la presente invención como un vector de suministro.

2. Retrovirus

Los retrovirus son un grupo de virus de ARN de una sola cadena caracterizados por una capacidad para convertir su ARN en ADN de doble cadena en las células infectadas mediante un proceso de transcripción inversa (Coffin, 1990). Entonces el ADN resultante se integra establemente en los cromosomas celulares como un provirus, y dirige la síntesis de las proteínas virales. La integración da como resultado la integración de las secuencias genéticas virales en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retroviral

contiene tres genes, gag, pol, y env, que codifican para las proteínas de capsida, la enzima polimerasa, y los componentes de envoltura, respectivamente. Una secuencia que se encuentra corriente arriba desde el gen gag, contiene una señal para empacar el genoma en viriones. Hay dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) presentes en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Éstas contienen fuertes secuencias promotoras y potenciadoras, y también se requieren para la integración en el genoma de la célula huésped (Coffin, 1990).

10 Con el objeto de construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico que codifique una o más secuencias de oligonucleótidos o de polinucleótidos de interés, en el genoma viral, en el lugar de ciertas secuencias virales, para producir un virus que sea defectuoso en réplica. Con el objeto de producir viriones, se construye una línea celular de empaque que contenga a los genes gag, pol, y env, pero sin la región terminal larga y los componentes de empaque (Mann y colaboradores, 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contenga un ADNc, junto con la región germinal larga retroviral y las secuencias de empaque, en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia de empaque permite que la transcripción del ARN del plásmido recombinante se empaque en las partículas virales, las cuales luego son secretadas hacia el medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann y colaboradores, 1983).

25 Entonces se recolecta el medio que contiene los retrovirus

recombinantes, opcionalmente se concentra, y se utiliza para la transferencia genética. Los vectores retrovirales son capaces de infectar a una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren de la división de las
5 células huésped (Paskind y colaboradores, 1975).

Recientemente se desarrolló un planteamiento novedoso diseñado para permitir la dirección específica de los vectores de retrovirus, basado en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de residuos de lactosa a la envoltura
10 viral. Esta modificación podría permitir la infección específica de los hepatocitos por medio de los receptores de sialoglicoproteína.

Se diseñó un planteamiento diferente para dirigir los retrovirus recombinantes, en donde se utilizaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de envoltura retroviral y contra un receptor celular
15 específico. Los anticuerpos se acoplaron por medio de los componentes de biotina, utilizando estreptavidina (Roux y colaboradores, 1989). Utilizando los anticuerpos contra los antígenos del complejo de histocompatibilidad mayor clase I y clase II, demostraron la infección de una variedad de células humanas que
20 perforan estos antígenos superficiales con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux y colaboradores, 1989).

3. **Virus Adeno-Asociados**

AAV (Ridgeway, 1988; Hermonat y Muzycska, 1984) es un parvovirus, descubierto como una contaminación de los suministros
25 adenovirales. Es un virus ubicuo (los anticuerpos están presentes

132

en el 85 por ciento de la población humana de los Estados Unidos) que no se ha vinculado con ninguna enfermedad. También se clasifica como un dependovirus, debido a que su réplica depende de la presencia de un virus auxiliar, tal como adenovirus. Se han aislado
5 cinco serotipos, de los cuales el AAV-2 es el mejor caracterizado. AAV tiene un ADN lineal de una sola cadena que se encapsida en las proteínas de capsida VP1, VP2, y VP3, para formar un virión icosaédrico de 20 a 24 nanómetros de diámetro (Muzyczka y McLaughlin, 1988).

10 El ADN de AAV es de aproximadamente 4.7 kilobases de largo. Contiene dos marcos de lectura abierta, y está flanqueado por dos ITRs. Existen dos genes principales en el genoma AAV: *rep* y *cap*. El gen *rep* codifica para las proteínas responsables de las réplicas virales, mientras que *cap* codifica para la proteína de capsida VP1-3.
15 Cada ITR forma una estructura de horquilla en forma de T. Estas repeticiones terminales son los únicos componentes *cis* esenciales del AAV para la integración cromosómica. Por consiguiente, el AAV se puede utilizar como un vector con todas las secuencias de codificación viral removidas y reemplazadas por el casete de genes
20 para el suministro. Se han identificado tres promotores virales, y se denominan como p5, p19, y p40, de acuerdo con su posición en el mapa. La transcripción desde p5 y p19 da como resultado la producción de las proteínas *rep*, y la transcripción desde p40 produce las proteínas de capsida (Hermonat y Muzyczka, 1984).

25 Existen varios factores que hicieron que los investigadores

estudiaran la posibilidad de utilizar rAAV como un vector de expresión. Uno es que los requerimientos para suministrar un gen con el fin de integrarlo en el cromosoma huésped son sorprendentemente pocos. Es necesario tener las ITRs de 145 pares de bases, que son solamente el 6 por ciento del genoma de AAV. Esto deja espacio en el vector para ensamblar una inserción de ADN de 4.5 kb. Aunque esta capacidad portadora puede impedir que el AAV suministre genes grandes, es ampliamente adecuada para suministrar construcciones anti-sentido.

AAV también es una buena elección de vehículos de suministro debido a su seguridad. Hay un mecanismo de rescate relativamente complicado: no solamente el adenovirus de tipo silvestre sino también los genes AAV son requeridos para movilizar rAAV. De la misma manera, AAV no es patógeno y no está asociado con ninguna enfermedad. La remoción de las secuencias de codificación viral minimiza las reacciones inmunes a la expresión del gen viral, y por consiguiente, rAAV no provoca una respuesta inflamatoria.

4. Otros Vectores Virales como Construcciones de Expresión

Se pueden emplear otros vectores de virales como construcciones de expresión en la presente invención para el suministro de secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos a una célula huésped. Se pueden emplear vectores derivados a partir de virus tales como virus de vacuna (Ridgeway, 1988; Coupar y colaboradores, 1988), lentivirus, virus de polio, y virus de herpes. Se puede esperar que sean útiles otros vectores derivados de poxvirus,

tales como los vectores derivados de erupción de aves de corral. Éstos ofrecen varias características atractivas para diferentes células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Coupar y colaboradores, 1988; Horwich y colaboradores, 1990).

5 Con el reciente reconocimiento de los virus de hepatitis B defectuosos, se ganó una nueva perspectiva sobre la relación de estructura-función de diferentes secuencias virales. Los estudios *in vitro* mostraron que el virus podría retener la capacidad para el empaque dependiente del auxiliar y la transcripción inversa, a pesar
10 de la supresión de hasta el 80 por ciento de su genoma (Horwich y colaboradores, 1990). Esto sugirió que grandes porciones del genoma podrían ser reemplazadas con el material genético extraño. El hepatotropismo y la persistencia (integración) fueron propiedades particularmente atractivas para la transferencia del gen dirigida al
15 hígado. Chang y colaboradores (1991) introdujeron el gen de acetil-transferasa de cloranfenicol (CAT) en el genoma del virus de hepatitis B de pato en lugar de las secuencias de codificación de polimerasa, superficiales, y pre-superficiales. Se co-transfectó con el virus de tipo silvestre en una línea celular de hepatoma de aves. Se
20 utilizaron medios de cultivo conteniendo altas titulaciones del virus recombinante para infectar los hepatocitos de pato primarios. La expresión del gen CAT estable se detectó durante cuando menos 24 días después de la transfección (Chang y colaboradores, 1991).

Los vectores "virales" adicionales incluyen las partículas tipo
25 virus (VLPs) y los fagos.

5. Vectores No Virales.

Con el objeto de efectuar la expresión de las secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente invención, se debe suministrar la construcción de expresión a una célula. Este suministro se puede llevar a cabo *in vitro*, como en los procedimientos de laboratorio para transformar líneas celulares, o *in vivo* o *ex vivo*, como en el tratamiento de ciertos estados de enfermedad. Como se describe anteriormente, un mecanismo preferido para el suministro es mediante infección viral, en donde la construcción de expresión se encapsula en una partícula viral infecciosa.

Una vez que se ha suministrado la construcción de expresión a la célula, se puede colocar el ácido nucleico que codifica las secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos deseadas, y se expresa en diferentes sitios. En ciertas modalidades, el ácido nucleico que codifica la construcción se puede integrar establemente en el genoma de la célula. Esta integración puede estar en la localización y orientación específicas mediante recombinación homóloga (reemplazo de genes), o se puede integrar en una localización no específica aleatoria (aumento de genes). En todavía otras modalidades, el ácido nucleico se puede mantener establemente en la célula como un segmento episomal separado de ADN. Estos segmentos de ácidos nucleicos o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la réplica, independientemente de, o en sincronización con, el ciclo de la célula

huésped. La manera en que se suministra la construcción de expresión a una célula, y en dónde permanece el ácido nucleico en la célula, dependen del tipo de construcción de expresión empleada.

En ciertas modalidades de la invención, la construcción de expresión que comprenda una o más secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos puede simplemente consistir en ADN recombinante desnudo o en plásmidos. La transferencia de la construcción se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante cualquier método que permeabilice físicamente o químicamente la membrana celular. Esto es particularmente aplicable para la transferencia *in vitro*, pero se puede aplicar también al uso *in vivo*. Dubensky y colaboradores (1984) inyectaron con éxito ADN de poliomavirus en la forma de precipitados en fosfato de calcio en hígado y bazo de ratones adultos y recién nacidos, demostrando la réplica viral activa y una infección aguda. Benvenisty y Reshef (1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de plásmidos precipitados con fosfato de calcio, da como resultado la expresión de los genes transfectados. Se prevé que el ADN que codifique un gen de interés también se puede transferir de una manera similar *in vivo*, y expresar el producto genético.

Otra modalidad de la invención para transferir una construcción de expresión de ADN desnudo a las células puede involucrar el bombardeo de partículas. Este método depende de la capacidad para acelerar los microproyectiles recubiertos con ADN hasta una alta velocidad, permitiéndoles perforar las membranas celulares y entrar

a las células sin matarlas (Klein y colaboradores, 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de estos dispositivos se apoya en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, la cual a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang y colaboradores, 1990). Los microproyectiles utilizados han consistido en sustancias biológicamente inertes, tales como perlas de tungsteno o de oro.

Los órganos seleccionados, incluyendo hígado, piel, y tejido muscular de ratas y ratones, han sido bombardeados *in vivo* (Yang y colaboradores, 1990; Zelenin y colaboradores, 1991). Esto puede requerir de la exposición quirúrgica del tejido o de las células, para eliminar cualquier tejido que intervenga entre la pistola y el órgano objetivo, es decir, el tratamiento *ex vivo*. Nuevamente, se puede suministrar ADN que codifique un gen particular mediante este método, y todavía se puede incorporar.

También se pueden utilizar bacterias como un método de suministro (por ejemplo, listeria, véase la Publicación Internacional Número WO2004/11048) y en particular BCG.

COMPOSICIONES DE POLIPÉPTIDOS

En general, un polipéptido útil en la invención será un polipéptido aislado (es decir, separado de aquellos componentes con los que se pueda encontrar usualmente en la naturaleza).

Por ejemplo, una proteína que se presenta naturalmente se aísla si se separa de algunos o de todos los materiales co-existentes en el sistema natural. De preferencia, estos polipéptidos son cuando

menos aproximadamente el 90 por ciento puros, más preferiblemente cuando menos aproximadamente el 95 por ciento puros, y de una manera muy preferible cuando menos aproximadamente el 99 por ciento puros. Se considera que un polinucleótido está aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no sea una parte del medio ambiente natural.

Los polipéptidos se pueden preparar empleando cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas. Los polipéptidos recombinantes codificados por secuencias de ADN, como se describen anteriormente, se pueden preparar fácilmente a partir de las secuencias de ADN empleando cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos por los expertos ordinarios en la materia. La expresión se puede lograr en cualquier célula huésped apropiado que se haya transformado o transfectado con un vector de expresión que contenga una molécula de ADN que codifique un polipéptido recombinante. Las células huésped adecuadas incluyen células de procariotes, de levadura, y de eucariotes superiores, tales como células de mamífero y células de plantas. De preferencia, las células huésped empleadas son las líneas celulares de *E. coli*, de levadura, o de mamífero, tales como COS ó CHO. Los sobrenadantes de los sistemas de huésped/vector adecuados que secreten la proteína o el polipéptido recombinante en el medio de cultivo, se pueden concentrar primeramente utilizando un filtro comercialmente disponible. En seguida de la concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada, tal como una matriz

de afinidad o una resina de intercambio de iones. Finalmente, se pueden emplear uno o más pasos de HPLC en fase inversa para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante.

Los polipéptidos de la invención, los fragmentos inmunogénicos de los mismos, y otras variantes que tengan menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y en general menos de aproximadamente 50 aminoácidos, también se pueden generar por medios sintéticos, empleando técnicas bien conocidas por los expertos ordinarios en este campo. Por ejemplo, estos polipéptidos se pueden sintetizar empleando cualquiera de las técnicas en fase sólida comercialmente disponibles, tales como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, en donde se agregan en secuencia los aminoácidos a una cadena de aminoácidos creciente. Véase Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146 (1963). El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está comercialmente disponible con proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), y se puede operar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dentro de ciertas modalidades específicas, un polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprenda múltiples polipéptidos, como se describe en la presente, o que comprenda cuando menos un polipéptido como se describe en la presente, y una secuencia no relacionada. Los ejemplos de estas proteínas incluyen las proteínas de tétanos, tuberculosis, y hepatitis (véase, por ejemplo, Stoute y colaboradores, *New Engl. J. Med.* 336: 86-91

(1997)). Un componente de fusión, por ejemplo, puede asistir para proporcionar epítopos auxiliares-T (un componente de fusión inmunológico), de preferencia los epítopos auxiliares-T reconocidos por los seres humanos, o puede asistir en la expresión de la proteína (un potenciador de expresión) en rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Ciertos componentes de fusión preferidos son componentes de fusión tanto inmunológicos como potenciadores de la expresión. Se pueden seleccionar otros componentes de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína, o para hacer posible que se dirija la proteína hacia los compartimientos intracelulares deseados. Todavía además, los componentes de fusión incluyen marcos de afinidad, que facilitan la purificación de la proteína.

Las proteínas de fusión se pueden preparar en general empleando técnicas convencionales, incluyendo conjugación química. De preferencia, una proteína de fusión se expresa como una proteína recombinante, permitiendo la producción de mayores niveles, en relación con una proteína no fusionada, en un sistema de expresión. Dicho de una manera breve, las secuencias de ADN que codifiquen a los componentes del polipéptido se pueden ensamblar por separado, y se pueden ligar en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifique un componente de polipéptido se liga, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifique el segundo componente de polipéptido, de tal manera que los marcos de lectura de las

secuencias estén en fase. Esto permite la traducción hasta una sola proteína de fusión que retiene la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Se puede emplear una secuencia enlazadora peptídica para
5 separar los primero y segundo componentes de polipéptido por una
distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en
sus estructuras secundarias y terciarias. Esta secuencia enlazadora
peptídica se incorpora en la proteína de fusión empleando técnicas
convencionales bien conocidas en este campo. Las secuencias
10 enlazadoras peptídicas adecuadas se pueden seleccionar basándose
en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una
conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una
estructura secundaria que podría interactuar con los epítopos
funcionales sobre los primero y segundo polipéptidos; y (3) la falta
15 de residuos hidrofóbicos o cargados, que podrían reaccionar con los
epítopos funcionales del polipéptido. Las secuencias enlazadoras
peptídicas preferidas contienen los residuos Gly, Asn, y Ser.
También se pueden utilizar otros aminoácidos casi neutros, tales
como Thr y Ala, en la secuencia enlazadora. Las secuencias de
20 aminoácidos que se pueden emplear útilmente como enlazadoras
incluyen aquéllas que se dan a conocer en Maratea y colaboradores,
Gene 40:39-46 (1985); Murphy y colaboradores, *Proc. Natl. Acad.
Sci. EUA* 83:8258-8262 (1986); Patente de los Estados Unidos de
Norteamérica Número 4,935,233, y Patente de los Estados Unidos de
25 Norteamérica Número 4,751,180. La secuencia enlazadora puede ser

en general de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias enlazadoras no se requieren cuando los primero y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que se pueden utilizar para separar los dominios
5 funcionales y para prevenir la interferencia estérica.

Dentro de las modalidades preferidas, un componente de fusión inmunológico se deriva a partir de la proteína D, una proteína superficial de la bacteria gram-negativa *Haemophilus influenza* B (Publicación Internacional Número WO 91/18926). De preferencia, un
10 derivado de proteína D comprende aproximadamente la primera tercera parte de la proteína (por ejemplo, los primeros 100 a 110 aminoácidos N-terminales), y un derivado de proteína D puede estar liquidado. Dentro de ciertas modalidades preferidas, se incluyen los primeros 109 residuos de un componente de fusión de lipoproteína D
15 en el término N para proporcionar al polipéptido epítomos de células-T exógenos adicionales, y para aumentar el nivel de expresión en *E. coli* (funcionando de esta manera como un potenciador de expresión). La cola del lípido asegura la presentación óptima del antígeno ante las células presentadoras de antígeno. Otros
20 componentes de fusión incluyen la proteína no estructural del virus de influenza, NS1 (hemaglutinina). Típicamente, se utilizan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque se pueden utilizar diferentes fragmentos que incluyan a los epítomos auxiliares-T.

En otra modalidad, el componente de fusión inmunológico es
25 una proteína conocida como LYTA, o una porción de la misma (de

preferencia una porción C-terminal). LYTA se deriva a partir de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una amidasa de N-acetil-L-alanina conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; *Gene* 43:265-292 (1986)). LYTA es una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en la estructura base del peptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad con la colina, o con algunos análogos de colina, tales como DEAE. Esta propiedad se ha explotado para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de *E. coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. La purificación de las proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el término amino ya ha sido descrita (véase *Biotechnology* 10:795-798 (1992)). Dentro de una modalidad preferida, se puede incorporar una porción de repetición de LYTA en una proteína de fusión. Una porción de repetición se encuentra en la región C-terminal empezando en el residuo 178. Una porción de repetición particularmente preferida incorpora los residuos 188-305.

CÉLULAS-T.

Las composiciones inmunoterapéuticas también, o alternativamente, pueden comprender células-T específicas para un antígeno de *Mycobacterium*. Estas células se pueden preparar en general *in vitro* o *ex vivo*, empleando procedimientos convencionales. Por ejemplo, las células-T se pueden aislar de la médula ósea, de la sangre periférica, o de una fracción de médula ósea o de sangre periférica de un paciente, utilizando un sistema de separación de

células comercialmente disponible, tal como Sistema Isolex^{MR}, disponible en Nexell Therapeutics, Inc. (Irvine, CA; véase también la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,240,856; la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,215,926; y las Publicaciones Internacionales Números WO 89/06280; WO 91/16116 y WO 92/07243). De una manera alternativa, las células-T se pueden derivar a partir de seres humanos, mamíferos no humanos, líneas celulares, o cultivos relacionados o no relacionados.

10 Las células-T se pueden estimular con un polipéptido de la invención, un polinucleótido que codifique este polipéptido, y/o una célula presentadora de antígeno (APC) que exprese dicho polipéptido. Este estímulo se lleva a cabo bajo condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la generación de las células-T que sean específicas para el polipéptido. De una manera preferible, 15 el polipéptido o el polinucleótido está presente dentro de un vehículo de suministro, tal como una microesfera, para facilitar la generación de células-T específicas.

Las células-T se consideran como específicas para un polipéptido de la invención si las células-T específicamente proliferan, secretan citoquinas, o aniquilan a las células objetivo recubiertas con el polipéptido o que expresen un gen que codifique el polipéptido. La especificidad de las células-T se puede evaluar empleando cualquiera de una variedad de técnicas convencionales. 20 Por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o un 25

ensayo de proliferación, un índice de estímulo de un aumento de más del doble en la lisis y/o proliferación, comparándose con los controles negativos, indica especificidad de las células-T. Estos ensayos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, como se describe en

5 Cheng y colaboradores, *Cancer Res.* 54:1065-1070 (1994). De una manera alternativa, la detección de la proliferación de las células-T se puede llevar a cabo mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede detectar la proliferación de las células-T midiendo un mayor índice de síntesis de ADN (por ejemplo, mediante

10 el mercado por impulsos de cultivos de células-T con timidina tritiada, y midiendo la cantidad de timidina tritiada incorporada en el ADN). El contacto con un polipéptido de la invención (100 nanogramos/mililitro a 100 microgramos/mililitro, de preferencia de 200 nanogramos/mililitro a 25 microgramos/mililitro) durante 3 a 7

15 días, debe dar como resultado un aumento de cuando menos el doble en la proliferación de las células-T. El contacto como se describe anteriormente durante 2 a 3 horas, debe dar como resultado la activación de las células-T medida empleando los ensayos de citoquina convencionales, en donde un aumento del doble en el nivel

20 de liberación de citoquina (por ejemplo, TNF ó IFN- γ) indica la activación de las células-T (véase Coligan y colaboradores, *Current Protocols in Immunology*, Volumen 1 (1998)). Las células-T que se han activado en respuesta a un polipéptido, polinucleótido, o una célula presentadora de antígeno que exprese el polipéptido, pueden

25 ser CD4⁺ y/o CD8⁺. Las células-T específicas de la proteína se

pueden expandir empleando técnicas convencionales. Dentro de las modalidades preferidas, las células-T se derivan a partir de un paciente, un donador relacionado, o un donador no relacionado, y se administran al paciente en seguida del estímulo y la expansión.

- 5 Para propósitos terapéuticos, las células-T CD4+ ó CD8+ que proliferan en respuesta a un polipéptido, polinucleótido, o célula presentadora de antígeno, se pueden expandir en número ya sea *in vitro* o bien *in vivo*. La proliferación de estas células-T *in vitro* se puede llevar a cabo en una variedad de maneras. Por ejemplo, las
- 10 células-T se pueden volver a exponer a un polipéptido, o a un péptido corto correspondiente a una porción inmunogénica de este polipéptido, con o sin la adición de factores de crecimiento de células-T, tales como interleucina-2, y/o células estimulantes que sinteticen un polipéptido. De una manera alternativa, una o más
- 15 células-T que proliferen en la presencia de la proteína, se pueden expandir en número mediante clonación. Los métodos para clonar células son bien conocidos en la técnica, e incluyen la dilución limitante.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- 20 En las modalidades adicionales, las composiciones de polinucleótidos, polipéptidos, células-T, y/o anticuerpos dadas a conocer en la presente, se formularán en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente administrables, para administrarse a una célula o a un animal, ya sea solas, o bien
- 25 en combinación con una o más modalidades diferentes de terapia.

También se entenderá que, si se desea, el segmento de ácido nucleico (por ejemplo, ARN ó ADN) que expresa un polipéptido como se da a conocer en la presente, se puede administrar en combinación con otros agentes también, tales como, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos, o diferentes agentes farmacéuticamente activos, incluyendo agentes quimioterapéuticos efectivos contra una infección por *M. tuberculosis*. De hecho, virtualmente no hay límite para otros componentes que también se puedan incluir, dado que los agentes adicionales no provocan un efecto adverso significativo después de su contacto con las células objetivo o los tejidos del huésped. Por consiguiente, las composiciones se pueden suministrar junto con otros diferentes agentes, como se requieran en la instancia particular. Estas composiciones se pueden purificar a partir de células huésped o de otras fuentes biológicas, o de una manera alternativa, se pueden sintetizar químicamente como se describe en la presente. De la misma manera, estas composiciones pueden comprender además composiciones de ARN ó ADN sustituidas o derivadas.

La formulación de los excipientes y soluciones de vehículo farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la materia, así como el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones particulares descritas en la presente en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, e intramuscular. Otras vías

de administración incluyen por medio de las superficies mucosas.

Típicamente, las formulaciones que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva suministran de aproximadamente 0.1 microgramos a aproximadamente 1000 microgramos del polipéptido por administración, más típicamente de aproximadamente 2.5 microgramos a aproximadamente 100 microgramos del polipéptido por administración. Con respecto a las composiciones de polinucleótidos, éstas típicamente suministran de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 20 miligramos del polinucleótido de la invención por administración, más típicamente de aproximadamente 0.1 miligramos a aproximadamente 10 miligramos del polinucleótido de la invención por administración

Naturalmente, la cantidad de compuestos activos en cada composición terapéuticamente útil se pueden preparar de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, vía de administración, vida de anaquel del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, serán contemplados por un experto en la técnica de la preparación de estas formulaciones farmacéuticas, y como tales, pueden ser deseables una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

1. Suministro Oral.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en la presente se pueden suministrar mediante

administración oral a un animal. Como tales, estas composiciones se pueden formular con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o se pueden comprimir en tabletas, o se pueden
5 incorporar directamente con el alimento de la dieta.

Los compuestos activos inclusive se pueden incorporar con excipientes, y se pueden utilizar en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares Mathiowitz y colaboradores, 1997;
10 Hwang y colaboradores, 1998; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,641,515; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,580,579, y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,792,451, cada uno específicamente incorporado a la presente como referencia en su totalidad). Las
15 tabletas, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares, también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz, o gelatina; excipientes, tales como difosfato de calcio; un agente desintegrante, tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico, y similares; un lubricante, tal como
20 estearato de magnesio; y un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa, o sacarina, o un agente saborizante, tal como menta, aceite de hierbabuena, o saborizante de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, en adición a los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Puede haber otros
25 diferentes materiales presentes como recubrimientos o para

modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas, píldoras, o cápsulas se pueden recubrir con shellac, azúcar, o ambos. Un jarabe de elixir puede contener al compuesto activo con sacarosa como un agente
5 edulcorante, metil- y propil-parabenos como conservadores, un tinte y un saborizante, tal como saborizante de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. En adición,
10 los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Para la administración oral, las composiciones de la presente invención se pueden incorporar de una manera alternativa con uno o más excipientes en la forma de un enjuague bucal, dentífrico, tableta
15 bucal, aerosol oral, o formulación sublingual oralmente administrada. Por ejemplo, un enjuague bucal se puede preparar incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado, tal como una solución de borato de sodio (Solución de Dobell). De una manera alternativa, el ingrediente activo se puede incorporar en
20 una solución oral, tal como una que contenga borato de sodio, glicerina, y bicarbonato de potasio, o se puede dispersar en un dentífrico, o se puede agregar en una cantidad terapéuticamente efectiva a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes saborizantes, agentes espumantes, y
25 humectantes. Alternativamente, las composiciones se pueden

107

configurar en una forma de tableta o de solución, que se puede colocar debajo de la lengua o se puede disolver de otra manera en la boca.

2. Suministro Inyectable.

5 En ciertas circunstancias, será deseable suministrar las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en la presente, parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, intradérmicamente, o inclusive intraperitonealmente, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica
10 Número 5,543,158; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,641,515, y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,399,363 (cada una incorporada específicamente a la presente como referencia en su totalidad). Las soluciones de los compuestos activos como base libre o como sales
15 farmacológicamente aceptables, se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensoactivo, tal como hidroxipropil-celulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas
20 preparaciones contienen un conservador para prevenir el crecimiento de microorganismos.

 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluye soluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o
25 dispersiones inyectables estériles (Patente de los Estados Unidos de

Norteamérica Número 5,466,468, incorporada específicamente a la presente como referencia en su totalidad). En todos los casos, la forma debe ser estéril, y debe ser fluida hasta el grado en que exista una fácil posibilidad de pasarse por jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento, y se debe conservar contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede facilitar mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. Se puede provocar una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que demoren la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe regularse adecuadamente, si es necesario, y el diluyente líquido primeramente se hace isotónico con suficiente

suero o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son en especial adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. En relación con esto, un medio acuoso estéril que se puede emplear será conocido por los expertos en este campo, a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación se puede disolver en 1 mililitro de una solución isotónica de NaCl, y se agrega a 1,000 mililitros de fluido de hipodermocclisis, o se inyecta en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se presentará alguna variación en la dosificación, dependiendo de la condición del sujeto se esté tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Más aún, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben satisfacer las normas de esterilidad, pirogenicidad, y de seguridad y pureza generales requeridas por la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con otros diferentes ingredientes enumerados anteriormente, según se requieran, seguida por esterilización filtrada. En términos generales, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diferentes ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contenga el medio de dispersión básico, y los otros ingredientes requeridos a partir de los

enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y secado por congelación, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada para esterilizarse de los mismos.

Las composiciones dadas a conocer en la presente se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína), y las cuales se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y las bases orgánicas tales como isopropil-amina, trimetil-amina, histidina, procaína, y similares. Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco, y similares.

Como se utiliza en la presente, "vehículo" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos,

diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de demora de absorción, reguladores del pH, soluciones portadoras, suspensiones, coloides, y similares. El uso de estos medios y agentes para las sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la materia. Excepto hasta donde cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos complementarios en las composiciones.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a las entidades moleculares y composiciones que no produzcan una reacción alérgica o similar indeseada cuando se administren a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contenga una proteína como un ingrediente activo es bien entendida en la técnica. Típicamente, estas composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, un líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar.

3. *Suministro Nasal y Bucal.*

En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas se pueden suministrar mediante aerosoles intranasales, aerosoles bucales, inhalación, y/u otros vehículos de suministro en aerosol. Los métodos para suministrar genes, ácidos nucleicos, y composiciones peptídicas directamente a los pulmones, por ejemplo

por medio de rocíos de aerosol nasal y bucal, ya se han descrito, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,756,353 y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,804,212 (cada una específicamente incorporada a la presente como referencia en su totalidad). De la misma manera, el suministro de fármacos utilizando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga y colaboradores, 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,725,871, específicamente incorporada a la presente como referencia en su totalidad), también es bien conocido en la técnica farmacéutica. De la misma manera, el suministro de fármacos transmucosos en la forma de una matriz de soporte de poli-tetra-fluoro-etileno se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,780,045 (específicamente incorporada a la presente como referencia en su totalidad).

4. Suministro Mediado por Liposomas, Nanocápsulas, y Micropartículas.

En ciertas modalidades, los inventores contemplan el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas de lípido, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente invención se pueden formular para suministrarse encapsuladas en una partícula de lípido, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, o bien en una nanopartícula, o similares.

Estas formulaciones se pueden preferir para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos o las construcciones que se dan a conocer en la presente. La formación y uso de liposomas son conocidos en general por los expertos en este campo (véase, por ejemplo, Couvreur y colaboradores, 1977; Couvreur y colaboradores, 1988; Lasic, 1998; que describe el uso de liposomas y nanocápsulas en la terapia con antibióticos dirigidos para infecciones y enfermedades bacterianas intracelulares). Recientemente, se desarrollaron liposomas con una mejor estabilidad en suero y mejores tiempos medios de circulación (Gabizon y Papahadjopoulos, 1988; Allen y Choun, 1987; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,741,516, específicamente incorporada a la presente como referencia en su totalidad). Además, se han revisado diferentes métodos de preparaciones de liposomas y tipo liposomas como vehículos de fármacos potenciales (Takakura, 1998; Chandran y colaboradores, 1997; Margalit, 1995; y Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números U.S. 5,567,434; U.S. 5,552,157; U.S. 5,565,213; U.S. 5,738,868 y U.S. 5,795,587, cada una específicamente incorporada a la presente como referencia en su totalidad).

Los liposomas se han utilizado con éxito con un número de tipos de células que normalmente son resistentes a la transfección mediante otros procedimientos, incluyendo suspensiones de células-T, cultivos de hepatocitos primarios, y células PC 12 (Renneisen y

colaboradores, 1990; Muller y colaboradores, 1990). En adición, los liposomas están libres de las limitaciones de la longitud del ADN que son típicas de los sistemas de suministro basados en virus. Los liposomas se han utilizado efectivamente para introducir genes, fármacos (Heath y Martin, 1986; Heath y colaboradores, 1986; Balazsovits y colaboradores, 1989; Fresta y Puglisi, 1996), agentes radioterapéuticos (Pikul y colaboradores, 1987), enzimas (Imaizumi y colaboradores, 1990a; Imaizumi y colaboradores, 1990b), virus (Faller & Baltimore, 1984), factores de transcripción y efectores aloestéricos (Nicolau y Gersonde, 1979), en una variedad de líneas celulares cultivadas y animales. En adición, se han llevado a cabo varios estudios clínicos de éxito que examinan la efectividad del suministro de fármacos mediado por liposomas (Lopez-Berestein y colaboradores, 1985a; 1985b; Coune, 1988; Sculier y colaboradores, 1988). Adicionalmente, varios estudios sugieren que el uso de liposomas no está asociado con las respuestas autoinmunes, la toxicidad, o la localización gonadal después del suministro sistémico (Mori y Fukatsu, 1992).

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas como vesículas multilamelares (MLVs)). Las vesículas multilamelares generalmente tienen diámetros de 25 nanómetros a 4 micras. La sonicación de las vesículas multilamelares da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUVs) con diámetros

en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Los liposomas tienen un parecido con las membranas celulares, y se contemplan para utilizarse en relación con la presente
5 invención como vehículos para las composiciones peptídicas. Son ampliamente adecuados, debido a que se pueden atrapar tanto las sustancias tanto solubles en agua como solubles en lípido, es decir, en los espacios acuosos y dentro la bicapa misma, respectivamente. Es posible que se pueden emplear inclusive los liposomas que lleven
10 fármacos para el suministro específico del sitio de los agentes activos, mediante la modificación selectiva de la formulación liposomal.

En adición a las enseñanzas de Couvreur y colaboradores (1977; 1988), se puede utilizar la siguiente información para generar
15 formulaciones liposomales. Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras diferentes de los liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la proporción molar del lípido al agua. En bajas proporciones, el liposoma es la estructura preferida. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la
20 concentración iónica, y la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar una baja permeabilidad a las sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas, sufren una transición de fases que altera notoriamente su permeabilidad. La transición de fases involucra un cambio desde una estructura
25 ordenada estrechamente empacada, conocida como el estado de gel,

hasta una estructura menos ordenada, sueltamente empacada, conocida como el estado fluido. Esto ocurre a una temperatura de transición de fases característica, y da como resultado un aumento en la permeabilidad a los iones, a los azúcares, y a los fármacos.

5 En adición a la temperatura, la exposición a las proteínas puede alterar la permeabilidad de los liposomas. Ciertas proteínas solubles, tales como el citocromo C, se enlazan con, deforman, y penetran en la bicapa, causando de esta manera cambios en la permeabilidad. El colesterol inhibe esta penetración de proteínas,
10 aparentemente por el empaque de los fosfolípidos que está más apretado. Se contempla que las formaciones de liposomas más útiles para el suministro de antibióticos e inhibidores, contendrán colesterol.

 La capacidad para atrapar solutos varía entre diferentes tipos
15 de liposomas. Por ejemplo, las vesículas multilamelares son moderadamente eficientes para atrapar solutos, pero las vesículas unilamelares pequeñas son extremadamente ineficientes. Las vesículas unilamelares pequeñas ofrecen la ventaja de la homogeneidad y reproducibilidad en la distribución de tamaños; sin
20 embargo, las vesículas unilamelares grandes ofrecen un compromiso entre el tamaño y la eficiencia de atrape (LUVs). Éstas se preparan mediante evaporación de éter, y son de tres a cuatro veces más eficientes para atrapar el soluto que las vesículas multilamelares (MLVs).

25 En adición a las características de los liposomas, un

determinante importante en el atrape de compuestos es el de las propiedades fisicoquímicas del compuesto mismo. Los compuestos polares se atrapan en los espacios acuosos, y los compuestos no polares se enlazan con la bicapa de lípido de la vesícula. Los compuestos polares se liberan a través de la permeación o cuando se rompe la bicapa, pero los compuestos no polares permanecen afiliados con la bicapa, a menos que sea alterada por la temperatura o la exposición a las lipoproteínas. Ambos tipos muestran máximos índices de eflujo a la temperatura de transición de fases.

Los liposomas interactúan con las células por medio de cuatro mecanismos diferentes: endocitosis por parte de las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, tales como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, ya sea mediante las fuerzas hidrofóbicas o electrostáticas débiles no específicas, o bien mediante interacciones específicas con los componentes de superficie celular; fusión con la membrana celular de plasma mediante la inserción de la bicapa de lípido del liposoma en la membrana de plasma, con la liberación simultánea del contenido liposomal hacia el citoplasma; y mediante transferencia de los lípidos liposomales hacia las membranas celulares o subcelulares, o *viceversa*, sin asociación alguna del contenido del liposoma. Con frecuencia es difícil determinar cuál mecanismo es operativo, y más de uno pueden operar al mismo tiempo.

El destino y la disposición de los liposomas intravenosamente inyectados dependen de sus propiedades físicas, tales como su

tamaño, fluidez, y carga superficial. Pueden persistir en los tejidos durante horas o días, dependiendo de su composición, y las vidas medias en la sangre están en el intervalo desde minutos hasta varias horas. Los liposomas más grandes, tales como las vesículas multilamelares y las vesículas unilamelares grandes, son rápidos
5 absorbidos por las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, pero la fisiología del sistema circulatorio restringe la salida de estas especies grandes en la mayoría de los sitios. Pueden salir solamente en los lugares en donde existan grandes aberturas o poros en el
10 endotelio capilar, tal como los senos del hígado o del bazo. Por consiguiente, estos órganos son el sitio predominante de absorción. Por otra parte, las vesículas unilamelares pequeñas muestran una distribución de tejido más amplia, pero todavía son altamente secuestradas en el hígado y el bazo. En general, este
15 comportamiento *in vivo* limita la dirección potencial de los liposomas hacia solamente los órganos y tejidos accesibles para su gran tamaño. Éstos incluyen la sangre, el hígado, el bazo, la médula ósea, y los órganos linfoides.

La dirección en general no es una limitación en términos de la
20 presente invención. Sin embargo, si se desea una dirección específica, existen métodos disponibles para que esto se lleve a cabo. Se pueden utilizar anticuerpos para enlazarse con la superficie del liposoma, y para dirigir el anticuerpo y su contenido de fármaco hacia los receptores antigénicos específicos localizados sobre una
25 superficie de tipo celular particular. También se pueden utilizar

determinantes de carbohidratos (componentes de superficie celular de glicoproteína o glicolípido que tiene un papel en el reconocimiento, interacción, y adhesión de célula-célula) como sitios de reconocimiento, debido a que tienen el potencial para dirigir los liposomas hacia tipos particulares de células. En su mayor parte, se contempla que se utilizaría inyección intravenosa de las preparaciones liposomales, pero también son concebibles otras vías de administración.

De una manera alternativa, la invención proporciona formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas pueden atrapar en general los compuestos de una manera estable y reproducible (Henry-Michelland y colaboradores, 1987; Quintanar-Guerrero y colaboradores, 1998; Douglas y colaboradores, 1987). Para evitar los efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, estas partículas ultrafinas (de un tamaño de alrededor de 0.1 micras) deben diseñarse utilizando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas de poli-alquilcianoacrilato biodegradables que satisfacen estos requerimientos son contempladas para utilizarse en la presente invención. Estas partículas se pueden hacer fácilmente como se describe (Couvreur y colaboradores, 1980; 1988; zur Muhlen y colaboradores, 1998; Zambaux y colaboradores, 1998; Pinto-Alphandry y colaboradores, 1995, y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,145,684, específicamente incorporados a la presente como

referencia en su totalidad).

También se pueden utilizar parches para la piel, para el suministro transcutáneo.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

5 En ciertas modalidades preferidas de la presente invención, se proporcionan composiciones inmunogénicas. Las composiciones inmunogénicas comprenderán en términos generales uno o más polipéptidos o polinucleótidos, tales como aquéllos discutidos anteriormente, en combinación con un inmunoestimulante. Un
10 inmunoestimulante puede ser cualquier sustancia que mejore o potencie una respuesta inmunitaria (mediada por anticuerpo y/o por células) a un antígeno exógeno. Los ejemplos de los inmunoestimulantes incluyen adyuvantes, microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica), y liposomas (en los cuales se
15 incorpora el compuesto; véase, por ejemplo, Fullerton, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,235,877).

La preparación de las composiciones inmunogénicas se describe en general, por ejemplo, en Powell y Newman, editores, *Vaccine Design* (el planteamiento de la subunidad y adyuvante)
20 (1995). Las composiciones farmacéuticas y las composiciones inmunogénicas dentro del alcance de la presente invención también pueden contener otros compuestos, los cuales pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, puede haber una o más porciones inmunogénicas de otros antígenos de *M. tuberculosis*
25 presentes, ya sea incorporados en un polipéptido de fusión, o bien

como un compuesto separado, dentro de la composición farmacéutica o inmunogénica.

Las composiciones inmunogénicas ilustrativas pueden contener un polinucleótido (por ejemplo, ADN) que codifique uno o más de los polipéptidos, como se describe anteriormente, de tal manera que el polipéptido se genere *in situ* (provocando de esta manera una respuesta inmunitaria). Como se observa anteriormente, el ADN puede estar presente dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de suministro conocidos por los expertos ordinarios en la materia, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, bacterias, y sistemas de expresión viral. En este campo se conocen numerosas técnicas de suministro de genes, tales como las descritas por Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15: 143-198 (1998), y las referencias citadas en el mismo. Los sistemas de expresión de ácido nucleico apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para la expresión en el paciente (tal como una señal promotora y terminadora adecuada). Los sistemas de suministro bacteriano involucran la administración de una célula huésped bacteriana (por ejemplo, una cepa de *Mycobacterium*, *Bacillus* ó *Lactobacillus*, incluyendo *Bacillus Calmette-Guerin* ó *Lactococcus lactis*), que exprese el polipéptido (por ejemplo, sobre su superficie celular, o que secrete el polipéptido) (véase, por ejemplo, Ferreira y colaboradores, *An Acad. Bras. Cienc.* (2005) 77:113-124; y Raha y colaboradores, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2005) PubMedID 15635459). En una modalidad preferida, el ADN se puede introducir

utilizando un sistema de expresión viral (por ejemplo, una vacuna u otro poxvirus, retrovirus, o adenovirus), el cual puede involucrar el uso de un virus no patogénico (defectuoso), competente en réplica. Los sistemas adecuados se dan a conocer, por ejemplo, en Fisher-
5 Hoch y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86: 317-321 (1989); Flexner y colaboradores, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 569: 86-103 (1989); Flexner y colaboradores, *Vaccine* 8: 17-21 (1990); Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,603,112, 4,769,330, y 5,017,487; Publicación Internacional Número WO
10 89/01973; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,777,127; Patente Británica Número GB 2,200,651; Patente Europea Número EP 0,345,242; Publicación Internacional Número WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6: 616-627 (1988); Rosenfeld y colaboradores, *Science* 252: 431-434 (1991); Kolls y colaboradores,
15 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 91: 215-219 (1994); Kass-Eisler y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90: 11498-11502 (1993); Guzman y colaboradores, *Circulation* 88: 2838-2848 (1993); y Guzman y colaboradores, *Cir. Res.* 73: 1202-1207 (1993). Las técnicas para incorporar el ADN en estos sistemas de expresión son
20 bien conocidas por los expertos ordinarios en este campo. El ADN también puede estar "desnudo", como se describe, por ejemplo, en Ulmer y colaboradores, *Science* 259: 1745-1749 (1993), y como es revisado por Cohen, *Science* 259: 1691-1692 (1993). La absorción del ADN desnudo se puede aumentar recubriendo el ADN sobre
25 perlas biodegradables, las cuales se transportan eficientemente

hacia dentro de las células. Será evidente que una composición inmunogénica puede comprender tanto un componente de polinucleótido como de polipéptido. Esta composición inmunogénica puede proporcionar una mejor respuesta inmunitaria.

- 5 Será evidente que una composición inmunogénica puede contener sales farmacéuticamente aceptables de los polinucleótidos y polipéptidos proporcionados en la presente. Estas sales se pueden preparar a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases orgánicas (por ejemplo, sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, y aminoácidos básicos), y bases
10 inorgánicas (por ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, y magnesio).

- Aunque se puede emplear cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos ordinarios en la técnica, en las
15 composiciones inmunogénicas de esta invención, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Las composiciones de la presente invención se pueden formular para cualquier modo de administración apropiado, incluyendo, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. Para la administración parenteral, tal
20 como inyección subcutánea, el vehículo de preferencia comprende agua, suero, alcohol, una grasa, una cera, o un regulador. Para la administración oral, se puede emplear cualquiera de los vehículos anteriores, o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón,
25 estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa,

sacarosa, y carbonato de magnesio. También se pueden emplear microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato-poliglicolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Las microesferas biodegradables adecuadas se dan a
5 conocer, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344 y 5,942,252. También se puede emplear un vehículo que comprenda los complejos de partículas-proteína descritos en la Patente de los Estados Unidos de
10 Norteamérica Número 5,928,647, los cuales son capaces de inducir una respuesta de linfocitos-T citotóxica restringida a la clase I en un huésped.

Estas composiciones también pueden comprender reguladores del pH (por ejemplo, suero regulado neutro o suero regulado con
15 fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa, o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatona, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio), solutos que hagan a la formulación isotónica, hipotónica, o
20 débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes, y/o conservadores. De una manera alternativa, las composiciones de la presente invención se pueden formular como un liofilizado. Los compuestos también se pueden encapsular dentro de liposomas empleando la tecnología bien
25 conocida.

Se puede emplear cualquiera de una variedad de inmunoestimulantes en las composiciones inmunogénicas de esta invención. Por ejemplo, se puede incluir un adyuvante. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger al antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulante de las respuestas inmunes, tal como lípido A, las especies de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium*, o proteínas derivadas a partir de *M. tuberculosis*. Por ejemplo, se puede utilizar *M. vaccae* ("pVac") desglicolipidada, deslipidada. Los adyuvantes adecuados están comercialmente disponibles, por ejemplo, como Adyuvante Incompleto y Adyuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI); Adyuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS01B, AS02A, AS15, AS-2, y sus derivados (GlaxoSmithKline, Filadelfia, PA); CWS (esqueleto de la pared celular de un bacilo de tubérculo), TDM (dicorinomicolato de trehalosa), Leif (factor de inicio de elongación de *Leishmania*), sales de aluminio, tales como gel de hidróxido de aluminio (alum), o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro, o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos catiónicamente o aniónicamente derivados; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil-lípido A (MPL®), y quil A (por ejemplo, QS-21). También se pueden utilizar como adyuvantes las citoquinas, tales como GM-CSF o interleucina-2, -7, ó -12.

Un adyuvante se refiere a los componentes de una vacuna o composición terapéutica que aumentan la respuesta inmunitaria

específica al antígeno (véase, por ejemplo, Edelman, *AIDS Res. Hum Retroviruses* 8: 1409-1411 (1992)). Los adyuvantes inducen las respuestas inmunitarias del tipo Th1 y del tipo Th-2. Las citoquinas tipo Th1 (por ejemplo, IFN- γ , IL-2, e IL-12) tienden a favorecer la inducción de la respuesta inmunitaria mediada por células a un antígeno administrado, mientras que las citoquinas tipo Th-2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunitarias humores. Los adyuvantes capaces de tener una estimulación preferencial de una respuesta inmunitaria mediada por células Th-1 se describen en las Publicaciones Internacionales Números WO 94/00153 y WO 95/17209.

Dentro de las composiciones inmunogénicas proporcionadas en la presente, la composición adyuvante de preferencia se diseña con el objeto de inducir una respuesta inmunitaria predominantemente del tipo Th1. En seguida de la aplicación de una composición inmunogénica, como se proporciona en la presente, un paciente típicamente soportará una respuesta inmunitaria que incluya respuestas tipo Th1 y tipo Th2. Dentro de una modalidad preferida, cuando una respuesta es predominantemente del tipo Th1, el nivel de citoquinas tipo Th1 aumentará hasta un mayor grado que el nivel de citoquinas tipo Th2. Los niveles de estas citoquinas se pueden evaluar fácilmente empleando los ensayos convencionales. Para una revisión de las familias de citoquinas, véase Janeway y colaboradores, *Immunobiology*, 5a. Edición, 2001.

Las composiciones de Rv3616c usualmente comprenden uno o

más adyuvantes, por ejemplo, AS01B (monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL®), y QS21 en una formulación de liposomas; véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2003/0143240); AS02A (3D-MPL® y QS21, y una emulsión de aceite en agua; véase Bojang y colaboradores, *Lancet* (2001) 358: 1927); ENHANZYN® (Detox); 3D-MPL®; saponinas, incluyendo Quil A y sus componentes, por ejemplo, QS21 y miméticos de saponina; CWS (el esqueleto de la pared celular a partir de un bacilo de tubérculo); TDM (dicorinomicolato de trehalosa); 4-fosfatos de amino-alkil-glucosaminida (AGPs); oligonucleopéptidos inmunoestimulantes, por ejemplo, CPG; Leif (factor de inicio de elongación de *Leishmania*); y derivados de los mismos. En una modalidad preferida, se administra un polipéptido de Rv3616c con uno o más adyuvantes seleccionados a partir del grupo que consiste en 3D-MPL® y QS21 en una formulación de liposomas, por ejemplo, AS01B y 3D-MPL® y QS21, y una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, AS02A). Los sistemas adyuvantes AS01B y AS02A se describen adicionalmente en Pichyangkul y colaboradores, *Vaccine* (2004) 22: 3831-40.

Cuando se suministra el antígeno Rv3616c como un ácido nucleico, se puede suministrar, por ejemplo, en un vector viral (es decir, un vector de adenovirus), o en una célula huésped de bacteria mutante (es decir, una célula huésped mutante, avirulenta, de *Mycobacterium*, *Lactobacillus* o *Bacillus*, incluyendo *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), y *Lactococcus lactis*).

Los adyuvantes preferidos para utilizarse en la provocación de una respuesta predominantemente tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil-lípido A (MPL®), de preferencia monofosforil-lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL®), opcionalmente con una sal de aluminio (véase, por ejemplo, Ribí y colaboradores, 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, páginas 407-419; Patentes Británicas Números GB 2122204B y GB 2220211; y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,912,094). Una forma preferida de 3D-MPL® está en la forma de una emulsión que tiene un tamaño de partículas pequeño menor de 0.2 milímetros de diámetro, y su método de elaboración se da a conocer en la Publicación Internacional Número WO 94/21292. Se han descrito formulaciones acuosas que comprenden monofosforil-lípido A y un tensoactivo, en la Publicación Internacional Número WO 98/43670. Los adyuvantes preferidos ejemplificados incluyen AS01B (MPL® y QS21 en una formulación de liposomas), 3D-MPL® y QS21 en una formulación de liposomas, AS02A (MPL® y QS21, y una emulsión de aceite en agua), 3D-MPL® y QS21, y una emulsión de aceite en agua, y AS15, disponible en GlaxoSmithKline. Los adyuvantes MPL® están disponibles en GlaxoSmithKline (véanse las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094).

Los oligonucleótidos que contienen CpG (en donde el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta

predominantemente Th1. CpG es una abreviatura para los motivos de los dinucleótidos de citosina-guanosina presentes en el ADN. Estos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en las Publicaciones Internacionales Números WO 96/02555 y WO 99/33488, y en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 6,008,200 y 5,856,462. También se describen secuencias de ADN inmunoestimulantes, por ejemplo, por Sato y colaboradores, *Science* 273: 352 (1996). CpG, cuando se formula en composiciones inmunogénicas, se administra en general en solución libre junto con el antígeno libre (Publicación Internacional Número WO96/02555; McCluskie y Davis, *supra*), o covalentemente conjugado con un antígeno (Publicación Internacional Número WO 98/16247), o se formula con un vehículo, tal como hidróxido de aluminio ((antígeno superficial de hepatitis), Davis y colaboradores, *supra*; Brazolot-Millan y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 1998, 95(26), 15553-8). CpG se conoce en la técnica como un adyuvante que se puede administrar tanto mediante la vía sistémica como mucosa (Publicación Internacional Número WO 96/02555, Patente Europea Número EP 468520, Davis y colaboradores, *J. Immunol.*, 1998, 160(2): 870-876; McCluskie y Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161(9): 4463-6).

Otro adyuvante preferido es una saponina o miméticos o derivados de saponina, tales como Quil A, de preferencia QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), que se puede utilizar sola o en combinación con otros adyuvantes. Por ejemplo, un

sistema mejorado involucra la combinación de un monofosforil-lípido A (MPL®) y un derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 94/00153, o una composición menos reactogénica, en donde el QS21 se apaga con colesterol, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 96/33739. Otras formulaciones preferidas comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Una formulación de adyuvante particularmente potente que involucra QS21, 3D-MPL®, y tocoferol en una emulsión de aceite en agua, se describe en la Publicación Internacional Número WO 95/17210. Los adyuvantes de saponina adicionales útiles en la presente invención incluyen QS7 (descrito en las Publicaciones Internacionales Números WO 96/33739 y WO 96/11711) y QS17 (descrito en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,057,540 y en la Patente Europea Número EP 0,362,279 B1).

De una manera alternativa, las formulaciones de saponina se pueden combinar con vehículos de vacuna compuestos de quitosano u otros polímeros policatiónicos, partículas de poliláctido y de poliláctido-co-glicólido, matriz de polímero basada en poli-N-acetilglucosamina, partículas compuestas de polisacáridos o de polisacáridos químicamente modificados, partículas basadas en liposomas y el lípidos, partículas compuestas de monoésteres de glicerol, etc. Las saponinas también se pueden formular en la presencia de colesterol para formar estructuras en partículas, tales como liposomas o ISCOM®s. Adicionalmente, las saponinas se

pueden formular junto con un éter o éster de polioxi-etileno, ya sea en una solución o suspensión que no esté en partículas, o bien en una estructura en partículas, tal como un liposoma paucilamelar o ISCOM®. Las saponinas también se pueden formular con excipientes, tales como CARBOPOL®, para aumentar la viscosidad, o se pueden formular en una forma de polvo seco con un excipiente en polvo, tal como lactosa.

En una modalidad, el sistema adyuvante incluye la combinación de a monofosforil-lípido A y un derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y adyuvante 3D-MPL®, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 94/00153, o una composición menos reactogénica, en donde el QS21 se apaga con liposomas que contienen colesterol, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 96/33739. Otras formulaciones adecuadas comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Otra formulación de adyuvante adecuada que emplea QS21, adyuvante 3D-MPL® y tocoferol en una emulsión de aceite en agua, se describe en la Publicación Internacional Número WO 95/17210.

Otro sistema de adyuvante mejorado incluye la combinación de un oligonucleótido que contiene CpG y un derivado de saponina, particularmente la combinación de CpG y QS21 como se describe en la Publicación Internacional Número WO 00/09159. De una manera adecuada, la formulación adicionalmente comprende una emulsión de aceite en agua y tocoferol.

Otros adyuvantes convenientes incluyen MONTANIDE® ISA

720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS® (CSL), MF-59 (Chiron), la serie de adyuvantes SBAS (SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox (Corixa), RC-529 (Corixa) y otros 4-fosfatos de amino-alquil-glucosaminida (AGPs) tales como los descritos en las solicitudes pendientes de Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica con Números de Serie 08/853,826 y 09/074,720, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente como referencia por entero, y adyuvantes de éter de polioxietileno, tales como los descritos en la Publicación Internacional Número WO 99/52549A1. SmithKline Beecham y Corixa Corporation son ahora parte de GlaxoSmithKline.

Otros adyuvantes convenientes incluyen moléculas adyuvantes de la fórmula general (I):



en donde n es de 1 a 50, A es un enlace ó $-\text{C}(\text{O})-$, R es alquilo de 1 a 50 átomos de carbono o fenil-alquilo de 1 a 50 átomos de carbono.

Otro adyuvante de interés es la cadena de toxina b shiga, usada, por ejemplo, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 2005/112991.

Una modalidad de la presente invención consiste en una composición inmunogénica que comprende un éter de polioxietileno de la fórmula general (I), en donde n es entre 1 y 50, preferiblemente entre 4 y 24, más preferiblemente 9; el componente R es alquilo de 1 a 50 átomos de carbono, de preferencia alquilo de 4 a 20 átomos de

carbono, y todavía más preferiblemente alquilo de 12 átomos de carbono, y A es un enlace. La concentración de los éteres de polioxietileno deberá estar en un intervalo entre el 0.1 y el 20 por ciento, de preferencia entre el 0.1 y el 10 por ciento, y todavía más preferiblemente en el intervalo del 0.1 al 1 por ciento. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan a partir del siguiente grupo: 9-lauril-éter de polioxietileno, 9-estearoil-éter de polioxietileno, 8-estearoil-éter de polioxietileno, 4-lauril-éter de polioxietileno, 35-lauril-éter de polioxietileno, y 23-lauril-éter de polioxietileno. Los éteres de polioxietileno, tales como el lauril-éter de polioxietileno, se describen en Merck Index (12ª edición: entrada 7717). Estas moléculas adyuvantes se describen en la Publicación Internacional Número WO 99/52549.

Cualquier composición inmunogénica proporcionada en la presente se puede preparar empleando métodos bien conocidos que den como resultado una combinación de antígeno, potenciador de la respuesta inmunitaria, y un vehículo o excipiente adecuado. Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar como parte de una formulación de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula, esponja, o gel (compuesto de polisacáridos, por ejemplo), que efectúe una liberación lenta del compuesto en seguida de la administración). Estas formulaciones se pueden preparar en general empleando la tecnología bien conocida (véase, por ejemplo, Coombes y colaboradores, *Vaccine* 14:1429-1438 (1996)), y se administran, por ejemplo, mediante implante oral,

rectal, o subcutáneo, o mediante implante en el sitio objetivo deseado. Las formulaciones de liberación sostenida pueden contener un polipéptido, polinucleótido, o anticuerpo dispersado en una matriz de vehículo, y/o pueden estar contenidos dentro de un depósito rodeado por una membrana de control de velocidad.

Los vehículos para utilizarse dentro de estas formulaciones son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables; de preferencia la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del componente activo. Estos vehículos incluyen micropartículas de poli-(láctido-co-glicólido), poliacrilato, látex, almidón, celulosa, dextrano, y similares. Otros vehículos de liberación retardada incluyen biovectores supramoleculares, los cuales comprenden un núcleo hidrofílico no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido reticulado), y opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como un fosfolípido (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,151,254, y las Solicitudes del TCP Números WO 94/20078, WO/94/23701 y WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenida dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implante, de la velocidad y duración esperada de liberación.

Se puede emplear cualquiera de una variedad de vehículos de suministro dentro de las composiciones farmacéuticas y composiciones inmunogénicas, para facilitar la producción de una respuesta inmunitaria específica del antígeno. Los vehículos de

suministro incluyen células presentadoras de antígeno (APCs), tales como células dendríticas, macrófagos, células-B, monocitos, y otras células que se puedan diseñar para ser células presentadoras de antígeno eficientes. Estas células pueden, pero no necesitan, modificarse genéticamente para aumentar la capacidad para presentar el antígeno, para mejorar la activación y/o el mantenimiento de la respuesta de células-T, y/o para ser inmunológicamente compatibles con el receptor (es decir, haplotipo HLA emparejado). Las células presentadoras de antígeno se pueden aislar en general a partir de cualquiera de una variedad de fluidos biológicos y órganos, y pueden ser células autólogas, alogeneicas, singénicas, o xenogénicas.

Ciertas modalidades preferidas de la presente invención utilizan células dendríticas o progenitoras de las mismas como células presentadoras de antígeno. Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno altamente potentes (Banchereau y Steinman, *Nature* 392:245-251 (1998)), y se ha demostrado que son efectivas como un adyuvante fisiológico para provocar una inmunidad profiláctica o terapéutica (véase Timmerman y Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529 (1999)). En general, las células dendríticas se pueden identificar basándose en su forma típica (de estrella *in situ*, con procesos citoplásmicos marcados (dendritas) visibles *in vitro*), su capacidad para absorber, procesar, y presentar antígenos con una alta eficiencia, y su capacidad para activar las respuestas de células-T puras. Desde luego, las células dendríticas se pueden

diseñar para expresar receptores de superficie celular específicos o ligandos que comúnmente no se encuentren en las células dendríticas *in vivo* o *ex vivo*, y la presente invención contempla estas células dendríticas modificadas. Como una alternativa a las células dendríticas, se pueden utilizar células dendríticas cargadas con antígeno en vesículas secretadas (denominadas como exosomas) dentro de una composición inmunogénica (véase Zitvogel y colaboradores, *Nature Med.* 4:594-600 (1998)).

Las células dendríticas y sus progenitoras se pueden obtener a partir de sangre periférica, médula ósea, ganglios linfáticos, bazo, piel, sangre de cordón umbilical, o cualquier otro tejido o fluido adecuado. Por ejemplo, las células dendríticas se pueden diferenciar *ex vivo* mediante la adición de una combinación de citoquinas, tales como GM-CSF, IL-4, IL-13, y/o $\text{TNF}\alpha$ a los cultivos de monocitos cosechados de sangre periférica. De una manera alternativa, las células positivas para CD34 cosechadas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical, o médula ósea, se pueden diferenciar en células dendríticas mediante la adición al medio de cultivo de combinaciones de GM-CSF, IL-3, $\text{TNF}\alpha$, ligando CD40, LPS, ligando flt3, y/u otros compuestos que induzcan diferenciación, maduración, y proliferación de células dendríticas.

Las células dendríticas convenientemente se categorizan como células "inmaduras" y "maduras", lo cual permite tener una manera simple de discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debe interpretarse para excluir todas

las posibles etapas intermedias de diferenciación. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como células presentadoras de antígeno con una alta capacidad para absorber y procesar el antígeno, lo cual se correlaciona con la alta expresión del receptor Fcγ y el receptor de manosa. El fenotipo maduro típicamente se caracteriza por una expresión más baja de estos marcadores, pero una alta expresión de las moléculas de superficie celular responsables de la activación de células-T, tales como MHC clase I y clase II, moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11), y moléculas co-estimulantes (por ejemplo, CD40, CD80, CD86, y 4-1BB).

Las células presentadoras de antígeno (APCs) se pueden transfectar en general con un polinucleótido que codifique una proteína (o una porción u otra variante de la misma), de tal manera que el polipéptido se exprese sobre la superficie celular. Esta transfección puede tener lugar *ex vivo*, y entonces se puede utilizar una composición farmacéutica o una composición inmunogénica que comprenda estas células transfectadas, como se describe en la presente. De una manera alternativa, se puede administrar un vehículo de suministro de genes que dirija una célula dendrítica u otra célula presentadora de antígeno a un paciente, dando como resultado que se presente la transfección *in vivo*. La transfección *in vivo* y *ex vivo* de células dendríticas, por ejemplo, se puede llevar a cabo en general empleando cualesquiera métodos conocidos en la materia, tales como los descritos en la Publicación Internacional

Número WO 97/24447, o el planteamiento de la pistola de genes descrito por Mahvi y colaboradores, *Immunology and Cell Biology* 75: 456-460 (1997). La carga de antígeno de las células dendríticas se puede lograr mediante la incubación de las células dendríticas o de las células progenitoras con el polipéptido, ADN (desnudo o dentro de un vector de plásmido), o ARN; o con bacterias o virus recombinantes que expresen el antígeno (por ejemplo, vectores de vacuna, varicela de aves, adenovirus, o lentivirus). Antes de cargarse, el polipéptido se puede conjugar covalentemente con un componente inmunológico que proporcione ayuda de células-T (por ejemplo, una molécula portadora). De una manera alternativa, una célula dendrítica se puede impulsar con un componente inmunológico no conjugado, por separado, o en la presencia del polipéptido.

Las composiciones inmunogénicas y las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollitas o frascos sellados. Estos recipientes de preferencia se sellan herméticamente para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones se pueden almacenar como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. De una manera alternativa, una composición inmunogénica o una composición farmacéutica se puede almacenar en una condición secada por congelación, que solamente requiera de la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de usarse.

En algunas modalidades, una "preparación" o primera

administración de un polipéptido de Rv3616c (incluyendo variantes, fragmentos inmunogénicos, o proteínas de fusión), o un polinucleótido que codifique este polipéptido, es seguido por uno o más "refuerzos" o administraciones subsiguientes de un polipéptido de Rv3616c (incluyendo variantes, fragmentos inmunogénicos, o proteínas de fusión), o de un polinucleótido que codifique el polipéptido (método de "preparación y refuerzo"). Por ejemplo, una primera administración con un polipéptido de Rv3616c (incluyendo variantes, fragmentos inmunogénicos, o proteínas de fusión), o con un polinucleótido que codifique el polipéptido es seguido por una o más administraciones subsiguientes de un polipéptido de Rv3616c (incluyendo variantes, fragmentos inmunogénicos, o proteínas de fusión), o de un polinucleótido que codifique este polipéptido.

En una modalidad, una primera administración con un polipéptido de Rv3616c o un polinucleótido, es seguida por una o más administraciones subsiguientes de un polipéptido de Rv3616c. En una modalidad, una primera administración con un polipéptido de Rv3616c o un polinucleótido, es seguida por una o más administraciones subsiguientes de un polinucleótido de Rv3616c. Usualmente la primera administración o "preparación" y la segunda administración o "refuerzo" se dan con aproximadamente 2 a 12 semanas de separación, o con hasta 4 a 6 meses de separación. Las administraciones de "refuerzo" subsiguientes se dan con aproximadamente 6 meses de separación, o con tanto como 1, 2, 3, 4 ó 5 años de separación. El tratamiento de refuerzo convencional (por

ejemplo, una administración de preparación de proteína seguida por una administración de refuerzo de proteína) también puede ser útil en la prevención o el tratamiento de tuberculosis (por ejemplo, en la prevención o el tratamiento de tuberculosis latente, en particular en la prevención o demora de la reactivación de tuberculosis).

ANTICUERPOS

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de estructura a partir de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo, que se enlaza específicamente a, y reconoce, un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu, así como la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican ya sea como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) de ejemplo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa), y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50 a 70 kDa). El término N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos primordialmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H), se refieren a estas cadenas ligera y pesada,

respectivamente.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos mediante digestión con diferentes peptidasas. Por consiguiente, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces de disulfuro en la región de articulación para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que por sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 mediante un enlace de disulfuro. El $F(ab)'_2$ se puede reducir bajo condiciones suaves para romper el enlace de disulfuro en la región de articulación, convirtiendo de esta manera el dímero de $F(ab)'_2$ en un monómero de Fab'. El monómero de Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de articulación (véase *Fundamental Immunology* (Paul, Editor, 3ª Edición 1993). Aunque diferentes fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que estos fragmentos se pueden sintetizar *de novo* ya sea químicamente o mediante la utilización de la metodología de ADN recombinante. Por consiguiente, el término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, también incluye fragmentos de anticuerpos ya sea producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros, o bien aquéllos sintetizados *de novo* utilizando las metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de una sola cadena), o aquéllos identificados utilizando bibliotecas de exhibición de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty y colaboradores, *Nature* 348: 552-554 (1990)).

Para la preparación de anticuerpos monoclonales o

policlonales, se puede emplear cualquier técnica conocida en la materia (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor y colaboradores, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole y colaboradores, páginas 77-96 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)). Las técnicas para la producción de anticuerpos de una sola cadena (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,946,778) se pueden adaptar para producir anticuerpos para los polipéptidos de esta invención. También, se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos, tales como otros mamíferos, para expresar los anticuerpos humanizados. De una manera alternativa, se puede emplear la tecnología de exhibición de fagos para identificar los anticuerpos y los fragmentos Fab heteroméricos que se enlacen específicamente a los antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty y colaboradores, *Nature* 348: 552-554 (1990); Marks y colaboradores, *Biotechnology* 10: 779-783 (1992)).

La frase "se enlaza específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "inmuno-reactivo específicamente (o selectivamente) con", cuando se hace referencia a una proteína o a un péptido, se refiere a una reacción de enlace que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por consiguiente, bajo las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se enlazan a una proteína particular cuando menos dos veces el fondo y no se enlazan sustancialmente en una cantidad significativa a otras

(10)

proteínas presentes en la muestra. El enlace específico a un anticuerpo bajo estas condiciones puede requerir de un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales reproducidos para las proteínas de fusión se pueden seleccionar para obtener solamente aquellos anticuerpos policlonales que sean específicamente inmuno-reactivos con la proteína de fusión y no con los componentes individuales de las proteínas de fusión. Esta selección se puede lograr sustrayendo los anticuerpos que reaccionen cruzadamente con los antígenos individuales. Se pueden emplear una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar los anticuerpos específicamente inmuno-reactivos con una proteína particular. Por ejemplo, rutinariamente se utilizan los inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar los anticuerpos específicamente inmuno-reactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988), y *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (1998), para ver una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden utilizar para determinar la inmuno-reactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva será de cuando menos dos veces la señal de fondo o ruido, y más típicamente más de 10, 20 ó 100 veces el fondo (por ejemplo, el enlace a otras proteínas de *Mycobacterium*, tal como a otras proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*).

DIAGNÓSTICO

En otro aspecto, esta invención proporciona métodos para

utilizar uno o más de los polipéptidos descritos anteriormente para diagnosticar tuberculosis latente (por ejemplo, utilizando ensayos basados en la respuesta de las células-T o ensayos basados en anticuerpos de un formato convencional).

5 Por ejemplo, se proporciona un método para determinar la infección latente por *M. tuberculosis* en un individuo, el cual comprende:

- (a) obtener una muestra a partir del individuo;
- (b) poner en contacto esta muestra con un polipéptido
- 10 aislado, el cual comprende:
 - (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
 - (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
 - (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de
 - 15 proteína de Rv3616c;
- (c) cuantificar la respuesta de la muestra.

Por ejemplo, la muestra puede ser sangre entera o células purificadas. De una manera adecuada, la muestra contendrá células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En una modalidad de la

20 invención, el individuo será seropositivo. En una segunda modalidad de la invención, el individuo será seronegativo.

De una manera adecuada, el individuo no habrá sido previamente vacunado contra la infección por *M. tuberculosis* (por ejemplo, de una manera adecuada, el individuo no habrá sido

25 previamente vacunado con BCG).

La respuesta de la muestra se puede cuantificar mediante un rango de medios conocidos por los expertos en este campo, incluyendo el monitoreo de la proliferación de linfocitos o la producción de citoquinas o anticuerpos específicos. Por ejemplo, se puede utilizar el ELISPOT de células-T para monitorear las citoquinas, tales como interferón-gamma (IFN γ), interleucina-2 (IL2), e interleucina-5 (IL5). Se puede utilizar el ELISPOT de células-B para monitorear la estimulación de los antígenos específicos de *M. tuberculosis*. La respuesta celular también se puede caracterizar mediante el uso de teñido intra- y extra-celular y análisis mediante un citómetro de flujo.

Los métodos para cuantificar la respuesta de proliferación de una muestra incluyen:

(i) pulsar las células cultivadas con una radiomarca (por ejemplo, timidina tritiada), y monitorear la absorción de tritio (por ejemplo, centelleo de gas);

(ii) marcado con succinimidil-éster de diacetato de carboxi-fluoresceína (CFSE) y monitoreo de la fluorescencia de la división celular utilizando citometría de flujo.

La cuantificación de la respuesta de citoquina de una muestra incluye en particular el monitoreo de la producción de interferón-gamma.

Cuando se utilizan estos métodos de cuantificación, se puede definir una respuesta positiva a un antígeno mediante una proporción de la señal al ruido (proporción S/N) de cuando menos 2:1 (por

ejemplo, de cuando menos 3:1 o de cuando menos 5:1).

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan métodos para diagnosticar la infección por *M. tuberculosis* latente utilizando una prueba de la piel. Como se utiliza en la presente, una "prueba de la piel" es cualquier ensayo que se lleve a cabo directamente sobre un paciente, en donde se mide una reacción de hiper-sensibilidad de tipo retardado (DTH) (tal como hinchamiento, enrojecimiento, o dermatitis) en seguida de la inyección intradérmica de un polipéptido de Rv153c, como se describe anteriormente (o una variante, fragmentos inmunogénicos del mismo, o nucleótidos que los codifiquen). Esta inyección se puede lograr utilizando cualquier dispositivo adecuado suficiente para poner en contacto las combinaciones de antígeno con las células dérmicas del paciente, tal como una jeringa de tuberculina o una jeringa de 1 mililitro. La reacción se mide después de un período de tiempo, por ejemplo, cuando menos 48 horas después de la inyección, en especial de 48 a 72 horas.

La reacción DTH es una respuesta inmunitaria mediada por células, la cual es mayor en los pacientes que han sido expuestos anteriormente al antígeno de prueba. La respuesta se puede medir visualmente, utilizando una regla. En general, una respuesta que sea mayor de aproximadamente 0.5 centímetros de diámetro, en especial mayor de aproximadamente 1.0 centímetros de diámetro, es una respuesta positiva, que indica la infección previa por *M. tuberculosis*, la cual puede o no manifestarse como una enfermedad activa.

Para usarse en una prueba de la piel, el componente Rv3616c adecuadamente se formula como una composición farmacéutica que contiene un vehículo fisiológicamente aceptable. De una manera adecuada, el vehículo empleado en estas composiciones farmacéuticas es una solución salina con los conservadores
5 apropiados, tales como fenol y/o Tween 80^{MR}.

La presente invención proporciona además kits para utilizarse en cualquiera de los métodos de diagnóstico anteriores. Estos kits típicamente comprenden dos o más componentes necesarios para
10 llevar a cabo un ensayo de diagnóstico. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, recipientes, y/o equipo.

Por ejemplo, un recipiente dentro de un kit puede contener un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se enlace específicamente a una proteína. Estos anticuerpos o fragmentos se
15 pueden proporcionar unidos a un material de soporte, como se describe anteriormente. Uno o más recipientes adicionales pueden encerrar elementos tales como reactivos o reguladores, para utilizarse en el ensayo. Estos kits también, o de una manera alternativa, pueden contener un reactivo de detección, como se
20 describe anteriormente, conteniendo un grupo reportero adecuado para la detección directa o indirecta del enlace del anticuerpo.

De una manera alternativa, un kit se puede diseñar para detectar el nivel de ARNm que codifique una proteína en una muestra biológica. Estos kits comprenden en general cuando menos
25 una sonda de oligonucleótido o un cebador, como se describe

anteriormente, que se hibride a un polinucleótido que codifique una proteína. Este oligonucleótido se puede utilizar, por ejemplo, dentro de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en un ensayo de hibridación. Los componentes adicionales que pueden estar
5 presentes dentro de estos kits incluyen un segundo oligonucleótido y/o un reactivo de diagnóstico o un recipiente, con el objeto de facilitar la detección de un polinucleótido que codifique una proteína de la invención.

Otros kits de diagnóstico incluyen aquéllos diseñados para la
10 detección de las respuestas mediadas por células (los cuales, por ejemplo, pueden ser útiles en los métodos de diagnóstico de la presente invención). Estos kits típicamente comprenderán:

- (i) un aparato para obtener una muestra celular apropiada a partir de un sujeto;
- 15 (ii) medios para estimular esa muestra celular con un polipéptido de Rv3616c (o variante del mismo, fragmentos inmunogénicos del mismo, o ADN que codifique dichos polipéptidos);
- (iii) medios para detectar o cuantificar la respuesta celular a la estimulación.

20 Los medios adecuados para cuantificar la respuesta celular incluyen un kit ELISPOT de células-B, o de una manera alternativa, un kit ELISPOT de células-T, que son conocidos por los expertos en este campo.

Un posible kit comprende:

- 25 (a) un polipéptido de la invención; y

(b) un reactivo de detección adecuado para la detección directa o indirecta del enlace del anticuerpo.

Son de un interés particular los kits de diagnóstico hechos a la medida para cuantificar las respuestas de células-T:

5 Un kit de diagnóstico, el cual comprende:

(a) un polipéptido de la invención; y

(b) un aparato suficiente para poner en contacto el polipéptido con las células dérmicas de un individuo.

Un kit de diagnóstico, el cual comprende:

10 (a) un polipéptido de la invención;

(b) un aparato suficiente para poner en contacto el polipéptido con una muestra (por ejemplo, sangre entera o de una manera más adecuada, células mononucleares de sangre periférica (PBMC)) a partir de un individuo; y

15 (c) medios para cuantificar la respuesta de células-T (por ejemplo, proliferación o producción de IFN-gamma).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan a manera de ilustración solamente, y no a manera de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que se podrían cambiar o modificar para proporcionar resultados esencialmente similares.

EJEMPLO 1 – IDENTIFICACIÓN OF Rv3616c COMO UN OBJETIVO DE VACUNA DE TUBERCULOSIS (TB) LATENTE

25 El gen de Rv3616c, codifica para proteínas ricas en alanina y

glicina hipotéticas conservadas.

Rv3616c se seleccionó basándose en un análisis de todo el genoma de los genes de *Mycobacterium tuberculosis* asociados con el mantenimiento de la fase latente y la infectividad, como en Murphy y Brown *BMC. Infect. Dis.* 2007 7: 84-99. Los objetivos genéticos en fase latente potenciales en *Mycobacterium tuberculosis* se priorizaron a través de un meta-análisis bioinformático de los conjuntos de datos de microarreglos de ADN de todo el genoma publicados de la expresión genética bacteriana bajo condiciones latentes simuladas. La localización sub-celular de las proteínas de *M. tuberculosis* codificadas por los genes se llevó a cabo subsiguientemente sobre el genoma entero para identificar los objetivos de la vacuna.

Dicho de una manera breve, las condiciones experimentales en los modelos de latencia fueron muy variadas, de modo que se desarrolló un sistema de calificación de cero a cinco para normalizar estos datos, basándose en dos criterios: 1) la relevancia de las condiciones experimentales para el estado latente, y 2) el orden de clasificación de la expresión. La máxima calificación para un conjunto de datos experimentales particular se ajustó basándose en la relevancia potencial para la presentación clínica de las infecciones por *M. tuberculosis* en fase latente. La Tabla 1 muestra los conjuntos de datos recopilados para el Paso 1, junto con las máximas calificaciones ajustadas para cada conjunto de datos. Se obtuvieron conjuntos de datos adicionales sobre la esencialidad de los genes

para el crecimiento, a partir de los estudios publicados, utilizando los experimentos de eliminación genética basados en los transposones (TraSH). Los genes que no tuvieron efecto alguno sobre el crecimiento recibieron una calificación de cero.

5

Tabla 1

Fuentes, modelos experimentales, y criterios de calificación para la expresión genética del microarreglo de ADN de *M. tuberculosis* y la eliminación genética en todo el genoma (esencialidad de la fase de crecimiento).

10

Referencia	Modelo Experimental	Punto del Tiempo: Calificación Máxima ^a
Betts JC y colaboradores, <i>Mol. Microbiol.</i> 2002 43:717-731	Inanición bajo O ₂ controlado	96h: 3 24h: 2 4h: 1
Hampshire T y colaboradores, <i>Tuberculosis.(Edimb.)</i> 2004 84:228-238	Agotamiento de nutrientes bajo O ₂ controlado	62 y 75d: 5 49d: 4 18d: 2
Muttucumaru DG y colaboradores, <i>Tuberculosis.(Edimb.)</i>	Modelo de hipoxia de Wayne [#]	14d (NRP-2): 4 7d (NRP-1): 2

15

20

25

176

5

10

15

20

25

Referencia	Modelo Experimental	Punto del Tiempo: Calificación Máxima ^a
2004 84:239-246		
Voskuil MI y colaboradores, <i>Tuberculosis. (Edimb.)</i> 2004 84:218-227	Modelo de hipoxia de Wayne [#]	30 y 80d: 5 14 y 20d: 4 10 y 12d: 3 6 y 8d: 2
Schnappinger D y colaboradores, <i>J. Exp. Med.</i> 2003 198:693-704	Infección de macrófagos de ratón, +/- γ -INF	24 y 48h: 5
Karakousis PC y colaboradores, <i>J. Exp. Med.</i> 2004 200:647-657	Implante subcutáneo de fibra hueca en ratones	10d: 3
Talaat AM y colaboradores, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.</i> 2004, 101:4602- 4607	Infección de ratones. MTB cosechada a partir de pulmón ^b	28d: 3

	Referencia	Modelo Experimental	Punto del Tiempo: Calificación Máxima^a
5	Sassetti CM y colaboradores, <i>Mol. Microbiol.</i> 2003 48:77-84	Bibliotecas mutadas TraSH cultivadas en un medio sólido	14d:5
10	Rengarajan J y colaboradores, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.</i> 2005, 102: 8327- 8332	Infección de macrófagos de ratón, +/- γ -INF con Bibliotecas mutadas TraSH de <i>M. tuberculosis</i>	7d:5
15	Sassetti CM y colaboradores, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.</i> 2003 100: 12989- 12994	Ratones C57BL/6J infectados con Bibliotecas mutadas TraSH de <i>M. tuberculosis</i>	7, 14, 28 y 56d:5
20			

^a Calificación máxima basándose en la relevancia como un modelo de latencia; h = hora; d = día.

^b Proporción de *M. tuberculosis* a partir de pulmón de Balb/c a la MTB en un cultivo aireado durante 28 días.

25 # Wayne LG y Hayes LG, *Infect. Immun.* 1996 64: 2062-2069.

Paso 2 - En la aplicación del segundo criterio, el orden de clasificación de expresión genética, las calificaciones de los genes a partir de cada conjunto de datos, se ordenó desde la más alta hasta la más baja, basándose en la proporción de expresión (las veces de expresión en la condición experimental contra las células en cultivo líquido en fase de registro (log)). El gen de calificación más alta recibió la calificación máxima para ese conjunto de datos particular (enlistado en la columna 3 de la Tabla 1. (por ejemplo, 5, 4 ..., 1 punto)). La calificación se redujo por 0.005 puntos para cada gen en orden hasta cero, o hasta que se alcanzó el final del conjunto de datos. Por consiguiente, cuando la calificación máxima fue de 4 puntos, el gen clasificado como 100^º recibiría una calificación de 3.500. Para una calificación máxima de 5 puntos, 1000 genes o el 25 por ciento del genoma de *M. tuberculosis* recibieron una calificación. Para los experimentos en donde se recolectaron datos a partir de múltiples puntos del tiempo, la calificación máxima a través de todos los puntos del tiempo se utilizó como la calificación final.

En el Paso 3, las calificaciones para cada gen en cada una de las condiciones experimentales se recolectaron en una base de datos Microsoft Access. Se agregaron campos de referencia con el objeto de facilitar la priorización, tales como ID Seq Ref (Identificación de Secuencia de Referencia), Función Genbank, Nota Genbank, Clasificación de Tuberculista, y los vínculos de KEGG y Sanger Center. Mediante la combinación de los datos a partir de diferentes estudios y fuentes, se alcanzó una vista en consenso acerca de los

genes particulares y las sendas más críticas para la sobrevivencia en el estado latente.

En el Paso 4, se derivó una lista priorizada de objetivos terapéuticos utilizando los 400 genes de calificación superior (aproximadamente el 10 por ciento del genoma) complementada por el análisis computacional y manual experto de las sendas bioquímicas, enzimología, tratabilidad del fármaco, homología con los genes humanos, y otros conocimientos previos. La gran mayoría de los genes de alta calificación vienen a partir del subconjunto en donde se intersectan dos o tres de los grupos.

En el Paso 5, se llevó a cabo la identificación de la localización subcelular de las proteínas de *M. tuberculosis* codificadas por los genes, en el genoma entero. La heurística empleada para la predicción de la proteína de membrana se describe en Chalker y colaboradores, *J. Bacteriol.* 2001 183: 1259-1268. Se generaron los perfiles de hidropatía promedio (H) (von Heijne G *J. Mol. Biol.* 1992 225: 487-494) utilizando los valores de hidropatía de GES (Engelman DM y colaboradores, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1986 15: 321-353) ponderados utilizando una ventana trapezoidal. Empleando un proceso similar a los pasos iniciales del algoritmo TopPred II (Claros M.G. y colaboradores, *Comput. Appl. Biosci.* 1994 10: 685-686), se predijeron los segmentos transmembrana helicoidales (TMS) para cada secuencia de péptido, mediante la selección de 19 aminoácidos centrados en el valor H más alto (MaxH), enmascarándolos de una consideración adicional, y repitiendo el

proceso hasta que ya no quedaron picos son un H de >0.5 . Las localizaciones subcelulares se asignaron basándose en el valor MaxH pico, en el número de segmentos con un H de >1.0 , y en la distribución y valores H pico de los TMS supuestos. Se seleccionó un

5 corte de MaxH de 1.15 para maximizar la discriminación entre dos conjuntos de datos de 34 pruebas de liberación de SwissProtein que contenían proteínas transmembrana y citoplásmicas, respectivamente (Boyd D y colaboradores, *Protein Sci.* 1998 7: 201-205). Las proteínas con un MaxH de <1.15 se clasificaron como

10 citoplásmicas, mientras que aquéllas con un MaxH de >1.15 y cuando menos tres posibles TMS, se clasificaron como proteínas de membrana. Las proteínas ancladas se definieron por tener exactamente dos TMS, uno empezando antes del aminoácido (aa) 35 y uno con un H de >1.15 con el otro teniendo un H no menor de 0.5.

15 Se utilizó específicamente SignalP con las posiciones Gram-positivas para *M. bacterium*, con el fin de identificar las proteínas secretadas entre aquéllas clasificadas ya fuera como citoplásmicas o bien como "desconocidas" en el análisis heurístico (Nielsen H y colaboradores, *Protein Eng.* 1997 10: 1-6).

20 Rv3616c se clasificó muy alto como un antígeno de vacuna de acuerdo con varios criterios:

(i) Rv3616c se sobre-regula de una manera consistente a través de todos los modelos de latencia. Entre toda la suite de 3999 genes calificados en el meta-análisis, Rv3616c se clasificó en el

25 cuartil superior de los genes sobre-expresados a través de todos los

modelos de latencia. La calificación sobre-regulada para Rv3616c fue de 6.52, la cual se comparó favorablemente con la calificación del gen superior de 22.28.

(ii) Rv3616c se clasificó como altamente esencial para la sobrevivencia en el modelo de infección de bazo de ratón ((calificándose en 4.945, de un posible puntaje de 5).

(iii) La localización subcelular predijo que la proteína de Rv3616c es una proteína enlazada a membrana y, por consiguiente, tiene una exposición extracelular significativa, indicando su idoneidad como un objetivo de vacuna.

(iv) Rv3616c puede provocar una respuesta protectora contra la agresión inicial de la tuberculosis.

(v) Rv3616c es ampliamente reconocido como un antígeno.

EJEMPLO 2 – PREDICCIÓN DE EPÍTOPOS DE Rv3616c

Método

La predicción de los epítomos de células-T se basó en los siguientes planteamientos:

Predicción	Nombre	URL/Referencias
CD4 y CD8	Multipred	sitio web: antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/ Zhang,G.L., Khan,A.M., Srinivasan,K.N., August,J.T. y Brusic,V. (2005) "MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides" Nucleic Acids Res. 33, W172 - W179.

5

10

15

20

25

Predicción	Nombre	URL/Referencias
	SVMHC	sitio web: www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC "Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC." Pierre Dönnès y Arne Elofsson en: BMC Bioinformatics 2002 3: 25
CD4	ProPred	sitio web: www.imtech.res.in/raghava/propred/ Singh, H. y Raghava, G.P.S. (2001) "ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites." <i>Bioinformatics</i> , 17(12), 1236-37.
	Tepitope2	Programa interno basado en: H. Bian, J. Hammer (2004) "Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE." <i>Methods</i> 34 : 468-75
CD8	nHLA	sitio web: www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/ Bhasin M. y Raghava G P S (2006) "A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes"; <i>J. Biosci.</i> 32: 31-42
	NetCTL	sitio web: www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/ "An integrative approach to CTL epitope

5

10

15

20

25

Predicción	Nombre	URL/Referencias
		prediction. A combined algorithm integrating MHC-I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions." Larsen M.V., Lundegaard C., Kasper Lamberth, Buus S., Brunak S., Lund O., y Nielsen M. European Journal of Immunology. 35(8): 2295-303. 2005
	EpiJen	sitio web: www.jenner.ac.uk/EpiJen/ Doytchinova, I. A., P. Guan, D. R. Flower. "EpiJen: a server for multi-step T cell epitope prediction." <i>BMC Bioinformatics</i> , 2006, 7, 131.
	Syfpeithi	sitio web: www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic: "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." <i>Immunogenetics</i> (1999) 50: 213-219
	PredTAP	sitio web: antigen.i2r.a-star.edu.sg/predTAP/ Zhang, G.L., Petrovsky, N., Kwoh, C.K.,

204

5

10

15

20

25

Predicción	Nombre	URL/Referencias
		August,J.T. y Brusic,V. (2006) "PRED ^{TAP} : a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing." Immunome Res. 2(1), 3.
	PAPROC	http://www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html C. Kuttler, A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.-G. Rammensee, H. Schild, K.P. Haderler, "An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages", J. Mol. Biol. 298 (2000), 417-429. A.K. Nussbaum, C. Kuttler, K.P. Haderler, H.-G. Rammensee, H. Schild, "PAP^{ro}C: A Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW", Immunogenetics 53 (2001), 87-94.

Resultados

Tabla 2

Epítomos de células-T CD4+ humanas de Rv3616c supuestos

5	No. de Epíto- po de CD4 Supuesto	Posición de Amino- ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
	1	5	FIIDPTISA	SEQ ID No: 29	DRB1_0301, DRB1_0401, DRB1_1101
10	2	31	ILYSSLEYF	SEQ ID No: 30	DRB1_0301
	3	36	LEYFEKALE	SEQ ID No: 31	DRB1_1301
	4	63	YAGKNRNHV	SEQ ID No: 32	DRB1_0801
	5	87	LIHDQANAV	SEQ ID No: 33	DRB1_0301, DRB1_0401
15	6	111	FVRPVAVDL	SEQ ID No: 34	DRB1_0101
	7	119	LTYIPVVGH	SEQ ID No: 35	DRB1_0401
	8	121	YIPVVGHAL	SEQ ID No: 36	DRB1_0101
20	9	151	YLVVKTLIN	SEQ ID No: 37	DRB1_0401
	10	152	LVVKTLINA	SEQ ID No: 38	DRB1_1301
	11	154	VKTLINATQ	SEQ ID No: 39	DRB1_0401
25	12	164	LKLLAKLAE	SEQ ID No: 40	DRB1_0301, DRB1_0801,

5

10

15

No. de Epítopo de CD4 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítipo	SEQ ID No:	Alelo HLA
				DRB1_1101, DRB1_1301
13	173	LVAAGIADI	SEQ ID No: 41	DRB1_0301, DRB1_1101, DRB1_1301
14	181	IISDVADII	SEQ ID No: 42	DRB1_0301
15	197	WEFITNALN	SEQ ID No: 43	DRB1_0401
16	252	LFGAAGLSA	SEQ ID No: 44	DRB1_1501
17	264	LAHADSLAS	SEQ ID No: 45	DRB1_0401
18	270	LASSASLPA	SEQ ID No: 46	DRB1_0401
19	288	FGGLPSLAQ	SEQ ID No: 47	DRB1_0401

Tabla 3

Epítopos de células-T CD8+ humanas de Rv3616c supuestos

20

25

No. de Epítopo de CD4 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítipo	SEQ ID No:	Alelo HLA
1	5	FIIDPTISA	SEQ ID No: 48	A2
2	6	IIDPTISAI	SEQ ID No: 49	A_0101, A2

5

10

15

20

25

No. de Epíto- po de CD4 Supuesto	Posición de Amino- ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
3	9	PTISAI DGL	SEQ ID No: 50	A2, A_0201, B7, B8
4	10	TISAI DGLY	SEQ ID No: 51	A1, A_0101, A3, A_0301
5	12	SAI DGLYDL	SEQ ID No: 52	A2, B_3501
6	13	AIDGLYDLL	SEQ ID No: 53	A_0101, A_0201, B44
7	17	LYDLLGIGI	SEQ ID No: 54	A24
8	25	IPNQGGILY	SEQ ID No: 55	B7, A_0101, B_3501, B51
9	30	GILYSSLEY	SEQ ID No: 56	A1, A_0101, A3, A_0301
10	33	YSSLEYFEK	SEQ ID No: 57	A1, A_0301
11	35	SLEYFEKAL	SEQ ID No: 58	A_0201, B7, Cw_0401, Cw_0602
12	38	YFEKALEEL	SEQ ID No: 59	A24, A_2402, B8, Cw_0401, Cw_0602
13	39	FEKALEELA	SEQ ID No: 60	B44, B_4403
14	69	NHVNFFQEL	SEQ ID No: 61	A24, Cw_0602
15	76	ELADLDRQL	SEQ ID No: 62	A_0201

5

10

15

20

25

No. de Epíto- po de CD4 Supuesto	Posición de Amino- ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
16	77	LADLDRQLI	SEQ ID No: 63	A_0101, B51
17	79	DLDRQLISL	SEQ ID No: 64	A_0101, A_0201
18	80	LDRQLISLI	SEQ ID No: 65	A24, B7, B51
19	94	AVQTTRDIL	SEQ ID No: 66	B7
20	103	EGAKKGLEF	SEQ ID No: 67	A24, B7
21	107	KGLEFVRPV	SEQ ID No: 68	A_0201, B51
22	108	GLEFVRPVA	SEQ ID No: 69	A_0101, A_0301
23	109	LEFVRPVAV	SEQ ID No: 70	B44
24	111	FVRPVAVDL	SEQ ID No: 71	B7, B8, B_3501
25	113	RPVAVDLTY	SEQ ID No: 72	B7, A_0101, B_3501, B51
26	116	AVDLTYIPV	SEQ ID No: 73	A2, A_0201
27	120	TYIPVVGHA	SEQ ID No: 74	A24
28	121	YIPVVGHAL	SEQ ID No: 75	A_0101, A2, A_0201, B7, B8
29	129	LSAAFQAPF	SEQ ID No: 76	A1, B7, B_3501
30	130	SAAFQAPFC	SEQ ID No: 77	A_0201

209

	No. de Epíto- po de CD4 Supuesto	Posición de Amino- ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
5	31	131	AAFQAPFCA	SEQ ID No: 78	A_0301, B_3501
	32	133	FQAPFCAGA	SEQ ID No: 79	A2, A_0201
	33	135	APFCAGAMA	SEQ ID No: 80	B7, B_3501
	34	136	PFCAGAMAV	SEQ ID No: 81	A3
10	35	141	AMAVVGGAL	SEQ ID No: 82	A2, A_0201, A24, B7
	36	143	AVVGGALAY	SEQ ID No: 83	A1, A3, A_0301, B7
	37	147	GALAYLVVK	SEQ ID No: 84	A3, A_0301
	38	149	LAYLVVKTL	SEQ ID No: 85	B8, B44, B51
15	39	150	AYLVVKTLI	SEQ ID No: 86	A24
	40	155	KTLINATQL	SEQ ID No: 87	A_0201, A2, A_0301, A24
	41	156	TLINATQLL	SEQ ID No: 88	A2, A_0201, A3, A_0101, Cw_0401
	42	158	INATQLLKL	SEQ ID No: 89	B7, B8, Cw_0602
20	43	159	NATQLLKLL	SEQ ID No: 90	A_2402, B7, B_3501, B44, Cw_0401, Cw_0602
25					

21

	No. de Epíto- po de CD4 Supuesto	Posición de Amino- ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
5	44	162	QLLKLLAKL	SEQ ID No: 91	A2, A_0201, A_0301, A_2402, B8, Cw_0401, Cw_0602
	45	165	KLLAKLAEL	SEQ ID No: 92	A2, A_0201, A_0301, B7, B8, Cw_0602
10	46	166	LLAKLAELV	SEQ ID No: 93	A2, A_0201, A_0101, B8
	47	169	KLAELVAAA	SEQ ID No: 94	A2
	48	170	LAELVAAAI	SEQ ID No: 95	A1, A24, B51
15	49	173	LVAAAIADI	SEQ ID No: 96	B7, B51
	50	177	AIADIISDV	SEQ ID No: 97	A2, A_0201, Cw_0602
	51	178	IADIISDVA	SEQ ID No: 98	A_0101, B_3501
	52	182	ISDVADIHK	SEQ ID No: 99	A1, A_0301
20	53	192	TLGEVWEFI	SEQ ID No: 100	A2, A_0201
	54	199	FITNALNGL	SEQ ID No: 101	A2
25	55	202	NALNGLKEL	SEQ ID No: 102	B51, A_2402, B_3501, Cw_0602

5

10

15

20

25

No. de Epítopo de CD4 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítipo	SEQ ID No:	Alelo HLA
56	213	KLTGWVTGL	SEQ ID No: 103	A2, A_0201
57	214	LTGWVTGLF	SEQ ID No: 104	A1, A_0101, A24
58	225	GWSNLESFF	SEQ ID No: 105	A24
59	228	NLESFFAGV	SEQ ID No: 106	A2, A_0201
60	231	SFFAGVPGL	SEQ ID No: 107	A2, A_0201, A24, Cw_0401
61	238	GLTGATSGL	SEQ ID No: 108	A2, A_0201
62	246	LSQVTGLFG	SEQ ID No: 109	A1, B8
63	247	SQVTGLFGA	SEQ ID No: 110	A2
64	258	LSASSGLAH	SEQ ID No: 111	A1, A3, B7, B8
65	260	ASSGLAHAD	SEQ ID No: 112	A1, A3, A_0301
66	262	SGLAHADSL	SEQ ID No: 113	A_0201
67	263	GLAHADSLA	SEQ ID No: 114	A_0101, A_0201, A_0301
68	269	SLASSASLP	SEQ ID No: 115	A_0201, A_0301
69	271	ASSASLPAL	SEQ ID No: 116	B7
70	286	SGFGGLPSL	SEQ ID No: 117	A2, A_0201, B51

5

10

15

No. de Epítopo de CD4 Supuesto	Posición de Amino-ácido	Secuencia del Epítopo	SEQ ID No:	Alelo HLA
71	291	LPSLAQVHA	SEQ ID No: 118	B7, B_3501, B51
72	298	HAASTRQAL	SEQ ID No: 119	B7, B8, B_3501
73	301	STRQALRPR	SEQ ID No: 120	A3, A_0301
74	307	RPRADGPVG	SEQ ID No: 121	B7, B_0702, B8, B51
75	319	EQVGGQSQL	SEQ ID No: 122	B7, B44
76	350	GASKGTTTK	SEQ ID No: 123	A3, A_0301
77	351	ASKGTTTKK	SEQ ID No: 124	A3, A_0301
78	353	KGTTTKKYS	SEQ ID No: 125	A_0301, B8
79	368	TEDAERAPV	SEQ ID No: 126	B44

Como se puede ver a partir de las Tablas 2 y 3, Rv3616c
contiene un número de epítopos de células-T CD4+ y CD8 predichos.
Adicionalmente, esta información sugiere que la proteína lleva
epítopos que pueden ser reconocidos por los HLAs que se presentan
en todo el mundo (es decir, los HLAs de individuos caucásicos,
africanos, asiáticos, o latinoamericanos – véase el sitio web en
www.allelefrequencies.net).

293

EJEMPLO 3 - IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS DE Rv3616c

Se preparó un número de 30 péptidos traslapados que cubrían la longitud completa de Rv3616c (véase la Figura 1 para conocer los detalles, y las SEQ ID Nos: 127 a 156), y se probaron para determinar su capacidad para estimular las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de cuatro donadores PPD+.

Los datos, mostrados en la Figura 2, revelan que los péptidos 1 a 7 y 17 a 30 fueron inmunogénicos para estos individuos.

Se debe observar que los péptidos 8 a 16 (residuos de aminoácidos 92 a 215) pueden ser inmunogénicos en otros individuos que tengan un tipo de HLA diferente.

EJEMPLO 4 – HOMÓLOGOS DE H37Rv

Las secuencias de Rv3616c a partir de un número de cepas de *M. tuberculosis* y BCG se identificaron utilizando búsquedas BLASTP de GenBank (secuencia de referencia H37Rv, número de acceso NP_218133.1):

Cepa	Número de Acceso	% de Identidad
CDC1551	NP_338263.1	99
F11	YP_001289574.1	99
Haarlem	ZP_02248979.1	99
C	ZP_00877472.1	99

2014

Cepa	Número de Acceso	% de Identidad
BCG	YP_979759.1	99

5 La alineación de las secuencias homólogas indica un alto nivel de identidad.

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Cuantificación de las respuestas de células-T al Rv3616c

10 Los polipéptidos se pueden rastrear para determinar su capacidad para activar las células-T (inducción de proliferación y/o producción de citoquinas) en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o en las preparaciones de sangre entera a partir de los individuos infectados (tal como latentemente infectados).

15 Los individuos latentemente infectados normalmente se identifican mediante una prueba de la piel que tiene un diámetro mayor de 10 milímetros y sin síntomas, sin cultivo positivo de Mtb, con un esputo negativo, y sin lesión (como se detecta mediante rayos-X del pecho).

20 Se pueden utilizar un número de ensayos *in vitro*, basándose en muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o en sangre entera: después de la re-estimulación en la presencia del antígeno (o de la variante/del fragmento inmunogénico del mismo, como sea apropiado), se puede determinar la proliferación de las células (como se mide mediante CFSE/citometría de flujo), o se
25 puede cuantificar la producción de citoquinas (presentes en las

células del sobrenadante de cultivo y medidas mediante ELISA, o, después del tñido intracelular de las células-T CD4 y CD8 y del análisis mediante citometría de flujo).

Por ejemplo, las muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se pueden obtener a partir de sangre entera heparinizada, mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque siguiendo los procedimientos convencionales. Las células entonces se pueden lavar y crioconservar en nitrógeno líquido hasta la prueba (para otros detalles, véase Lalvani A y colaboradores, *J. Infect. Dis.* 1999 180: 1656-1664).

Proliferación de Células-T

La respuesta inmunitaria específica se puede caracterizar llevando a cabo el análisis de la proliferación de linfocitos utilizando la timidina tritiada. Esta técnica evalúa la expansión celular después de la estimulación *in vitro* a un antígeno. En la práctica, proliferación celular se determina mediante la estimación de la incorporación de la timidina tritiada en el ADN, un proceso estrechamente relacionado con los cambios subyacentes en el número de células.

De una manera más adecuada, la proliferación de linfocitos se puede llevar a cabo utilizando el succinimidil-éster de diacetato de carboxi-fluoresceína (CFSE). El CFSE se acopla de una manera espontánea e irreversible tanto con las proteínas intracelulares como con las proteínas de superficie celular, mediante su reacción con las cadenas laterales de lisina y otros grupos amina disponibles. Cuando se dividen las células de linfocitos, el marcado con CFSE se

distribuye igualmente entre las células hijas, las cuales, por consiguiente, son la mitad de fluorescentes que las progenitoras. Como un resultado, la mitad de la intensidad de fluorescencia celular marca cada generación sucesiva en una población de células proliferantes, y es fácilmente seguida mediante citometría de flujo (para otros detalles, véase Hodgkins, PD y colaboradores, *J. Exp. Med.* 1996 184: 277-281).

Prácticamente, después de la descongelación, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se pueden lavar y teñir con CFSE antes de cultivarse (2×10^5 células) durante 72 horas con 10 microgramos/mililitro de antígeno en el medio de cultivo (RPMI-1640 complementado con glutamina, aminoácidos no esenciales, piruvato, y suero AB humano inactivado por calor). Las células entonces se pueden cosechar, y se puede caracterizar su fenotipo utilizando teñido superficial para identificar las células-T CD8 y CD4+ de memoria. Subsiguientemente, se puede utilizar el análisis de citometría de flujo para indicar el grado de proliferación de linfocitos en respuesta a cada antígeno (proporción de las células con una intensidad de CFSE reducida después de la estimulación *in vitro*).

Producción de Citoquina

La producción de IFN- γ (o la producción de otras citoquinas, tales como, por ejemplo, IL2, TNF-alfa, IL5, IL12, etc.), se puede medir utilizando una ensayo de inmunoabsorción enlazado con enzimas (ELISA). Las placas ELISA se pueden recubrir con un

anticuerpo monoclonal de ratón dirigido hacia el IFN- γ humano (PharMingen, San Diego, CA) en suero regulado con fosfato (PBS) durante cuatro horas a temperatura ambiente. Entonces los pozos se bloquean con suero regulado con fosfato (PBS) que contiene leche descremada y deshidratada al 5 por ciento (peso/volumen) durante 1
5 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan entonces, por ejemplo, seis veces, en suero regulado con fosfato/TWEEN-20 al 0.2 por ciento, y las muestras se diluyen a 1:2 en el medio de cultivo en las placas ELISA, y se incuban durante la noche a temperatura
10 ambiente. Las placas se lavan nuevamente, y se puede agregar a cada pozo un suero policlonal de IFN- γ de conejo anti-humano, por ejemplo, diluido a 1:3000 en suero regulado con fosfato (PBS)/suero normal de cabra al 10 por ciento. Las placas se incuban entonces durante dos horas a temperatura ambiente, se lavan, y se puede
15 agregar IgG anti conejo acoplada con peroxidasa de radícula roja (Sigma Chemical So., St. Louis, MO), por ejemplo, a una dilución de 1:2000 en suero regulado con fosfato (PBS)/leche descremada y deshidratada al 5 por ciento. Después de una incubación adicional durante dos horas a temperatura ambiente, las placas se lavan, y se
20 agrega el sustrato de TMB. La reacción se puede interrumpir después de 20 minutos con ácido sulfúrico 1 N. Entonces se puede determinar la densidad óptica a 450 nanómetros, utilizando 570 nanómetros como la longitud de onda de referencia. Típicamente, las fracciones que dan como resultado ambas réplicas dando una OD
25 dos veces mayor que la OD media a partir de las células cultivadas

en el medio solo, se pueden considerar positivas.

EJEMPLO 5 – INMUNOGENICIDAD EN RATONES CB6F1

La inmunogenicidad del antígeno se evaluó en ratones CB6F1 (cruza de la primera generación de ratones BALB/c y C57BL/6).

5 Los ratones CB6F1 se inmunizaron intramuscularmente tres veces (en el día 0, en el día 14, y en el día 28) con 0.5 microgramos del antígeno de proteína en combinación con el sistema adyuvante AS01E (una formulación adyuvante liposomal que comprende 3D-MPL y QS21).

10 El diseño experimental fue como sigue:

Grupo	Día 0	Día 14	Día 28
1	0.5 µg Rv3616c/AS01E	0.5 µg Rv3616c/AS01E	0.5 µg Rv3616c/AS01E

15

Se utilizaron un total de 24 ratones en el grupo del protocolo.

Se recolectaron linfocitos de sangre periférica (PBL), y se reservaron en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización), y en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización), y la respuestas de células-T CD4 y CD8 específicas del antígeno (determinadas por las células-T CD4 o CD8 productoras de IL-2 y/o IFN-gamma y/o TNF-alfa) se midieron mediante citometría de flujo después de la re-estimulación *in vitro* durante la noche con las reservas de péptidos 15mer que cubrían las secuencias de interés.

20

25

La detección de las células-T de ratón que expresan IL-2 y/o IFN-gamma y/o TNF-alfa, se hizo utilizando amplificación *in vitro* impulsada por el antígeno de corto plazo de la expresión de citoquina.

5 Dicho de una manera breve, se agregó la solución PharmLyse (BD-Pharmingen) a la sangre periférica de ratón heparinizada, con el objeto de lisar los glóbulos rojos sanguíneos. Los PBLs (linfocitos de sangre periférica) obtenidos se lavaron, y entonces se incubaron en la presencia de una reserva de péptidos 15-mer - traslapados por 11
10 aminoácidos - que cubrían la secuencia del antígeno de interés, y de 1 microgramo/mililitro de anticuerpos para CD28 y CD49d (BD-Pharmingen). Cada péptido 15-mer se utilizó en una concentración final de 1 microgramo/mililitro. Los controles del medio también se estimularon con anticuerpos para CD28 y CD49d.

15 La secreción de citoquina que bloqueó el compuesto de brefeldina-A (BD-Pharmingen) se le agregó 2 horas después del establecimiento de los cultivos a 37°C, con CO₂ al 5 por ciento, y las células se mantuvieron a 37°C, con CO₂ al 5 por ciento durante 4 horas adicionales, seguido por una incubación por durante la noche a
20 +4°C.

Entonces las células se cosecharon y se tiñeron con anti-CD4 acoplado con Pacific Blue (BD - clon RM4-5, BD-Pharmingen), y anticuerpos anti-CD8 alfa (clon 53-6.7, BD-Pharmingen) acoplados con la proteína de peridinin-clorofila-A (PerCp).

25 Luego las células se lavaron, se fijaron, se permeabilizaron (kit

Cytofix-cytoperm, BD-Pharmingen), y se tiñeron con anticuerpos anti-IFN-g acoplados con alofococianina (clon XMG1.2, BDPharmingen), anticuerpos anti-IL-2 acoplados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (clon JES 6-5H4, Beckman Coulter), y anticuerpos anti-TNF alfa acoplados con ficoeritrina (PE) (clon MP6-XT22, BDPharmingen). Después de los lavados finales, las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo LSR II (Beckton-Dickinson). Se adquirió un número mínimo de 10,000 células en el subconjunto CD8+.

10 Para mayores antecedentes, véase Walzer T y colaboradores, *Cell Immunol.* 2000 206(1): 16-25 y Maecker HT y colaboradores, *J. Immunol. Methods* 2001 255(1-2): 27-40.

 Como controles negativos, también se cultivaron algunas células durante la noche *in vitro* en el medio de cultivo (no
15 estimulado). Las respuestas específicas del antígeno se calcularon mediante la sustracción de la respuesta de citoquina promedio producida por las células no estimuladas a partir de la respuesta de citoquina promedio producida por las células estimuladas con el péptido.

20 En cada punto del tiempo y para cada grupo, se recolectaron los datos a partir de 4 reservas de 6 ratones cada una. Los datos se presentan más adelante como el porcentaje de células-T CD4 o CD8 productoras de IL-2 y/o IFN-gamma y/o TNF-alfa. Se grafica cada reserva individual de ratones (triángulos), así como el valor promedio
25 del grupo (barra).

La Figura 3 muestra que en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización), las respuestas de células-T CD4 y CD8 específicas de Rv3616c se detectan en los ratones inmunizados 0.5 microgramos de Rv3616c/AS01E.

5 La Figura 4 muestra el perfil de citoquina de la respuesta de células-T CD4 a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulados por la reserva del péptido de Rv3616c (no removidos del medio) en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización).

10 La Figura 5 muestra el perfil de citoquina de la respuesta de células-T CD8 a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulados por la reserva del péptido de Rv3616c (no removidos del medio) en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización).

15 La Figura 6 muestra que, en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización), se detectan las respuestas de células-T CD4 y CD8 específicas de Rv3616c en los ratones inmunizados con 0.5 microgramos de Rv3616c/AS01E.

20 La tercera dosis aumenta la respuesta de células-T CD4, pero no la respuesta de células-T CD8. Debido a las dificultades técnicas, solamente estuvieron disponibles los datos para una sola reserva.

25 La Figura 7 muestra el perfil de citoquina de la respuesta de células-T CD4 a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulados por la reserva del péptido de Rv3616c (sin remover el medio) en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera

inmunización). Debido a las dificultades técnicas, solamente estuvieron disponibles los datos para una sola reserva.

La Figura 8 muestra el perfil de citoquina de la respuesta de células-T CD8 a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulados por la reserva del péptido de Rv3616c (sin remover el medio) en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización). Debido a las dificultades técnicas, solamente estuvieron disponibles los datos para una sola reserva.

EJEMPLO 6 – INMUNOGENICIDAD EN RATONES C57BL/6

La inmunogenicidad del antígeno también se evaluó en ratones C57BL/6.

Los ratones C57BL/6 se inmunizaron intramuscularmente tres veces (en el día 0, en el día 14, y en el día 28) con 1 microgramo o con 4 microgramos del antígeno de proteína en combinación con un sistema adyuvante AS01E (una formulación de adyuvante liposomal que comprende 3D-MPL y QS21)..

El diseño experimental fue como sigue:

Grupo	Día 0	Día 14	Día 28
1	1 µg Rv3616c/AS01E	1 µg Rv3616c/AS01E	1 µg Rv3616c/AS01E

Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se recolectaron y se reservaron en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización), y en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización), y las respuestas de células-T CD4 y CD8 específicas

del antígeno (como se determina por las células-T CD4 o CD8 productoras de IL-2 y/o IFN-gamma y/o TNF-alfa) se midieron mediante citometría de flujo después de la re-estimulación *in vitro* durante la noche con las reservas de los péptidos 15mer que cubrían las secuencias de interés. El procedimiento seguido fue como se describe anteriormente.

Como controles negativos, también se cultivaron algunas células durante la noche *in vitro* en el medio de cultivo (no estimulado). Las respuestas específicas del antígeno se calcularon mediante la sustracción de la respuesta de citoquina promedio producida por las células no estimuladas a partir de la respuesta de citoquina promedio producida por las células estimuladas con el péptido.

En cada punto del tiempo y para cada grupo, se recolectaron los datos a partir de 4 reservas de 6 ratones cada una. Los datos se presentan más adelante como el porcentaje de células-T CD4 o CD8 productoras de IL-2 y/o IFN-gamma y/o TNF-alfa. Se grafica cada reserva individual de ratones (triángulos), así como el valor promedio del grupo (barra).

La Figura 9 muestra que en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda inmunización), se detectan las respuestas de células-T CD4 y CD8 específicas de Rv3616c en los ratones inmunizados con 1 microgramo de Rv3616c/AS01E, aunque la respuesta de células-T específica del antígeno es muy baja (por consiguiente, no se muestran los datos del perfil de citoquina).

La Figura 10 muestra el perfil de citoquina de la respuesta de células-T CD4 a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulados por la reserva del péptido de Rv3616c (no removidos del medio) en el día 21 (es decir, 7 días después de la segunda
5 inmunización).

La Figura 11 muestra que en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización), se detectan las respuestas de células-T CD4 y CD8 específicas de Rv3616c en los ratones inmunizados con 1 microgramo de Rv3616c/AS01E. Una tercera
10 dosis de inmunización aumenta las respuestas de células-T CD4, pero sólo ligeramente la respuesta de células-T CD8.

La Figura 12 muestra el perfil de citoquina de la respuesta de células-T CD4 a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulados por la reserva del péptido de Rv3616c (sin remover el
15 medio) en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización).

La Figura 13 muestra el perfil de citoquina de la respuesta de células-T CD8 a partir de los linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulados por la reserva del péptido de Rv3616c (sin remover el
20 medio) en el día 35 (es decir, 7 días después de la tercera inmunización).

EJEMPLO 7 – RECONOCIMIENTO *IN VITRO* MEDIANTE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) A PARTIR DE SERES HUMANOS CON TUBERCULOSIS (TB) LATENTE

25 Los experimentos se llevaron a cabo con el objeto de evaluar la

respuesta de células-T de sangre periférica al antígeno de la invención en 4 adultos sanos limpios de tuberculosis (TB) (prueba de la piel PPD = 0 milímetros), y en 8 adultos sanos latentemente infectados con tuberculosis (TB) (prueba de la piel PPD = 15 milímetros o más) de Sudáfrica.

PPD Piel Prueba Data

	No. de ID Individual	Diámetro de Induración (mm)
	4	0
10	5	0
	33	0
	38	0
15	36	15
	46	15
	13	15
	7	16
20	58	25
	74	26
	8	53
25	60	55

2.26

La respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) se evaluó mediante la medición de citoquinas en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) aisladas, mediante el ensayo de teñido de citoquina intracelular (ICS).

5 La respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) llevada a cabo fue una adaptación de la metodología previamente descrita (véase Von Eschen y colaboradores, *Hum. Vaccin.* 2009 5(7)). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se estimularon *in vitro* mediante una reserva de péptidos 15-mer - traslapados por
10 11 aminoácidos - que cubrían la secuencia entera del antígeno de interés. Las células se estimularon con péptidos durante 2 horas, se cultivaron adicionalmente durante la noche en la presencia de Brefeldina A, se procesaron para el ensayo de teñido de citoquina intracelular (ICS), y se analizaron utilizando citometría de flujo. Se
15 midieron las frecuencias de las células-T CD3+CD4+ o CD3+CD8+ específicas del antígeno que expresaban IFN-gamma y/o TNF-alfa y/o IL-17. Las respuestas de células estimuladas por el medio se sustrajeron a partir de las respuestas obtenidas en las células estimuladas por las reservas de péptidos.

20 *ICS: Anticuerpos*

Anti-CD3 PO (Invitrogen – cat CD0330)

Anti-CD4 PB (BD - cat 558116)

Anti-CD8 APC-H7 (BD – cat 641400)

Anti-IFNg AF700 (BD-Pharmingen – cat 557995)

25 Anti-TNF PE-Cy7 (BD-Pharmingen – cat 557647)

Anti-IL17 AF647 (BD-Pharmingen – cat 51-7178-71)

Los resultados se presentan como el número de células-T CD3+CD4+ específicas del antígeno que expresan TNF-alfa e IFN-gamma, por millón de células-T CD3+CD4+, debido a que estas células representan la población principal de las células-T CD4 específicas del antígeno (el nivel de respuesta del fondo debido a que se remueve el medio). No se detectaron células-T CD3+CD8+ específicas del antígeno. La Figura 10 muestra que se mide una respuesta de células-T CD4 específica del antígeno en 7 de 8 individuos latentemente infectados (no en los individuos números 7 y 74) cuando se compara con la respuesta de células-T CD4 no específica medida en los individuos limpios.

En conclusión, se puede observar que el antígeno Rv3616c es capaz de provocar una respuesta inmunitaria tanto en los ratones CB6F1 como en los ratones C57BL/6. Adicionalmente, el perfil de producción de citoquina indica que una gran proporción de células-T específicas del antígeno expresan una pluralidad de citoquinas asociadas con Th1 (es decir, se provoca una respuesta polifuncional de células-T). Es importante que estén presentes las células-T específicas del antígeno, tanto CD4 como CD8, después de la inmunización; las células CD8 pueden ser particularmente importantes en un escenario de la tuberculosis (TB) latente. La relevancia del Rv3616c para la infección humana se confirma por el alto nivel de reconocimiento en los individuos latentemente infectados de Sudáfrica, y la ausencia de respuestas en los sujetos

limpios. Por consiguiente, se puede esperar que el Rv3616c sea de un valor sustancial en la prevención, el tratamiento, y el diagnóstico de la infección por tuberculosis latente.

5 Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a manera de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, será fácilmente evidente para un experto ordinario en este campo, a la luz de las enseñanzas de esta invención, que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 Todas las referencias citadas en esta solicitud, incluyendo las patentes y solicitudes de patente, se incorporan en la presente como referencia hasta el grado más completo posible, como si cada publicación o solicitud de patente individual fuera específicamente e individualmente indicada como incorporada por referencia.

15 A través de toda la memoria descriptiva y de las siguientes reivindicaciones, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, se entenderá que la palabra "comprenden", y las variaciones tales como "comprende" y "comprendiendo", implican la inclusión de un entero, paso, grupo de enteros, o grupo de pasos mencionado,
20 pero no la exclusión de cualquier otro entero, paso, grupo de enteros, o grupo de pasos.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado, el cual comprende:
 - (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
 - 5 (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
 - (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c,para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de
- 10 tuberculosis (TB) latente.
2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende una secuencia de proteína de Rv3616c.
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, el cual consiste en una secuencia de proteína de Rv3616c.
- 15 4. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c.
5. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, el cual comprende una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c que tiene cuando menos el 70 por ciento de identidad con el mismo.
- 20 6. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, el cual comprende una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c que tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad con el mismo.
7. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6, el cual comprende una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c
- 25 que tiene cuando menos el 95 por ciento de identidad con el mismo.

8. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, el cual consiste en una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c.

9. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 8, el cual consiste en una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c
5 que tiene cuando menos el 70 por ciento de identidad con el mismo.

10. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9, el cual consiste en una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c que tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad con el mismo.

11. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, el
10 cual consiste en una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c que tiene cuando menos el 95 por ciento de identidad con el mismo.

12. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína
15 de Rv3616c.

13. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 12, el cual comprende un fragmento inmunogénico de cuando menos 10 residuos de aminoácidos a partir de una secuencia de proteína de Rv3616c.

14. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 13, el
20 cual comprende un fragmento inmunogénico de cuando menos 20 residuos de aminoácidos a partir de una secuencia de proteína de Rv3616c.

15. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 14, el
25 cual comprende un fragmento inmunogénico de cuando menos 50

residuos de aminoácidos a partir de una secuencia de proteína de Rv3616c.

16. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 12, el cual consiste en un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c.

17. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 16, el cual consiste en un fragmento inmunogénico de cuando menos 10 residuos de aminoácidos a partir de una secuencia de proteína de Rv3616c.

18. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 17, el cual consiste en un fragmento inmunogénico de cuando menos 20 residuos de aminoácidos a partir de una secuencia de proteína de Rv3616c.

19. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 18, el cual consiste en un fragmento inmunogénico de cuando menos 50 residuos de aminoácidos a partir de una secuencia de proteína de Rv3616c.

20. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la secuencia de proteína de Rv3616c es a partir de *Mycobacterium tuberculosis*.

21. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la proteína de Rv3616c tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

22. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para utilizarse en el tratamiento de

tuberculosis latente.

23. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para utilizarse en la prevención de tuberculosis latente.

5 24. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para utilizarse en la prevención de la reactivación de tuberculosis.

25. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para utilizarse en la demora de la reactivación de tuberculosis.

26. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en donde la tuberculosis está asociada con una infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

27. Un polinucleótido aislado, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- 20 (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c,

para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

28. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 27, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un

polipéptido que comprende una secuencia de proteína de Rv3616c.

29. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 28, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c.

30. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 29, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c que tiene cuando menos el 70 por ciento de identidad con el mismo.

31. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 27, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c.

32. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 31, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de cuando menos 10 residuos de aminoácidos a partir de una secuencia de proteína de Rv3616c.

33. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o

(iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c

34. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 33, el cual consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c.

35. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34, en donde la secuencia de proteína de Rv3616c es a partir de *Mycobacterium tuberculosis*.

36. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 35, en donde la proteína de Rv3616c tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

37. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 36, el cual comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma.

38. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37, para utilizarse en el tratamiento de tuberculosis latente.

39. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37, para utilizarse en la prevención de tuberculosis latente.

40. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37, para utilizarse en la prevención de la reactivación de tuberculosis.

5 41. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 37, para utilizarse en la demora de la reactivación de tuberculosis.

42. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, en donde la tuberculosis está asociada con una infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

10 43. Una composición farmacéutica, la cual comprende:

(a) un polipéptido que comprende:

(i) una secuencia de proteína de Rv3616c;

(ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o

15 (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c; o

(b) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de (a);

y

20 (c) un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable,

para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

44. Una composición inmunogénica, la cual comprende:

25 (a) un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c; o

(b) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de (a);

y

- (c) un potenciador de la respuesta inmunitaria no específica,

para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

45. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el potenciador de la respuesta inmunitaria no específica es un adyuvante.

46. Un método para el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente, el cual comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c;

a un sujeto que lo necesite, en donde este polipéptido induce una respuesta inmunitaria.

47. Un método para el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente, el cual comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que
5 comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de
10 proteína de Rv3616c;

a un sujeto que lo necesite, en donde este polinucleótido induce una respuesta inmunitaria.

48. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 ó 47, en donde el polipéptido o el polinucleótido
15 se administra como una composición farmacéutica.

49. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 ó 47, en donde el polipéptido o el polinucleótido se administra como una composición inmunogénica.

50. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 49, en donde el sujeto es un mamífero.
20

51. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el sujeto es un ser humano.

52. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 51, en donde el sujeto tiene tuberculosis
25 activa.

53. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 51, en donde el sujeto tiene tuberculosis latente.

54. El método de acuerdo con cualquiera de las
5 reivindicaciones 46 a 51, en donde el sujeto no tiene tuberculosis.

55. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 54, en donde el sujeto fue previamente inmunizado con *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG).

56. El método de acuerdo con cualquiera de las
10 reivindicaciones 46 a 55, en donde la secuencia de proteína de Rv3616c es a partir de *Mycobacterium tuberculosis*.

57. El método de acuerdo con la reivindicación 56, en donde la proteína de Rv3616c tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

58. El método de acuerdo con cualquiera de las
15 reivindicaciones 46 a 57, el cual comprende además la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos efectivos en el tratamiento de tuberculosis.

59. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el uno o más agentes quimioterapéuticos se seleccionan a partir de
20 isoniazida y rifampina.

60. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 59, el cual comprende además la administración de cuando menos un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* adicional.

25 61. El método de acuerdo con la reivindicación 60, en donde

el antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* adicional se proporciona en la forma de un polipéptido.

62. El método de acuerdo con la reivindicación 61, en donde el polipéptido que comprende:

- 5 (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c;

10 y el antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* adicional, se proporcionan en la forma de una proteína de fusión.

63. El método de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* adicional se proporciona en la forma de un polinucleótido.

15 64. El método de acuerdo con la reivindicación 63, en donde el polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- 20 (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c;

y el antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* adicional, se proporcionan en la forma de una sola secuencia de polinucleótido.

25 65. El método de acuerdo con la reivindicación 64, en donde

la única secuencia de polinucleótido mencionada codifica una proteína de fusión que contiene el antígeno Rv3616c y el antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* adicional.

5 66. El método de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* adicional se proporciona en la forma de un *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG).

67. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 66, en donde el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente se refiere al tratamiento de tuberculosis latente.

10 68. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 66, en donde el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente se refiere a la prevención de tuberculosis latente.

15 69. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 66, en donde el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente se refiere a la prevención de la reactivación de tuberculosis.

20 70. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 66, en donde el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente se refiere a la demora de la reactivación de tuberculosis.

71. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 70, en donde la tuberculosis está asociada con una infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

25 72. El método de acuerdo con la reivindicación 71, en donde

la infección por *Mycobacterium tuberculosis* está asociada con una cepa resistente a múltiples fármacos de *Mycobacterium tuberculosis*.

73. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46 a 72, el cual induce una respuesta inmunitaria
5 contra la infección por *M. tuberculosis*.

74. El uso de un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- 10 (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c;

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente.

75. El uso de un polinucleótido que comprende una secuencia
15 de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- (ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o
- 20 (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c;

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de tuberculosis latente.

76. Una proteína de fusión, la cual comprende un polipéptido que comprende:

- 25 (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;

(ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o

(iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c,

5 para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

77. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende:

10 (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;

(ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o

(iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de proteína de Rv3616c,

15 para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de tuberculosis (TB) latente.

78. Un polinucleótido que comprende una primera secuencia de nucleótidos, la cual se hibrida selectivamente bajo condiciones moderadamente restringentes con el complemento de una segunda
20 secuencia de nucleótidos, la cual codifica un polipéptido que comprende:

(i) una secuencia de proteína de Rv3616c;

(ii) una variante de una secuencia de proteína de Rv3616c; o

25 (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de

proteína de Rv3616c,
para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de
tuberculosis (TB) latente.

79. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 78, el
5 cual comprende una primera secuencia de nucleótidos, la cual se
hibrida selectivamente bajo condiciones altamente restringentes, con
el complemento de una segunda secuencia de nucleótidos, la cual
codifica un polipéptido que comprende:

- (i) una secuencia de proteína de Rv3616c;
- 10 (ii) una variante de una secuencia de proteína de
Rv3616c; o
- (iii) un fragmento inmunogénico de una secuencia de
proteína de Rv3616c,
para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de
15 tuberculosis (TB) latente.

80. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 78 ó 79, el cual comprende una primera secuencia
de nucleótidos, la cual se hibrida selectivamente con el complemento
de la SEQ ID NO: 2.

- 20 81. Un kit de diagnóstico, el cual comprende:
- (a) un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1;
 - (b) un aparato suficiente para poner en contacto este
polipéptido con una muestra (por ejemplo, sangre entera, o de una
manera más adecuada, células mononucleares de sangre periférica
25 (PBMC)) a partir de un individuo; y

(c) medios para cuantificar la respuesta de células-T de la muestra.

82. Un kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 81, el cual comprende:

- 5 (a) un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1;
- (b) un aparato suficiente para poner en contacto este polipéptido con una muestra (por ejemplo, sangre entera, o de una manera más adecuada, células mononucleares de sangre periférica (PBMC)) a partir de un individuo; y
- 10 (c) medios para cuantificar y caracterizar la respuesta de células-T de la muestra.

83. Un kit de diagnóstico, el cual comprende:

- (a) un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1;
- (b) un aparato suficiente para poner en contacto este
- 15 polipéptido con una muestra (por ejemplo, sangre entera, o de una manera más adecuada, células mononucleares de sangre periférica (PBMC)) a partir de un individuo; y
- (c) medios para cuantificar la respuesta de células-B de la muestra.

20 84. Un kit de diagnóstico, el cual comprende:

- (a) un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1; y
- (b) un aparato suficiente para poner en contacto este polipéptido con las células dérmicas de un paciente.

85. Un kit de diagnóstico, el cual comprende:

- 25 (a) un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1; y

(c) medios para cuantificar la respuesta de células-T en una muestra a partir de un individuo (por ejemplo, sangre entera, o de una manera más adecuada, células mononucleares de sangre periférica (PBMC)).

5 86. Un kit de diagnóstico, el cual comprende:

(a) un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1; y

(c) medios para cuantificar la respuesta de células-B en una muestra a partir de un individuo (por ejemplo, sangre entera, o de una manera más adecuada, células mononucleares de sangre
10 periférica (PBMC)).

15

20

25

FIG. 2

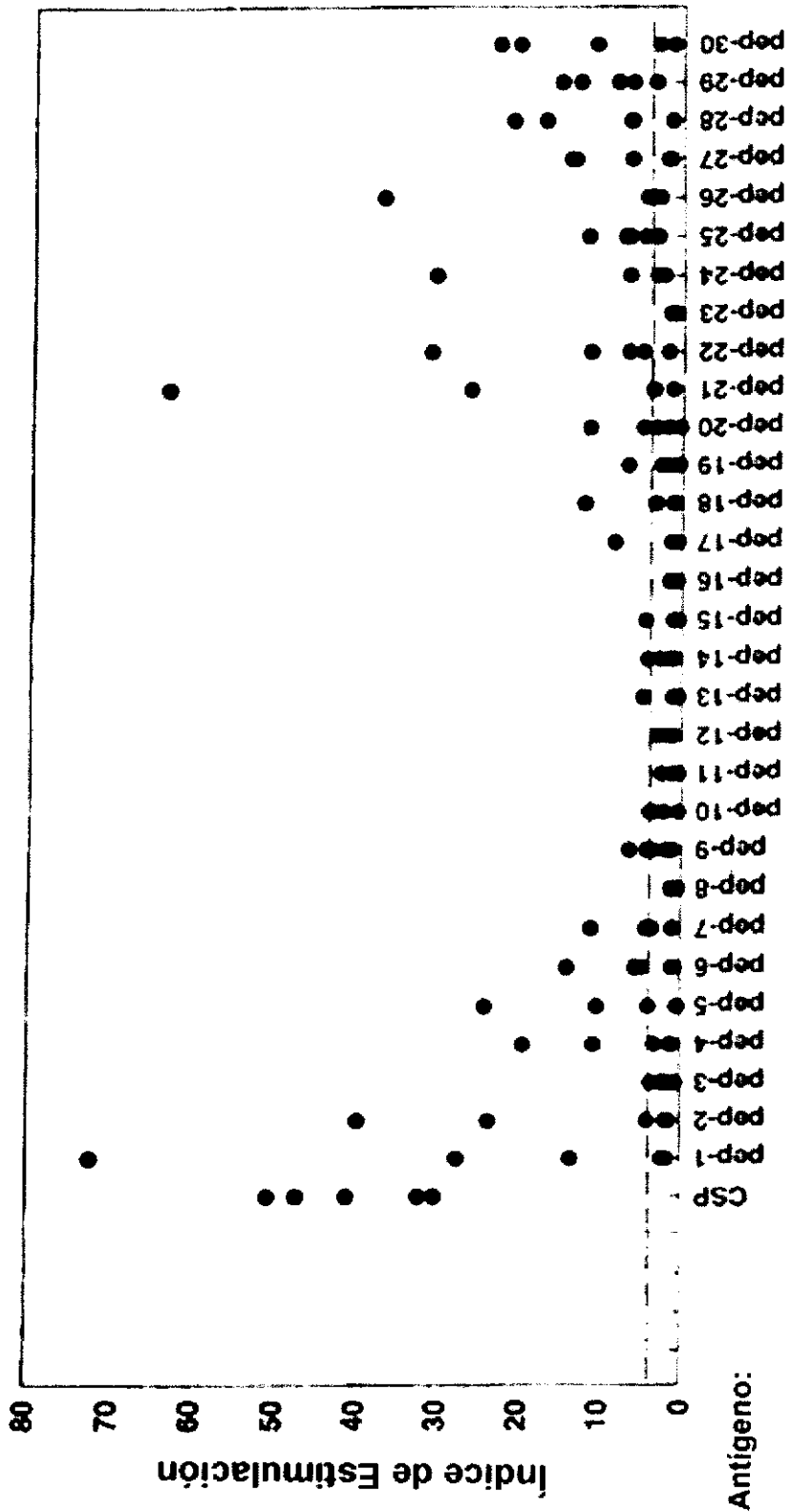


FIG. 3

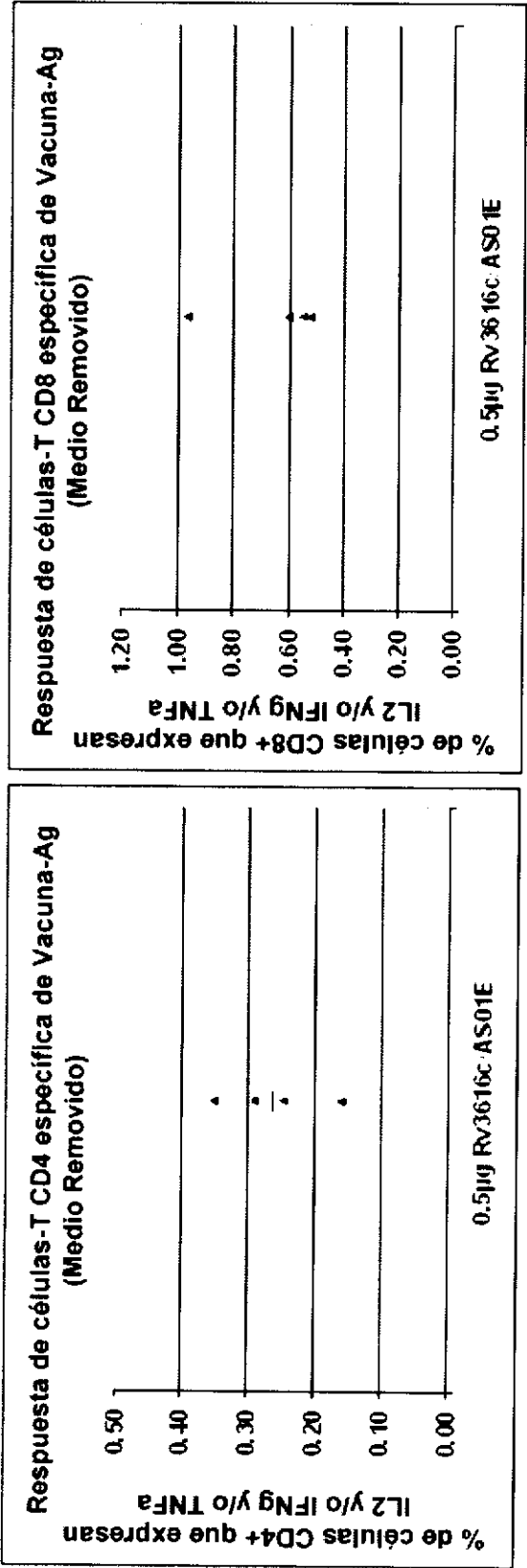


FIG. 4

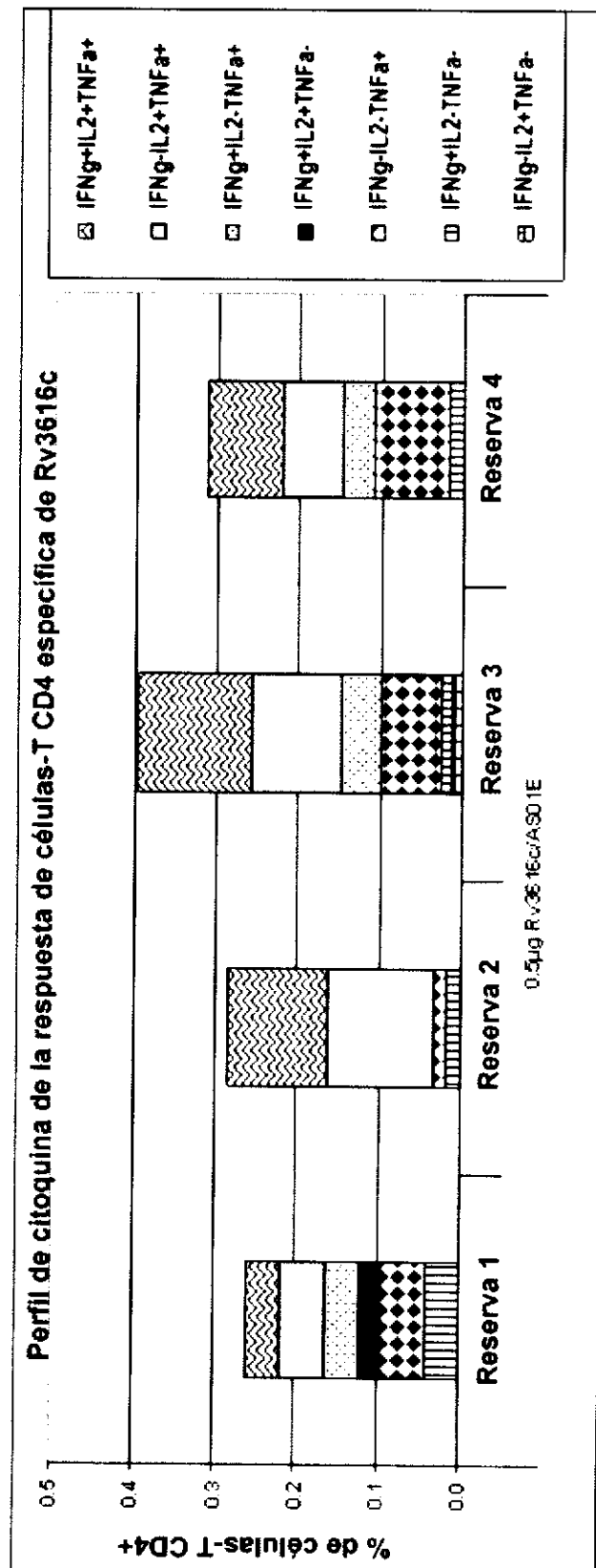


FIG. 5

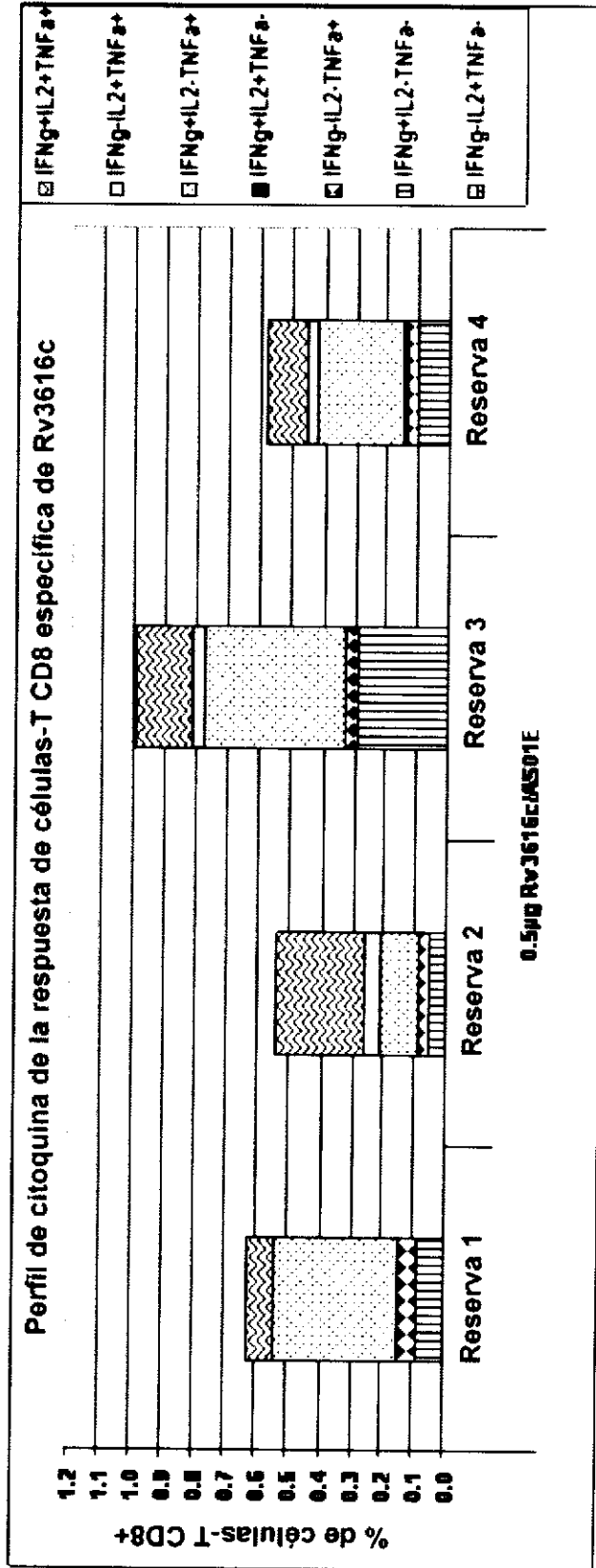


FIG. 6

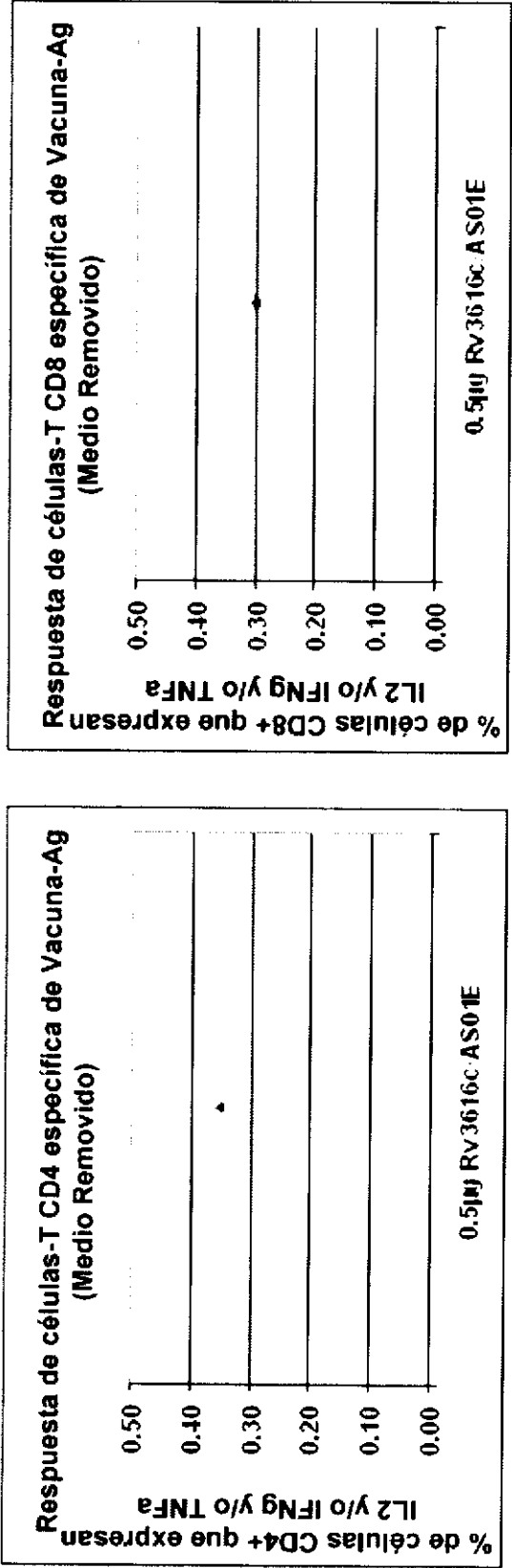


FIG. 7

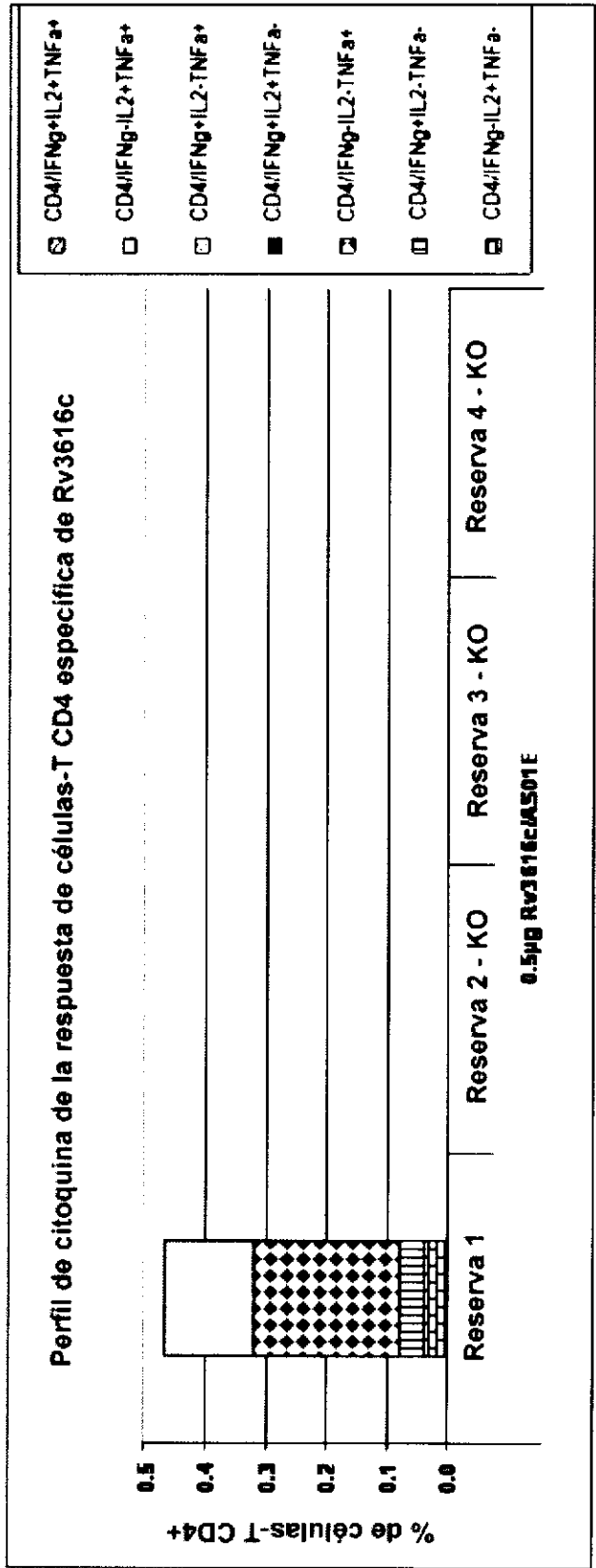


FIG. 8

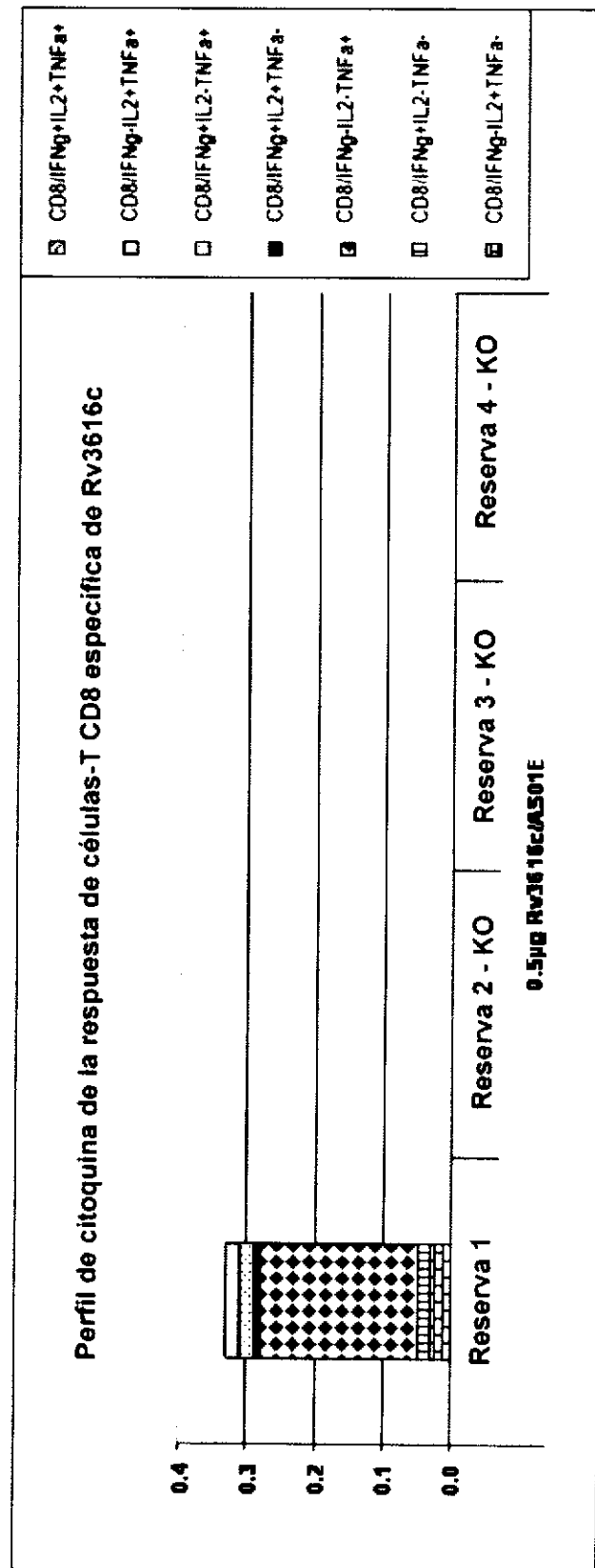


FIG. 9

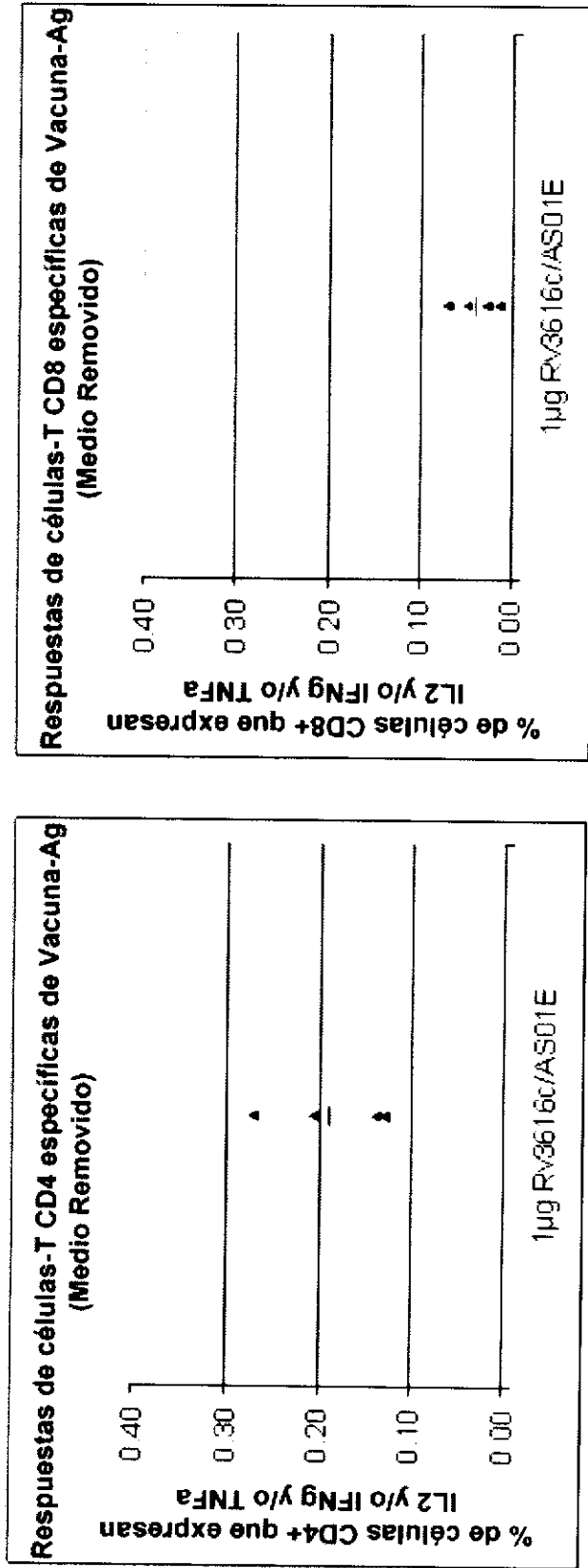
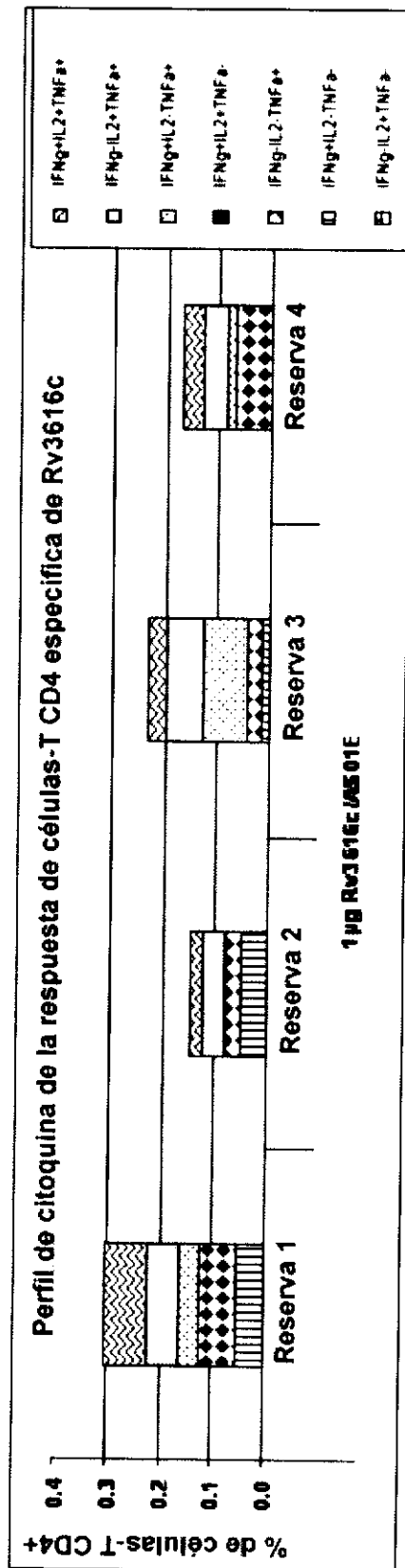


FIG. 10



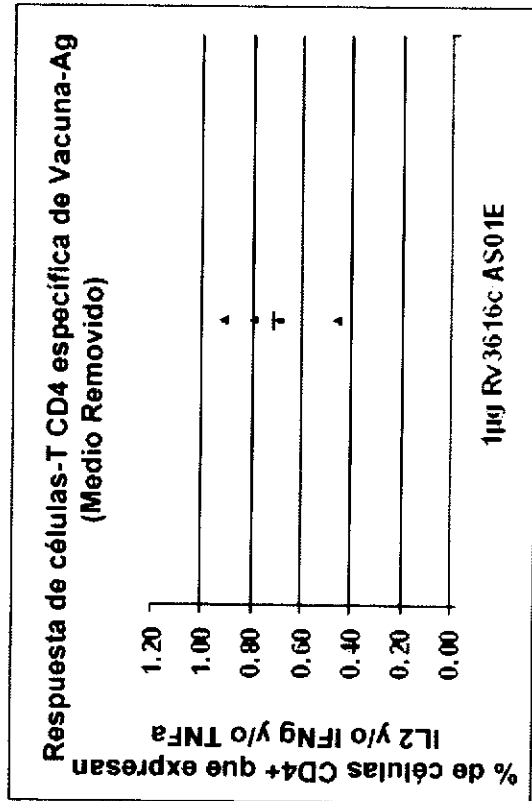


FIG. 12

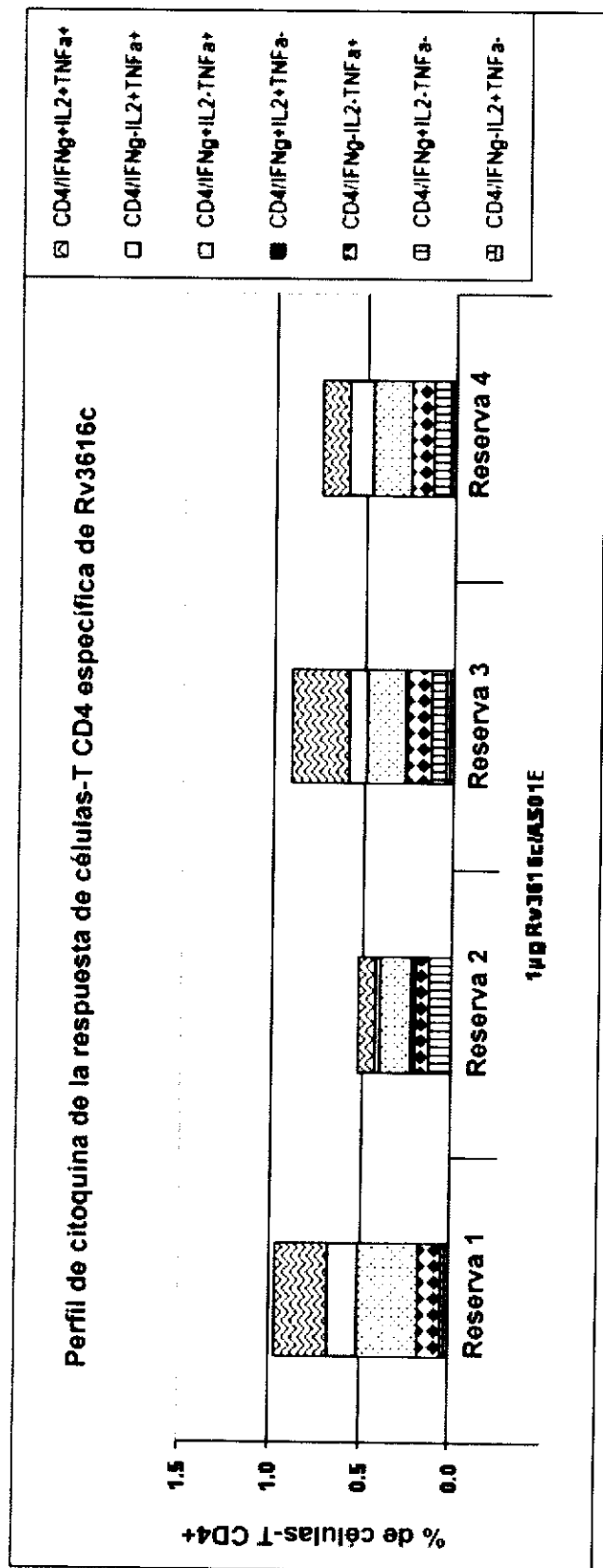


FIG. 13

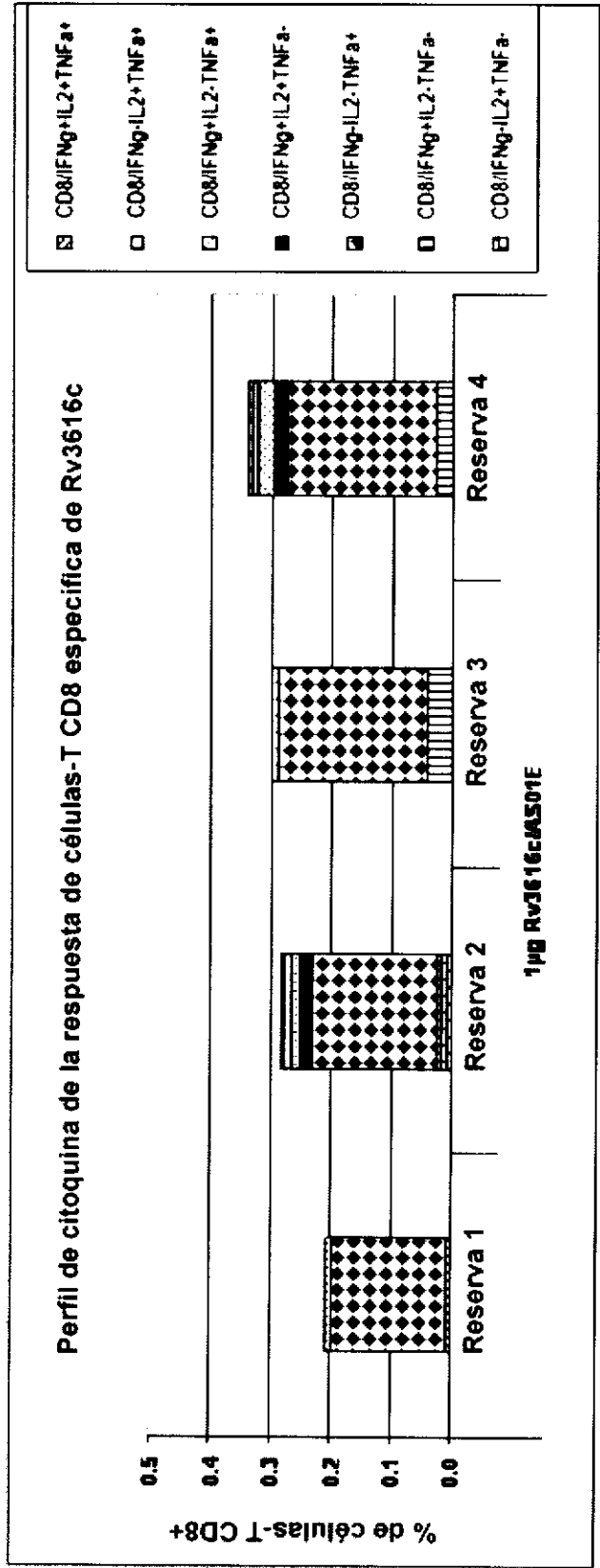
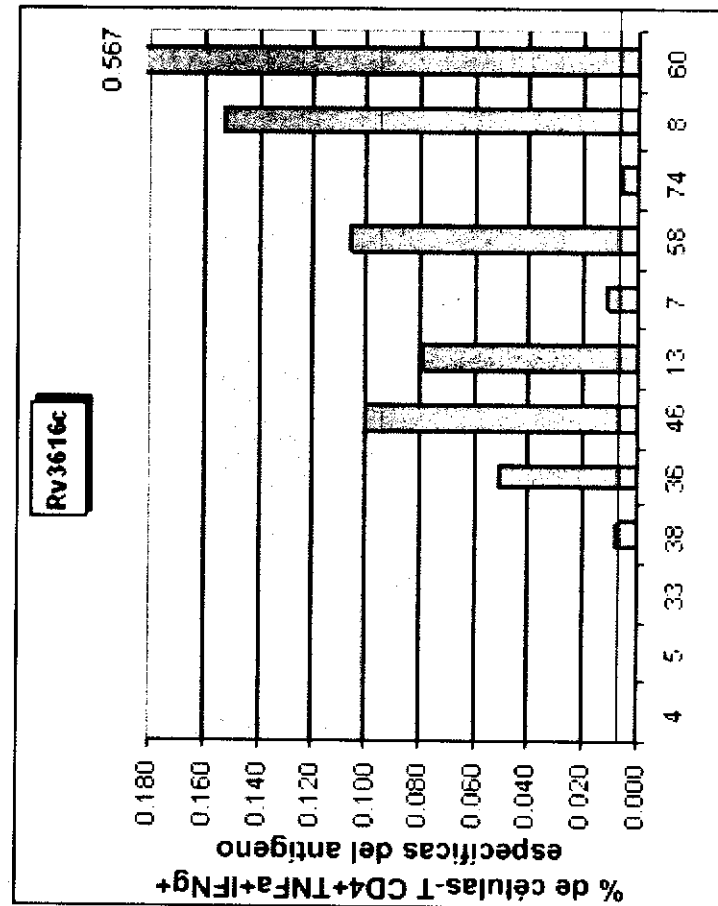


FIG. 14



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
Glaxo Group Limited
5 Mettens, Pascal
Brown, James
Murphy, Dennis
<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS NOVEDOSOS
<130> VB63090PCT
10 <150> US61/083720
<151> 2008-07-25
<160> 159
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
15 <211> 392
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_VARIAS
20 <223> Cepa H37Rv
<400> 1
Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
1 5 10 15
Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu
25 20 25 30

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

Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala
 245 250 255
 5 Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
 260 265 270
 Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe
 275 280 285
 Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln
 10 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln
 305 310 315 320
 Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met
 325 330 335
 15 Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser
 340 345 350
 Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr
 355 360 365
 Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln
 20 370 375 380
 Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
 385 390
 <210> 2
 <211> 1179
 25 <212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <221> características_varias
 <223> Cepa H37Rv
 5 <400> 2
 atgagcagag cgttcatcat cgatccaacg atcagtgcca ttgacggctt gtacgacctt 60
 ctggggattg gaatacccaa ccaaggggggt atcctttact cctcactaga gtacttcgaa 120
 aaagccctgg aggagctggc agcagcgttt ccgggtgatg gctggttagg ttcggccgcg 180
 gacaaatacg ccggcaaaaa ccgcaaccac gtgaattttt tccaggaact ggcagacctc 240
 10 gatcgtcagc tcatcagcct gatccacgac caggccaacg cggtcacagac gaccgcgac 300
 atcctggagg ggcgaagaa aggtctcgag ttctgctgcc cggtggtgtt ggacctgacc 360
 tacatcccggt tcgtcgggca cgccttatcg gccgccttcc aggcgcctgt ttgcgcgggc 420
 gcgatggcgg tagtggggcg cgcgcttgcc tacttggtcg tgaaaacgct gatcaacgcg 480
 actcaactcc tcaaattgct tgccaaattg ggcgagttgg tcgcggccgc cattgcggac 540
 15 atcatttcgg atgtggcgga catcatcaag ggcaccctcg gagaagtgtg ggagttcatc 600
 acaaacgcgc tcaacggcct gaaagagctt tgggacaagc tcacgggggtg ggtgaccgga 660
 ctgttctctc gaggggtggtc gaacctggag tccttctttg cgggcgtccc cggcttgacc 720
 ggcgcgacca ggcgcttgtc gcaagtgact ggcttggtcg gtgcggccgg tctgtccgca 780
 tcgtcgggct tggtcacgc ggatagcctg gcgagctcag ccagcttgcc cgccttgccc 840
 20 ggcattgggg ggcgggtcgg ttttgggggc ttgccgagcc tggtcaggt ccagccgccc 900
 tcaactcggc aggcgctacg gccccgagct gatggcccgg tcggcgccgc tgccgagcag 960
 gtgcgggggc agtcgcagct ggtctccgcg cagggttccc aaggtatggg cggacccgta 1020
 ggcattgggg gcatgcaccc ctcttcgggg gcgtcgaaag ggacgacgac gaagaagtac 1080
 tcggaaggcg cggcgggcgg cactgaagac gccgagcgcg cgccagtcga agctgacgcg 1140
 25 ggcggtgggc aaaaggtgct ggtacgaaac gtcgtctaa 1179

<210> 3
 <211> 392
 <212> PRT
 5 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_VARIAS
 <223> Cepa CDC1551
 <400> 3
 10 Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
 1 5 10 15
 Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala
 15 35 40 45
 Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala
 50 55 60
 Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 20 Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln
 85 90 95
 Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val
 100 105 110
 Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala
 25 115 120 125

Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val
 130 135 140
 Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala
 5 145 150 155 160
 Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala
 165 170 175
 Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Ile
 180 185 190
 10 Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys
 195 200 205
 Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg
 210 215 220
 Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr
 15 225 230 235 240
 Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala
 245 250 255
 Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
 260 265 270
 20 Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe
 275 280 285
 Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln
 25 305 310 315 320

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

Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser
5 340 345 350

Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr
355 360 365

Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln
370 375 380

10 Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
385 390

<210> 4
<211> 392
<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis
<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_VARIAS
<223> Cepa F11
<400> 4

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

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

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala
25 35 40 45

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

Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala
 245 250 255
 Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
 260 265 270
 5 Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe
 275 280 285
 Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln
 10 305 310 315 320
 Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met
 325 330 335
 Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser
 340 345 350
 15 Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr
 355 360 365
 Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln
 370 375 380
 Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
 20 385 390
 <210> 5
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 25 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS_VARIAS

<223> Ceba Haarlem A

<400> 5

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

Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Ile
 180 185 190
 Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys
 5 195 200 205
 Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg
 210 215 220
 Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 10 Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala
 245 250 255
 Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
 260 265 270
 Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe
 15 275 280 285
 Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln
 305 310 315 320
 20 Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met
 325 330 335
 Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser
 340 345 350
 Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr
 25 355 360 365

Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln
 370 375 380
 Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
 5 385 390
 <210> 6
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_VARIAS
 <223> Cepa C
 <400> 6
 Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
 15 1 5 10 15
 Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu
 20 20 25 30
 Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala
 35 40 45
 20 Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala
 50 55 60
 Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln
 25 85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val
 100 105 110
 Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala
 5 115 120 125
 Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val
 130 135 140
 Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala
 145 150 155 160
 10 Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala
 165 170 175
 Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Ile
 180 185 190
 Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys
 15 195 200 205
 Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg
 210 215 220
 Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 20 Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala
 245 250 255
 Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
 260 265 270
 Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe
 25 275 280 285

Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln
 5 305 310 315 320
 Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met
 325 330 335
 Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser
 340 345 350
 10 Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr
 355 360 365
 Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln
 370 375 380
 Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
 15 385 390
 <210> 7
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_VARIAS
 <223> Cepa BCG
 <400> 7
 Met Ser Arg Val Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
 25 1 5 10 15

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

Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg
 210 215 220
 Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr
 5 225 230 235 240
 Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala
 245 250 255
 Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
 260 265 270
 10 Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe
 275 280 285
 Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln
 15 305 310 315 320
 Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met
 325 330 335
 Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser
 340 345 350
 20 Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr
 355 360 365
 Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln
 370 375 380
 Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
 25 385 390

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5 <220>

<221> péptido_mat

<222> (29)..(110)

<400> 8

Met Arg Leu Ser Leu Thr Ala Leu Ser Ala Gly Val Gly Ala Val Ala

10 -25 -20 -15

Met Ser Leu Thr Val Gly Ala Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Val Asp

 -10 -5 -1 1

Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val Val Ala Ala Leu

5 10 15 20

15 Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala Gln Phe Asn Ala Ser Pro Val

 25 30 35

Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu Ala Ala Pro Pro Pro Gln Arg

 40 45 50

Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala Val Pro Gly Ala Ala Gln Tyr

20 55 60 65

Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly Ser Cys Asn Asn Tyr

 70 75 80

<210> 9

<211> 97

25 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

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

<210> 10

<211> 94

<212> PRT

20 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 10

Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met
 1 5 10 15
 Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val
 25 20 25 30

Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Val
 35 40 45
 Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile
 50 55 60
 5 Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn
 65 70 75 80
 Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala
 85 90
 <210> 11
 10 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 11
 Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe
 15 1 5 10 15
 Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly
 35 40 45
 20 Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val
 50 55 60
 Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val
 65 70 75 80
 Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala
 25 85 90 95

Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp
100 105 110
Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu
115 120 125
5 Gly Pro Pro Ala
130
<210> 12
<211> 195
<212> PRT
10 <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 12
Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
1 5 10 15
Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
15 20 25 30
Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
35 40 45
Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
50 55 60
20 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
65 70 75 80
Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
85 90 95
Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
25 100 105 110

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 130 135 140
 5 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
 165 170 175
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 10 180 185 190
 Ala Ala Ser
 195
 <210> 13
 <211> 391
 15 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 13
 Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met
 1 5 10 15
 20 Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp
 20 25 30
 Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser
 35 40 45
 Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly
 25 50 55 60

Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr
 65 70 75 80
 Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala
 5 85 90 95
 Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala
 100 105 110
 Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly
 115 120 125
 10 Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met
 130 135 140
 Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala
 145 150 155 160
 Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr
 15 165 170 175
 Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser
 180 185 190
 Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu
 195 200 205
 20 Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu
 210 215 220
 Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val
 25 245 250 255

Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala
260 265 270
Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala
275 280 285
5 Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly
290 295 300
Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val
305 310 315 320
Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg
10 325 330 335
Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly
340 345 350
Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly
355 360 365
15 Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met
370 375 380
Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
385 390
<210> 14
20 <211> 423
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 14
Met Asp Phe Gly Leu Leu Pro Pro Glu Val Asn Ser Ser Arg Met Tyr
25 1 5 10 15

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

Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala Ala Asn Ala Asp Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr Leu Asn Pro Gln Val Gly Ser
 5 225 230 235 240
 Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro Ile Gly Glu Leu Asp Val Ile
 245 250 255
 Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr Gly Ser Ile Ala Leu Ala Ile
 260 265 270
 10 Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile Gly Leu Tyr Gly Asn Ala Gly
 275 280 285
 Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro Leu Ser Ser Ala Thr Asp Glu
 290 295 300
 Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala
 15 305 310 315 320
 Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val Gly Ala Leu Ser Val Pro His Ser
 325 330 335
 Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu Ile Gln Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro
 340 345 350
 20 Thr Phe Ser Ser Ser Ala Gly Ala Asp Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met
 355 360 365
 Pro Ala Gly Leu Leu Ser Gly Met Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg
 370 375 380
 Gly Thr Thr Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly
 25 385 390 395 400

Gln Glu Asp Gly Arg Lys Pro Pro Val Val Val Ile Arg Glu Gln Pro

405

410

415

Pro Pro Gly Asn Pro Pro Arg

420

5 <210> 15

<211> 95

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

10 <221> MET_INICIAL

<222> (1)..(1)

<220>

<221> péptido_mat

<222> (2)..(95)

15 <400> 15

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser

-1 1

5

10

15

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

20

25

30

20 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser

35

40

45

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu

50

55

60

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly

25

65

70

75

239

Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro
 75 80 85
 Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu
 5 90 95 100
 Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro
 105 110 115
 Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu
 120 125 130
 10 Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met
 135 140 145 150
 Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly
 155 160 165
 Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly
 15 170 175 180
 Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val
 185 190 195
 Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn
 200 205 210
 20 Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu
 215 220 225 230
 Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn
 235 240 245
 Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr
 25 250 255 260

His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp
265 270 275
Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln
5 280 285 290
Gly Ala
295
<210> 17
<211> 325
10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<220>
<221> péptido_mat
<222> (41)..(325)
15 <400> 17
Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met
-40 -35 -30 -25
Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
-20 -15 -10
20 Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val
-5 -1 1 5
Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val
10 15 20
Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp
25 25 30 35 40

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

Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly
 235 240 245

Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp
 250 255 260

5 Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser
 265 270 275 280

Ser Leu Gly Ala Gly
 285

<210> 18

10 <211> 144

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> MET_INICIAL

15 <222> (1)..(1)

<220>

<221> péptido_mat

<222> (2)..(144)

<400> 18

20 Met Ala Thr Thr Leu Pro Val Gln Arg His Pro Arg Ser Leu Phe Pro
 -1 1 5 10 15

Glu Phe Ser Glu Leu Phe Ala Ala Phe Pro Ser Phe Ala Gly Leu Arg
 20 25 30

Pro Thr Phe Asp Thr Arg Leu Met Arg Leu Glu Asp Glu Met Lys Glu
 25 35 40 45

Gly Arg Tyr Glu Val Arg Ala Glu Leu Pro Gly Val Asp Pro Asp Lys
 50 55 60
 Asp Val Asp Ile Met Val Arg Asp Gly Gln Leu Thr Ile Lys Ala Glu
 5 65 70 75
 Arg Thr Glu Gln Lys Asp Phe Asp Gly Arg Ser Glu Phe Ala Tyr Gly
 80 85 90 95
 Ser Phe Val Arg Thr Val Ser Leu Pro Val Gly Ala Asp Glu Asp Asp
 100 105 110
 10 Ile Lys Ala Thr Tyr Asp Lys Gly Ile Leu Thr Val Ser Val Ala Val
 115 120 125
 Ser Glu Gly Lys Pro Thr Glu Lys His Ile Gln Ile Arg Ser Thr Asn
 130 135 140
 <210> 19
 15 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <221> péptido_mat
 20 <222> (24)..(228)
 <400> 19
 Met Arg Ile Lys Ile Phe Met Leu Val Thr Ala Val Val Leu Leu Cys
 -20 -15 -10
 Cys Ser Gly Val Ala Thr Ala Ala Pro Lys Thr Tyr Cys Glu Glu Leu
 25 -5 -1 1 5

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

Ser Met Leu Ala
205
<210> 20
5 <211> 355
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<220>
<221> péptido_mat
10 <222> (33)..(355)
<400> 20
Met Ser Asn Ser Arg Arg Arg Ser Leu Arg Trp Ser Trp Leu Leu Ser
-30 -25 -20
Val Leu Ala Ala Val Gly Leu Gly Leu Ala Thr Ala Pro Ala Gln Ala
15 -15 -10 -5 -1
Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
1 5 10 15
Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
20 25 30
20 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
35 40 45
Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
50 55 60
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
25 65 70 75 80

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 85 90 95
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 5 100 105 110
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 130 135 140
 10 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
 165 170 175
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 15 180 185 190
 Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala
 195 200 205
 Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly
 210 215 220
 20 Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu
 225 230 235 240
 Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val
 245 250 255
 Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile
 25 260 265 270

Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp
 275 280 285
 Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln
 290 295 300
 5 Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly
 305 310 315 320
 Pro Pro Ala

 <210> 21
 10 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Ser/Ala mutante de Mtb32A maduro
 15 <400> 21
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 20 20 25 30
 20 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 35 40 45
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 50 55 60
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 25 65 70 75 80

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 85 90 95
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 5 100 105 110
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 130 135 140
 10 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
 165 170 175
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 15 180 185 190
 Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala
 195 200 205
 Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly
 210 215 220
 20 Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu
 225 230 235 240
 Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val
 245 250 255
 Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile
 25 260 265 270

Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp
 275 280 285
 Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln
 290 295 300
 5 Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly
 305 310 315 320
 Pro Pro Ala

 <210> 22
 10 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 22

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

<210> 23
<211> 723
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> Mtb72f
<400> 23
Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
1 5 10 15
10 Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
20 25 30
Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
35 40 45
Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
15 50 55 60
Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
65 70 75 80
Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
85 90 95
20 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
100 105 110
Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
115 120 125
Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
25 130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 5 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 10 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 15 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 20 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 25 325 330 335

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 5 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 10 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 15 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 20 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 25 515 520 525

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 530 535 540
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560
 5 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 565 570 575
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 10 595 600 605
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 625 630 635 640
 15 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 645 650 655
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 20 675 680 685
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 705 710 715 720
 25 Ala Ala Ser

<210> 24
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> M72
 <400> 24
 Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 10 Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
 20 25 30
 Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
 35 40 45
 Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
 15 50 55 60
 Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
 65 70 75 80
 Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
 85 90 95
 20 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
 100 105 110
 Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
 115 120 125
 Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
 25 130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 5 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 10 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 15 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 20 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 25 325 330 335

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 5 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 10 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 15 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 20 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 25 515 520 525

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 530 535 540
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560
 5 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 565 570 575
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 10 595 600 605
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 625 630 635 640
 15 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 645 650 655
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 20 675 680 685
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 705 710 715 720
 25 Ala Ala Ser

<210> 25
<211> 702
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> Mtb71f
<400> 25
Asp Pro Val Asp Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val
1 5 10 15
10 Val Ala Ala Leu Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala Gln Phe Asn
20 25 30
Ala Ser Pro Val Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu Ala Ala Pro
35 40 45
Pro Pro Gln Arg Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala Val Pro Gly
15 50 55 60
Ala Ala Gln Tyr Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly Ser Cys Asn
65 70 75 80
Asn Tyr Glu Leu Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala
85 90 95
20 His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu His
100 105 110
Gln Ala Ile Val Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly
115 120 125
Ala Gly Ser Val Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn
25 130 135 140

Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln
 145 150 155 160
 Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser
 5 165 170 175
 Trp Ala Thr Ser Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu Val
 180 185 190
 Ala Ser Gln Ser Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His Thr
 195 200 205
 10 Ile Gly Gln Ala Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His Gln
 210 215 220
 Gly Glu Ser Ser Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val Ala
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn Leu
 15 245 250 255
 Gly Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser
 260 265 270
 Thr Tyr Thr Gly Phe Asp Ile Met Asp Phe Gly Leu Leu Pro Pro Glu
 275 280 285
 20 Val Asn Ser Ser Arg Met Tyr Ser Gly Pro Gly Pro Glu Ser Met Leu
 290 295 300
 Ala Ala Ala Ala Ala Trp Asp Gly Val Ala Ala Glu Leu Thr Ser Ala
 305 310 315 320
 Ala Val Ser Tyr Gly Ser Val Val Ser Thr Leu Ile Val Glu Pro Trp
 25 325 330 335

Met Gly Pro Ala Ala Ala Ala Met Ala Ala Ala Ala Thr Pro Tyr Val
340 345 350

Gly Trp Leu Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Lys Glu Thr Ala Thr Gln
5 355 360 365

Ala Arg Ala Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Ala Phe Ala Met Thr Val
370 375 380

Pro Pro Ser Leu Val Ala Ala Asn Arg Ser Arg Leu Met Ser Leu Val
385 390 395 400

Ala Ala Asn Ile Leu Gly Gln Asn Ser Ala Ala Ile Ala Ala Thr Gln
10 405 410 415

Ala Glu Tyr Ala Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Val Met Tyr Ser
420 425 430

Tyr Glu Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Leu Pro Pro Phe Thr Pro
15 435 440 445

Pro Val Gln Gly Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala
450 455 460

Thr Gln Ala Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Asp Ala Gln Ala Thr Leu
465 470 475 480

Ala Gln Leu Pro Pro Gly Ile Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala
20 485 490 495

Ala Asn Ala Asp Pro Leu Thr Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr
500 505 510

Leu Asn Pro Gln Val Gly Ser Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro
25 515 520 525

Ile Gly Glu Leu Asp Val Ile Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr
 530 535 540
 Gly Ser Ile Ala Leu Ala Ile Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile
 545 550 555 560
 5 Gly Leu Tyr Gly Asn Ala Gly Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro
 565 570 575
 Leu Ser Ser Ala Thr Asp Glu Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly
 580 585 590
 Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val Gly
 10 595 600 605
 Ala Leu Ser Val Pro His Ser Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu Ile Gln
 610 615 620
 Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro Thr Phe Ser Ser Ser Ala Gly Ala Asp
 625 630 635 640
 15 Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met Pro Ala Gly Leu Leu Ser Gly Met Ala
 645 650 655
 Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Gly Thr Thr Gly Gly Gly Gly Thr Arg
 660 665 670
 Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly Gln Glu Asp Gly Arg Lys Pro Pro Val
 20 675 680 685
 Val Val Ile Arg Glu Gln Pro Pro Pro Gly Asn Pro Pro Arg
 690 695 700
 <210> 26
 <211> 920
 25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> M72-Mtb9.9-Mtb9.8

5 <400> 26

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly

1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg

20 25 30

10 Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu

35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg

50 55 60

Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp

15 65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met

85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr

100 105 110

20 Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala

115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro

130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu

25 145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 5 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 10 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 15 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 20 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 25 340 345 350

Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 5 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 10 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 15 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 20 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 25 530 535 540

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 5 565 570 575
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 595 600 605
 10 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 15 645 650 655
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 675 680 685
 20 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 705 710 715 720
 Ala Ala Ser Ser Thr Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp
 25 725 730 735

Ala His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu
740 745 750

His Gln Ala Ile Val Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly
5 755 760 765

Gly Ala Gly Ser Val Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg
770 775 780

Asn Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val
785 790 795 800

10 Gln Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser
805 810 815

Ser Trp Ala Thr Ser Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu
820 825 830

Val Ala Ser Gln Ser Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His
15 835 840 845

Thr Ile Gly Gln Ala Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His
850 855 860

Gln Gly Glu Ser Ser Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val
865 870 875 880

20 Ala Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn
885 890 895

Leu Gly Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala
900 905 910

Ser Thr Tyr Thr Gly Phe Pro Trp
25 915 920

<210> 27

<211> 1010

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> M103

<400> 27

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly

1 5 10 15

10 Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg

20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu

35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg

15 50 55 60

Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp

65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met

85 90 95

20 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr

100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala

115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro

25 130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 5 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 10 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 15 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 20 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 25 325 330 335

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 5 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 10 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 15 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 20 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 25 515 520 525

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
530 535 540

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
5 545 550 555 560

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
565 570 575

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
580 585 590

10 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
595 600 605

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
610 615 620

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
15 625 630 635 640

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
645 650 655

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
660 665 670

20 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
675 680 685

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
690 695 700

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
25 705 710 715 720

Ala Ala Ser Ser Gly Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu
725 730 735

Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln
5 740 745 750

Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg
755 760 765

Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu
770 775 780

10 Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln
785 790 795 800

Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly
805 810 815

Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln
15 820 825 830

Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile
835 840 845

Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His
850 855 860

20 Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro
865 870 875 880

Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala
885 890 895

Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala
25 900 905 910

Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn
915 920 925

Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu
930 935 940

5 Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser
945 950 955 960

Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn
965 970 975

Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp
10 980 985 990

Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly
995 1000 1005

Ala Gly
1010

15 <210> 28
<211> 1148
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

20 <223> M114
<400> 28

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
25 20 25 30

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

Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 5 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 10 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 15 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 20 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 25 405 410 415

	Ala	Gln	Asn	Gly	Val	Arg	Ala	Met	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Gly
				420					425						430	
	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Ala
5			435					440					445			
	Ser	Val	Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln
			450					455					460			
	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser
	465					470					475				480	
10	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Pro	Gly	Gln	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Val	Gly
					485					490					495	
	Gln	Met	Gly	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly	Val	Leu	Arg	Val
				500						505					510	
	Pro	Pro	Arg	Pro	Tyr	Val	Met	Pro	His	Ser	Pro	Ala	Ala	Gly	Asp	Ile
15			515							520					525	
	Ala	Pro	Pro	Ala	Leu	Ser	Gln	Asp	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe	Pro	Ala	Leu
			530							535					540	
	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser	Ala	Met	Val	Ala	Gln	Val	Gly	Pro	Gln	Val	Val
	545					550					555				560	
20	Asn	Ile	Asn	Thr	Lys	Leu	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Thr
						565					570				575	
	Gly	Ile	Val	Ile	Asp	Pro	Asn	Gly	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Asn	His	Val
						580					585				590	
	Ile	Ala	Gly	Ala	Thr	Asp	Ile	Asn	Ala	Phe	Ser	Val	Gly	Ser	Gly	Gln
25						595					600				605	

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 5 625 630 635 640
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 645 650 655
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 10 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 675 680 685
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 15 705 710 715 720
 Ala Ala Ser Ser Thr Met Asp Phe Gly Leu Leu Pro Pro Glu Val Asn
 725 730 735
 Ser Ser Arg Met Tyr Ser Gly Pro Gly Pro Glu Ser Met Leu Ala Ala
 740 745 750
 20 Ala Ala Ala Trp Asp Gly Val Ala Ala Glu Leu Thr Ser Ala Ala Val
 755 760 765
 Ser Tyr Gly Ser Val Val Ser Thr Leu Ile Val Glu Pro Trp Met Gly
 770 775 780
 Pro Ala Ala Ala Ala Met Ala Ala Ala Ala Thr Pro Tyr Val Gly Trp
 25 785 790 795 800

Leu Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Lys Glu Thr Ala Thr Gln Ala Arg
 805 810 815
 Ala Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Ala Phe Ala Met Thr Val Pro Pro
 5 820 825 830
 Ser Leu Val Ala Ala Asn Arg Ser Arg Leu Met Ser Leu Val Ala Ala
 835 840 845
 Asn Ile Leu Gly Gln Asn Ser Ala Ala Ile Ala Ala Thr Gln Ala Glu
 850 855 860
 10 Tyr Ala Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Val Met Tyr Ser Tyr Glu
 865 870 875 880
 Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Leu Pro Pro Phe Thr Pro Pro Val
 885 890 895
 Gln Gly Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gln
 15 900 905 910
 Ala Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Asp Ala Gln Ala Thr Leu Ala Gln
 915 920 925
 Leu Pro Pro Gly Ile Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala Ala Asn
 930 935 940
 20 Ala Asp Pro Leu Thr Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr Leu Asn
 945 950 955 960
 Pro Gln Val Gly Ser Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro Ile Gly
 965 970 975
 Glu Leu Asp Val Ile Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr Gly Ser
 25 980 985 990

Ile Ala Leu Ala Ile Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile Gly Leu
 995 1000 1005
 Tyr Gly Asn Ala Gly Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro Leu
 1010 1015 1020
 5 Ser Ser Ala Thr Asp Glu Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly
 1025 1030 1035
 Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val
 1040 1045 1050
 Gly Ala Leu Ser Val Pro His Ser Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu
 10 1055 1060 1065
 Ile Gln Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro Thr Phe Ser Ser Ser Ala
 1070 1075 1080
 Gly Ala Asp Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met Pro Ala Gly Leu Leu
 1085 1090 1095
 15 Ser Gly Met Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Gly Thr Thr Gly
 1100 1105 1110
 Gly Gly Gly Thr Arg Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly Gln Glu Asp
 1115 1120 1125
 Gly Arg Lys Pro Pro Val Val Val Ile Arg Glu Gln Pro Pro Pro
 20 1130 1135 1140
 Gly Asn Pro Pro Arg
 1145
 <210> 29
 <211> 9
 25 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 29
Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala
1 5
5 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 30
10 Ile Leu Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe
1 5
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 31
Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu
1 5
<210> 32
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 32
Tyr Ala Gly Lys Asn Arg Asn His Val
25 1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 33
Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val
1 5
<210> 34
<211> 9

10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 34
Phe Val Arg Pro Val Ala Val Asp Leu
1 5

15 <210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 35

20 Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His
1 5
<210> 36
<211> 9
<212> PRT

25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 36
 Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala Leu
 1 5
 5 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 37
 10 Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn
 1 5
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 38
 Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala
 1 5
 <210> 39
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 39
 Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln
 25 1 5

- <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
- 5 <400> 40
Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu
1 5
<210> 41
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 41
Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala Asp Ile
1 5
- 15 <210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 42
- 20 Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile
1 5
<210> 43
<211> 9
<212> PRT
- 25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 43
 Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn
 1 5

5 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 44

10 Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Ser Ala
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 45
 Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 46

20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 46
 Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Ala

25 1 5

- <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
- 5 <400> 47
Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln
1 5
<210> 48
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 48
Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala
1 5
15 <210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 49
20 Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile
1 5
<210> 50
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 50
Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly Leu
1 5

5 <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 51

10 Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly Leu Tyr
1 5
<210> 52
<211> 9
<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 52
Ser Ala Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Leu
1 5
<210> 53

20 <211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 53
Ala Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Leu Leu

25 1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 54

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile

1 5

<210> 55

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 55

Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu Tyr

1 5

15 <210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 56

20 Gly Ile Leu Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 57

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys

1 5

5 <210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 58

10 Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 59

Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu

1 5

<210> 60

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 60

Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala

25 1 5

- <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
- 5 <400> 61
 Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu
 1 5
 <210> 62
 <211> 9
- 10 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 62
 Glu Leu Ala Asp Leu Asp Arg Gln Leu
 1 5
- 15 <210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 63
- 20 Leu Ala Asp Leu Asp Arg Gln Leu Ile
 1 5
 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
- 25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 64
Asp Leu Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu
1 5
5 <210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 65
10 Leu Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile
1 5
<210> 66
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 66
Ala Val Gln Thr Thr Arg Asp Ile Leu
1 5
<210> 67
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 67
Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe
25 1 5

- <210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
- 5 <400> 68
Lys Gly Leu Glu Phe Val Arg Pro Val
1 5
<210> 69
<211> 9
- 10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 69
Gly Leu Glu Phe Val Arg Pro Val Ala
1 5
- 15 <210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 70
- 20 Leu Glu Phe Val Arg Pro Val Ala Val
1 5
<210> 71
<211> 9
<212> PRT
- 25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 71
Phe Val Arg Pro Val Ala Val Asp Leu
1 5

5 <210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 72

10 Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr
1 5
<210> 73
<211> 9
<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 73
Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val
1 5
<210> 74

20 <211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 74
Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala

25 1 5

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 5 <400> 75
 Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala Leu
 1 5
 <210> 76
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 76
 Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe
 1 5
 15 <210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 77
 20 Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys
 1 5
 <210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 78
 Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala
 1 5
 5 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 79
 10 Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala
 1 5
 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 80
 Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala
 1 5
 <210> 81
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 81
 Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val
 25 1 5

- <210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
- 5 <400> 82
Ala Met Ala Val Val Gly Gly Ala Leu
1 5
- <210> 83
<211> 9
- 10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 83
Ala Val Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr
1 5
- 15 <210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 84
- 20 Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys
1 5
- <210> 85
<211> 9
<212> PRT
- 25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 85
Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu
1 5

5 <210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 86

10 Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile
1 5
<210> 87
<211> 9
<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 87
Lys Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu
1 5
<210> 88

20 <211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 88
Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu Leu

25 1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
5 <400> 89
Ile Asn Ala Thr Gln Leu Leu Lys Leu
1 5
<210> 90
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 90
Asn Ala Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu
1 5
15 <210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 91
20 Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu
1 5
<210> 92
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 92
Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu
1 5

5 <210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 93

10 Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val
1 5
<210> 94
<211> 9
<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 94
Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala
1 5
<210> 95

20 <211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 95
Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala Ile

25 1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
5 <400> 96
Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala Asp Ile
1 5
<210> 97
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 97
Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val
1 5
15 <210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 98
20 Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala
1 5
<210> 99
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 99
 Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys
 1 5
 5 <210> 100
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 100
 10 Thr Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile
 1 5
 <210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 101
 Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu
 1 5
 <210> 102
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 102
 Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys Glu Leu
 25 1 5

- <210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis
- 5

<400> 103

Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu

15

<210> 104

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 104

Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe

15

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 105

20

Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe

15

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Mycobacterium tuberculosis

307

<400> 106
Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val
1 5

5 <210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 107

10 Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu
1 5
<210> 108
<211> 9
<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 108
Gly Leu Thr Gly Ala Thr Ser Gly Leu
1 5
<210> 109

20 <211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 109
Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly

25 1 5

- <210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
- 5 <400> 110
Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala
1 5
<210> 111
<211> 9
- 10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 111
Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His
1 5
- 15 <210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
- 20 <400> 112
Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp
1 5
<210> 113
<211> 9
- 25 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 113

Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu

1 5

5 <210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 114

10 Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala

1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 115

Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro

1 5

<210> 116

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 116

Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu

25 1 5

- <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 5 <400> 117
 Ser Gly Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu
 1 5
 <210> 118
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 118
 Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala
 1 5
 15 <210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 119
 20 His Ala Ala Ser Thr Arg Gln Ala Leu
 1 5
 <210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 120
 Ser Thr Arg Gln Ala Leu Arg Pro Arg
 1 5
 5 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 121
 10 Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly
 1 5
 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 122
 Glu Gln Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu
 1 5
 <210> 123
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 123
 Gly Ala Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys
 25 1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
5 <400> 124
Ala Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys
1 5
<210> 125
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 125
Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser
1 5
15 <210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 126
20 Thr Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val
1 5
<210> 127
<211> 20
<212> PRT
25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 127
 Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
 1 5 10 15
 Leu Tyr Asp Leu
 5 20
 <210> 128
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 10 <400> 128
 Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile Leu Tyr
 20
 15 <210> 129
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 129
 20 Asn Gln Gly Gly Ile Leu Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala
 1 5 10 15
 Leu Glu Glu Leu
 20
 <210> 130
 25 <211> 20

<212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 130
 Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp
 5 1 5 10 15
 Leu Gly Ser Ala
 20
 <210> 131
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 131
 Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala Gly Lys Asn Arg
 1 5 10 15
 15 Asn His Val Asn
 20
 <210> 132
 <211> 20
 <212> PRT
 20 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 132
 Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu Asp
 1 5 10 15
 Arg Gln Leu Ile
 25 20

<210> 133
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 5 <400> 133
 Asp Leu Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala
 1 5 10 15
 Val Gln Thr Thr
 20
 10 <210> 134
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 134
 15 Ala Asn Ala Val Gln Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys
 1 5 10 15
 Gly Leu Glu Phe
 20
 <210> 135
 20 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 135
 Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr
 25 1 5 10 15

Tyr Ile Pro Val

20

<210> 136

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 136

Phe Val Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly

10 1 5 10 15

His Ala Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe

20

25

<210> 137

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 137

Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val Val Gly

1 5 10 15

20 Gly Ala Leu Ala

20

<210> 138

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 138

Val Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn

1 5 10 15

Ala Thr Gln Leu

5 20

<210> 139

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

10 <400> 139

Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu

1 5 10 15

Leu Val Ala Ala

20

15 <210> 140

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 140

20 Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val

1 5 10 15

Ala Asp Ile Ile

20

<210> 141

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 141

Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr Leu Gly Glu Val Trp Glu

5 1 5 10 15

Phe Ile Thr Asn

20

<210> 142

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 142

Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys Glu Leu Trp

1 5 10 15

15 Asp Lys Leu Thr

20

<210> 143

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 143

Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg

1 5 10 15

Gly Trp Ser Asn

25 20

<210> 144
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 5 <400> 144
 Phe Ser Arg Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Leu Thr Gly
 20
 10 <210> 145
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 145
 15 Gly Val Pro Gly Leu Thr Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr
 1 5 10 15
 Gly Leu Phe Gly
 20
 <210> 146
 20 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 146
 Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly
 25 1 5 10 15

Leu Ala His Ala

20

<210> 147

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 147

Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu

10 1 5 10 15

Pro Ala Leu Ala

20

<210> 148

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 148

Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe Gly

1 5 10 15

20 Gly Leu Pro Ser

20

<210> 149

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 149

Gly Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr

1 5 10 15

Arg Gln Ala Leu

5 20

<210> 150

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

10 <400> 150

Ala Ser Thr Arg Gln Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly

1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu

20

15 <210> 151

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 151

20 Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val

1 5 10 15

Ser Ala Gln Gly

20

<210> 152

25 <211> 19

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 152

Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met Gly Gly Pro Val Gly

5 1 5 10 15

Met Gly Gly

<210> 153

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 153

Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Gly

1 5 10 15

15 Thr Thr Thr Lys

20

<210> 154

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 154

Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly

1 5 10 15

Thr Glu Asp Ala

25 20

<210> 155
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 5 <400> 155
 Ala Ala Gly Thr Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gln
 20
 10 <210> 156
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 156
 15 Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Lys Val Leu Val
 1 5 10 15
 Arg Asn Val Val
 20
 <210> 157
 20 <211> 1053
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 157
 Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
 25 1 5 10 15



Leu Gly Ile Ala Asn Val Gly Gly Gly Asn Val Gly Asn Ala Asn Asn
 210 215 220
 Gly Leu Ala Asn Ile Gly Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe Gly
 5 225 230 235 240
 Ser Gly Asn Phe Gly Asn Ser Asn Ile Gly Ser Ala Ser Leu Gly Asn
 245 250 255
 Asn Asn Ile Gly Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val Gly
 260 265 270
 10 Asn Leu Gly Asn Leu Asn Thr Gly Phe Ala Asn Thr Gly Leu Gly Asn
 275 280 285
 Phe Gly Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr
 290 295 300
 Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn
 15 305 310 315 320
 Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser
 325 330 335
 Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly
 340 345 350
 20 Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser
 355 360 365
 Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380
 Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn
 25 385 390 395 400

Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415
 Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 5 420 425 430
 Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445
 Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460
 10 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480
 Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 15 500 505 510
 Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525
 Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
 530 535 540
 20 Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu
 545 550 555 560
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile
 565 570 575
 Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn
 25 580 585 590

Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser
 595 600 605
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr
 5 610 615 620
 Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Ser Ile
 625 630 635 640
 Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr Val Gly
 645 650 655
 10 Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln
 660 665 670
 Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu Pro Ala
 675 680 685
 Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe
 15 690 695 700
 Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile
 705 710 715 720
 Thr Val Pro Ala Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn
 725 730 735
 20 Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe Thr Asn
 740 745 750
 Gly Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val Val His
 755 760 765
 Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu Pro
 25 770 775 780

Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly
785 790 795 800
Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe
5 805 810 815
Ala Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr
820 825 830
Thr Gln Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val
835 840 845
10 Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro
850 855 860
Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln
865 870 875 880
Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile
15 885 890 895
Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr
900 905 910
Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Thr
915 920 925
20 Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly
930 935 940
Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala
945 950 955 960
Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ser Gly Phe
25 965 970 975

Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala
 980 985 990
 Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser
 995 1000 1005
 5 Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg
 1010 1015 1020
 Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala
 1025 1030 1035
 Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
 10 1040 1045 1050
 <210> 158
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 15 <400> 158
 Met Ser Glu Leu Ser Val Ala Thr Gly Ala Val Ser Thr Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ser Ile Pro Met Pro Ala Gly Val Asn Pro Ala Asp Leu Ala Ala Glu
 20 25 30
 20 Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Ser Val Asp Glu Asp Tyr Leu Leu Tyr
 35 40 45
 Glu Cys Asp Gly Gln Trp Val Leu Ala Ala Gly Val Gln Ala Met Val
 50 55 60
 Glu Leu Asp Ser Asp Glu Leu Arg Val Ile Arg Asp Gly Val Thr Arg
 25 65 70 75 80

Arg Gln Gln Trp Ser Gly Arg Pro Gly Ala Ala Leu Gly Glu Ala Val
 85 90 95
 Asp Arg Leu Leu Leu Glu Thr Asp Gln Ala Phe Gly Trp Val Ala Phe
 5 100 105 110
 Glu Phe Gly Val His Arg Tyr Gly Leu Gln Gln Arg Leu Ala Pro His
 115 120 125
 Thr Pro Leu Ala Arg Val Phe Ser Pro Arg Thr Arg Ile Met Val Ser
 130 135 140
 10 Glu Lys Glu Ile Arg Leu Phe Asp Ala Gly Ile Arg His Arg Glu Ala
 145 150 155 160
 Ile Asp Arg Leu Leu Ala Thr Gly Val Arg Glu Val Pro Gln Ser Arg
 165 170 175
 Ser Val Asp Val Ser Asp Asp Pro Ser Gly Phe Arg Arg Arg Val Ala
 15 180 185 190
 Val Ala Val Asp Glu Ile Ala Ala Gly Arg Tyr His Lys Val Ile Leu
 195 200 205
 Ser Arg Cys Val Glu Val Pro Phe Ala Ile Asp Phe Pro Leu Thr Tyr
 210 215 220
 20 Arg Leu Gly Arg Arg His Asn Thr Pro Val Arg Ser Phe Leu Leu Gln
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Ile Arg Ala Leu Gly Tyr Ser Pro Glu Leu Val Thr Ala
 245 250 255
 Val Arg Ala Asp Gly Val Val Ile Thr Glu Pro Leu Ala Gly Thr Arg
 25 260 265 270

Ala Leu Gly Arg Gly Pro Ala Ile Asp Arg Leu Ala Arg Asp Asp Leu
 275 280 285
 Glu Ser Asn Ser Lys Glu Ile Val Glu His Ala Ile Ser Val Arg Ser
 5 290 295 300
 Ser Leu Glu Glu Ile Thr Asp Ile Ala Glu Pro Gly Ser Ala Ala Val
 305 310 315 320
 Ile Asp Phe Met Thr Val Arg Glu Arg Gly Ser Val Gln His Leu Gly
 325 330 335
 10 Ser Thr Ile Arg Ala Arg Leu Asp Pro Ser Ser Asp Arg Met Ala Ala
 340 345 350
 Leu Glu Ala Leu Phe Pro Ala Val Thr Ala Ser Gly Ile Pro Lys Ala
 355 360 365
 Ala Gly Val Glu Ala Ile Phe Arg Leu Asp Glu Cys Pro Arg Gly Leu
 15 370 375 380
 Tyr Ser Gly Ala Val Val Met Leu Ser Ala Asp Gly Gly Leu Asp Ala
 385 390 395 400
 Ala Leu Thr Leu Arg Ala Ala Tyr Gln Val Gly Gly Arg Thr Trp Leu
 405 410 415
 20 Arg Ala Gly Ala Gly Ile Ile Glu Glu Ser Glu Pro Glu Arg Glu Phe
 420 425 430
 Glu Glu Thr Cys Glu Lys Leu Ser Thr Leu Thr Pro Tyr Leu Val Ala
 435 440 445
 Arg Gln
 25 450

<210> 159

<211> 324

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5 <400> 159

Met Ser Asp Gln Val Pro Lys Pro His Arg His His Ile Trp Arg Ile

1 5 10 15

Thr Arg Arg Thr Leu Ser Lys Ser Trp Asp Asp Ser Ile Phe Ser Glu

20 25 30

10 Ser Ala Gln Ala Ala Phe Trp Ser Ala Leu Ser Leu Pro Pro Leu Leu

35 40 45

Leu Gly Met Leu Gly Ser Leu Ala Tyr Val Ala Pro Leu Phe Gly Pro

50 55 60

Asp Thr Leu Pro Ala Ile Glu Lys Ser Ala Leu Ser Thr Ala His Ser

15 65 70 75 80

Phe Phe Ser Pro Ser Val Val Asn Glu Ile Ile Glu Pro Thr Ile Gly

85 90 95

Asp Ile Thr Asn Asn Ala Arg Gly Glu Val Ala Ser Leu Gly Phe Leu

100 105 110

20 Ile Ser Leu Trp Ala Gly Ser Ser Ala Ile Ser Ala Phe Val Asp Ala

115 120 125

Val Val Glu Ala His Asp Gln Thr Pro Leu Arg His Pro Val Arg Gln

130 135 140

Arg Phe Phe Ala Leu Phe Leu Tyr Val Val Met Leu Val Phe Leu Val

25 145 150 155 160

Ala Thr Ala Pro Val Met Val Val Gly Pro Arg Lys Val Ser Glu His
165 170 175

Ile Pro Glu Ser Leu Ala Asn Leu Leu Arg Tyr Gly Tyr Tyr Pro Ala
180 185 190

5 Leu Ile Leu Gly Leu Thr Val Gly Val Ile Leu Leu Tyr Arg Val Ala
195 200 205

Leu Pro Val Pro Leu Pro Thr His Arg Leu Val Leu Gly Ala Val Leu
210 215 220

Ala Ile Ala Val Phe Leu Ile Ala Thr Leu Gly Leu Arg Val Tyr Leu
10 225 230 235 240

Ala Trp Ile Thr Arg Thr Gly Tyr Thr Tyr Gly Ala Leu Ala Thr Pro
245 250 255

Ile Ala Phe Leu Leu Phe Ala Phe Phe Gly Gly Phe Ala Ile Met Leu
260 265 270

15 Gly Ala Glu Leu Asn Ala Ala Val Gln Glu Glu Trp Pro Ala Pro Ala
275 280 285

Thr His Ala His Arg Leu Gly Asn Trp Leu Lys Ala Arg Ile Gly Val
290 295 300

Gly Thr Thr Thr Tyr Ser Ser Thr Ala Gln His Ser Ala Val Ala Ala
20 305 310 315 320

Glu Pro Pro Ser

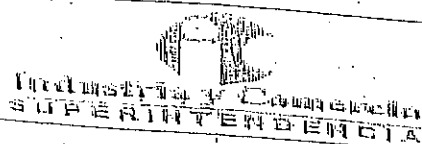
193

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-009231-00000-0000

Fecha: 2011-01-27 16:29:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 376



ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes.

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

(1) ☒

Indicación que se solicita una PCT

(33) ☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

(24) ☒

Dibujos de ser estos pertinentes

(2) ☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita Diseño Industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 83 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXO GROUP LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	11 009231
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/059580
	Fecha inicio fase nacional	25/02/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	054

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

25 MAR 2011



Bogotá D.C.,
2020

374

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXO GROUP LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	11 009231
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/059580
	Fecha inicio fase nacional	25/02/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	0540

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 16 MAR 2011
adpa11