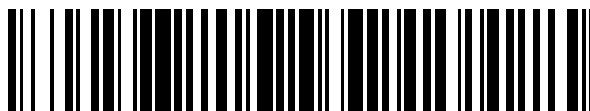


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 891 973**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2015 PCT/NZ2015/050008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15119512**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2015 E 15746012 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.06.2021 EP 3102613**

54 Título: **Partículas de polímero y usos de las mismas**

30 Prioridad:

04.02.2014 NZ 62068214

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

01.02.2022

73 Titular/es:

**POLYBATICS LIMITED (100.0%)
21 Dairy Farm Road
Palmerston North 4474, NZ**

72 Inventor/es:

REHM, BERND HELMUT ADAM

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 891 973 T3

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

DESCRIPCIÓN

Partículas de polímero y usos de las mismas

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a proteínas recombinantes y constructos y métodos relacionados, y a partículas de polímero y usos de las mismas. En particular, la presente invención se refiere a partículas de polímero funcionalizadas, a procesos de producción y usos de las mismas para provocar una respuesta inmune y en el diagnóstico o tratamiento

10 de tuberculosis.

ANTECEDENTES

15 Lo que sigue a continuación incluye información que es útil para comprender la presente invención. No es una admisión de que cualquier información proporcionada en el presente documento sea técnica anterior, o pertinente, para las invenciones actualmente descritas o reivindicadas, o que cualquier publicación o documento al que se haga referencia específica o implícitamente sea técnica anterior.

20 Se conoce que los patógenos, incluyendo patógenos intracelulares y extracelulares, causan una diversidad de enfermedades perjudiciales para los seres humanos, incluyendo, por ejemplo, tuberculosis, hepatitis, gripe, lepra, listeriosis, fiebre tifoidea, disentería, peste, neumonía, tifus, clamidia, enfermedad por ántrax, y meningitis, entre otras. En el presente documento se incluyen tanto la capacidad para generar una respuesta inmunitaria robusta mediada por células como una respuesta humoral, provocadas por estrategias de vacunación tradicionales.

25 Se estima que la tuberculosis (TB), por ejemplo, mata a más de 2 millones de personas cada año. Los métodos actuales para el tratamiento o prevención de tuberculosis están siendo desafiados por la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos de bacterias *Mycobacterium tuberculosis* (Anderson, 2007; Mustafa, 2001). La tuberculosis también es un problema significativo en el ganado. La identificación, tratamiento o prevención de TB se complica por la inaccesibilidad del sistema inmunológico del huésped a las bacterias intracelulares.

30 Sería deseable desarrollar un método seguro, eficaz y preciso para identificar individuos que han estado expuestos a, o padecen, tuberculosis que supere muchas de las desventajas de los sistemas de diagnóstico convencionales. Las desventajas incluyen coste y dificultad para administrar los ensayos de diagnóstico actuales, junto con baja sensibilidad/especificidad.

35 De ese modo, existe la necesidad de composiciones capaces de provocar una respuesta inmune robusta que sea fácilmente detectable, sensible y específica.

40 Se han investigado las propiedades de los polihidroxicarboxilatos, en particular polihidroxicarboxilatos (PHA) para su aplicación en bioplásticos, además de su uso como matriz para el transporte de fármacos y otros agentes activos en aplicaciones médicas, farmacéuticas y de la industria alimentaria. Mediante bioingeniería de la molécula de PHA, pueden manipularse las composiciones y expresión de la molécula de PHA para adaptarse a una función particular.

45 Un objeto de la presente invención es proporcionar partículas de polímero para uso en el diagnóstico de tuberculosis y en la identificación de bacterias causantes de tuberculosis, incluyendo, por ejemplo, mediante ensayos inmunológicos, proporcionar métodos y composiciones para provocar una respuesta inmunitaria eficaz en sujetos que lo necesiten, o al menos para proporcionar al público una opción útil.

BREVE SUMARIO

50 Las invenciones descritas y reivindicadas en el presente documento tienen muchos atributos y realizaciones que incluyen, pero no se limitan a, los expuestos o descritos o referenciados en este Breve sumario. No se pretende que sea exhaustivo y las invenciones descritas y reivindicadas en el presente documento no están limitadas a o por las características o realizaciones no limitantes identificadas en este Breve sumario, que se incluye únicamente con fines

55 ilustrativos y no limitantes.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una partícula de polímero que comprende uno o más polipéptidos de fusión, en donde uno o más polipéptidos de fusión comprenden

60 (A) una proteína formadora de partícula y dos o más del grupo que comprende

- a. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6,
- b. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10,
- c. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, y
- 65 d. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, o

(B) una proteína formadora de partícula y tres o más del grupo que comprende

- a. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- b. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
- c. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
- d. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
- e. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c, o

(C) una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, y un antígeno Rv3615c, o

(D) una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, y un antígeno Rv3615c, en donde dicho polipéptido de fusión tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 10, o

(E) una proteína formadora de partícula y

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6; y
- ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10; y
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c; y
- iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, o

(F) una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, un antígeno Rv3615c, y un antígeno Rv3020c.

En una realización, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, y un antígeno Rv3615c. Por ejemplo, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, y un antígeno Rv3615c, en donde dicho polipéptido de fusión tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 10.

En una realización, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula y

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6; y
- ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10; y
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c; y
- iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c.

En una realización, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, un antígeno Rv3615c, y un antígeno Rv3020c.

En diversas realizaciones, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden un antígeno Rv2346c. En un ejemplo, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula y tres o más del grupo que comprende

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
- iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
- v. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c.

En una realización, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, un antígeno Rv3615c, un antígeno Rv3020c, y un antígeno Rv2346c.

En una realización, la partícula de polímero comprende dos o más polipéptidos de fusión diferentes. En una realización, la partícula de polímero comprende al menos un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula y dos o más del grupo que comprende

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
 - ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
 - iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
 - iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
 - v. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c;
- y al menos un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula y uno o más del grupo que comprende
- vi. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
 - vii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
 - viii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
 - ix. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y

x. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c.

En una realización, los uno o más antígenos de los grupos (vi) a (x) son diferentes de los dos o más antígenos de los grupos (i) a (v). En una realización, el polipéptido de fusión que comprende uno o más antígenos de los grupos (vi) a (x) es diferente del polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos de los grupos (i) a (v).

En una realización, la partícula de polímero comprende al menos un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula y tres o más del grupo que comprende

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c; y
- iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c;

y al menos un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula y un antígeno Rv2346c.

En una realización, la partícula de polímero comprende dos o más polipéptidos de fusión diferentes en la superficie de la partícula de polímero.

En una realización, la partícula de polímero comprende además al menos una sustancia unida o incorporada a la partícula de polímero, o una combinación de las mismas.

En una realización, la sustancia es un antígeno, o un adyuvante, o una molécula inmunoestimuladora.

En una realización, la sustancia está unida mediante reticulación.

En una realización, el antígeno ESAT6 comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el antígeno ESAT6 comprende 15 o más, 20 o más, 25 o más, o 30 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización contemplada específicamente, el antígeno ESAT6 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el antígeno CFP10 comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, el antígeno CFP10 comprende 15 o más, 20 o más, 25 o más, o 30 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización contemplada específicamente, el antígeno CFP10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el antígeno Rv3615c comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el antígeno Rv3615c comprende 15 o más, 20 o más, 25 o más, o 30 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En una realización contemplada específicamente, el antígeno Rv3615c comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En una realización, el antígeno Rv3020c comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Por ejemplo, el antígeno Rv3020c comprende 15 o más, 20 o más, 25 o más, o 30 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización contemplada específicamente, el antígeno Rv3020c comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En una realización, el antígeno Rv2346c comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, el antígeno Rv2346c comprende 15 o más, 20 o más, 25 o más, o 30 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En una realización contemplada específicamente, el antígeno Rv2346c comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende una o más partículas de polímero de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición comprende una o más partículas de polímero que comprenden uno o más polipéptidos de fusión, en donde uno o más polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula y dos o más del grupo que comprende

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10,
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, y
- iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c.

En una realización, la composición comprende una o más partículas de polímero que comprenden uno o más polipéptidos de fusión, en donde uno o más polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, y un antígeno Rv3615c.

En diversas realizaciones, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden un antígeno Rv2346c. En un ejemplo, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula y tres o más del grupo que comprende

- 5 i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
- 10 iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
- v. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c.

En una realización, uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, un antígeno Rv3615c, un antígeno Rv3020c, y un antígeno Rv2346c.

- 15 En una realización, la composición comprende dos o más polipéptidos de fusión, en donde uno o más polipéptidos de fusión comprenden una proteína formadora de partícula y dos o más del grupo que comprende

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- 20 ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
- iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
- v. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c;
- y al menos un polipéptido de fusión comprende una proteína formadora de partícula y uno o más del grupo que comprende
- 25 vi. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- vii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
- viii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
- ix. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
- 30 x. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c.

En una realización, el polipéptido de fusión que comprende uno o más antígenos de los grupos (vi) a (x) es diferente del polipéptido de fusión que comprenden dos o más antígenos de los grupos (i) a (v).

- 35 En una realización, la composición comprende dos o más poblaciones de partículas de polímero, en donde una población de partículas de polímero comprende uno o más polipéptidos de fusión que comprenden una proteína formadora de partícula y dos o más del grupo que comprende

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- 40 ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
- iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
- v. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c;
- y una población de partículas de polímero comprende uno o más polipéptidos de fusión que comprenden una proteína formadora de partícula y uno o más del grupo que comprende
- 45 vi. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- vii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
- viii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
- ix. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
- 50 x. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c;

en donde los polipéptidos de fusión son diferentes entre sí, por ejemplo, en donde uno o más de los polipéptidos de fusión presentes en una población de partículas de polímero son diferentes de uno o más de los polipéptidos de fusión presentes en otra población de partículas de polímero.

- 55 En un ejemplo, la disposición de los antígenos difiere entre los polipéptidos de fusión. En una realización, la composición de los antígenos difiere entre los polipéptidos de fusión.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición de partículas de polímero, en donde las partículas de polímero se producen de acuerdo con un método de la invención.

- 60 En diversas realizaciones, la composición es una composición de vacuna. En diversas realizaciones, la composición de vacuna comprende además uno o más adyuvantes o moléculas inmunoestimuladoras.

- 65 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un reactivo de diagnóstico que comprende una o más partículas de polímero de la invención, o que comprende una composición de partículas de polímero de la invención.

En una realización, el reactivo de diagnóstico es para administración tópica.

En una realización, el reactivo de diagnóstico se formula para proporcionar menos de 10 microgramos de antígeno total por dosis. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico comprende menos de 9 µg de antígeno total por dosis, menos de 8 µg de antígeno total por dosis, menos de 7 µg de antígeno total por dosis, menos de 6 µg de antígeno total por dosis, menos de 5 µg de antígeno total por dosis, menos de 4 µg de antígeno total por dosis, menos de 3 µg de antígeno total por dosis, menos de 2 µg de antígeno total por dosis, o menos de 1 µg de antígeno total por dosis.

En una realización, el reactivo de diagnóstico se formula para proporcionar menos de 5 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico comprende menos de 5 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 4 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 3 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 2 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, o menos de 1 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis.

En una realización, el reactivo de diagnóstico se formula para proporcionar menos de 5 µg de cada antígeno presente por dosis. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico comprende menos de 5 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 4 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 3 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 2 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 1 µg de cada antígeno presente por dosis.

En una realización, el reactivo de diagnóstico se formula para proporcionar menos de 0,9 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico comprende menos de 0,9 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 0,8 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 0,7 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 0,6 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 0,5 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 0,4 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 0,3 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, menos de 0,2 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis, o menos de 0,1 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis.

En realizaciones contempladas particularmente, el reactivo de diagnóstico comprende menos de 0,9 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 0,8 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 0,7 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 0,6 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 0,5 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 0,4 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 0,3 µg de cada antígeno presente por dosis, menos de 0,2 µg de cada antígeno presente por dosis, o menos de 0,1 µg de cada antígeno presente por dosis.

Por ejemplo, en una realización a modo de ejemplo, el reactivo de diagnóstico comprende 0,3 µg de antígeno ESAT6, 0,3 µg de antígeno CFP10, y 0,3 µg de antígeno Rv3615c, por dosis.

En diversas realizaciones, el reactivo de diagnóstico es para poner en contacto con una muestra obtenida de un sujeto.

En otras realizaciones contempladas particularmente, el reactivo de diagnóstico se formula para proporcionar menos de 50 ng de cada antígeno presente por dosis, menos de 40 ng de cada antígeno presente por dosis, menos de 30 ng de cada antígeno presente por dosis, menos de 20 ng de cada antígeno presente por dosis, menos de 10 ng de cada antígeno presente por dosis, o menos de 5 ng de cada antígeno presente por dosis. En otros ejemplos, el reactivo de diagnóstico se formula para proporcionar menos de 50 ng de antígeno total por dosis, menos de 40 ng de antígeno total por dosis, menos de 30 ng de antígeno total por dosis, menos de 20 ng de antígeno total por dosis, menos de 10 ng de antígeno total por dosis, menos de 7,5 ng de antígeno total por dosis, menos de 6 ng de antígeno total por dosis, o menos de 5 ng de antígeno total por dosis.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende una composición de partículas de polímero de la invención, y opcionalmente instrucciones para uso.

En una realización, la composición comprende una población homogénea de partículas de polímero.

En una realización, la composición comprende una población mixta de partículas de polímero.

En una realización, la composición comprende además uno o más de los siguientes:

- uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis*,
- uno o más dominios de unión capaces de unirse a uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis*,
- uno o más adyuvantes, o
- uno o más agentes o moléculas inmunomoduladores.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar tuberculosis en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos una partícula de polímero de la invención, y detectar una respuesta inmunitaria en el sujeto, en donde la presencia de una respuesta inmunitaria es indicativa de tuberculosis.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para detectar *M. tuberculosis* o *M. bovis* en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto una cantidad eficaz de al menos una partícula de polímero de la invención, y detectar una respuesta inmunitaria en el sujeto, en donde la presencia de una respuesta inmunitaria es indicativa de tuberculosis.

5

En un aspecto, la administración es tópica, por ejemplo, mediante punción en la piel.

En diversos aspectos, la cantidad eficaz de al menos una partícula de polímero de la invención está presente en un reactivo de diagnóstico como se describe en el presente documento. Por consiguiente, en una realización, el método comprende administrar a un sujeto un reactivo de diagnóstico de la presente invención.

10

Por ejemplo, en un aspecto, el método comprende administrar a un sujeto un reactivo de diagnóstico de la presente invención, en donde el reactivo de diagnóstico comprende menos de 5 µg de cada antígeno presente por dosis, y detectar una respuesta inmunitaria en el sujeto, en donde la presencia de una respuesta inmunitaria es indicativa de tuberculosis.

15

En un aspecto, la administración es de un reactivo de diagnóstico de la presente invención, en donde el reactivo de diagnóstico comprende menos de 5 µg de antígeno total por dosis.

20

En un aspecto, la administración es de un reactivo de diagnóstico de la presente invención, en donde el reactivo de diagnóstico comprende menos de 1 µg de cada antígeno presente por dosis.

En un aspecto, la administración es de un reactivo de diagnóstico de la presente invención, en donde el reactivo de diagnóstico comprende menos de 0,5 µg de cada antígeno presente por dosis.

25

En un aspecto, la respuesta inmunitaria indicativa de tuberculosis es una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado.

30

En un aspecto, el método es capaz de discriminar entre un sujeto expuesto a *M. tuberculosis* o *M. bovis* o que padece tuberculosis, y un sujeto inmunizado frente a tuberculosis, por ejemplo con BCG.

En diversas realizaciones, un ensayo de piel positivo es como sigue a continuación: (i) la respuesta SICCT se considera positiva si el cambio en (Δ) el grosor de piel para PPD-B - PPD-A es > 4 mm, o (ii) > 2 mm (ensayo estricto de Reino Unido); (iii) la respuesta SIT se considera positiva si Δ de grosor de piel para PPD-B es ≥ 4 mm; y (iv) las respuestas a partículas de polímero de la invención se consideran positivas si Δ de grosor de piel es > 1 mm.

35

Por ejemplo, un ensayo de piel positivo con el reactivo de diagnóstico de la presente invención o en un método de la invención, incluyendo, por ejemplo, un método que comprende la administración de un reactivo de diagnóstico que comprende menos de 1 µg de cada antígeno presente por dosis, es un Δ de grosor de piel ≥ 1 mm.

40

En una realización, la invención se refiere a un método para detectar *M. tuberculosis* o *M. bovis* en un sujeto, comprendiendo el método proporcionar una muestra de un sujeto, poner en contacto la muestra con al menos una partícula de polímero de la invención, y detectar una respuesta indicativa de la presencia de uno o más antígenos de *M. tuberculosis* en la muestra, en donde una respuesta indicativa de la presencia de uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* es indicativa de *M. tuberculosis* o *M. bovis* en el sujeto.

45

En una realización, la respuesta indicativa de la presencia de uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* es una detección de la presencia de un anticuerpo frente a *M. tuberculosis* o *M. bovis* en dicha muestra.

50

En una realización, la respuesta indicativa de la presencia de uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* es una detección de la presencia de una célula inmunitaria sensible a *M. tuberculosis* o *M. bovis* en dicha muestra.

55

En una realización, la detección es mediante inmunoensayo.

En una realización la detección es mediante ELISA, radioinmunoensayo, o transferencia de Western.

En una realización, la detección es por ensayo de citoquinas. En una realización, la detección es de interferón-gamma.

60

En una realización, la presencia de una célula inmunitaria sensible a *Mycobacterium tuberculosis* o *M. bovis* se detecta mediante un ensayo de proliferación celular, un ensayo de clasificación celular incluyendo FACS, o un ensayo de hibridación *in situ*.

65

En un aspecto el método se refiere a un método para inmunizar a un sujeto frente a tuberculosis, en donde el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de al menos una partícula de polímero de la

invención.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir partículas de polímero, comprendiendo el método proporcionar una célula hospedadora que comprende al menos un constructo de expresión, comprendiendo el al menos un constructo de expresión:

al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula; y dos o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas entre el grupo que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno CFP10, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3615c, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3020c, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c;

mantener la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del constructo de expresión; y separar las partículas de polímero de las células hospedadoras.

En una realización, el al menos un constructo de expresión comprende:

al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula; y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6; y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno CFP10 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10; y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3615c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c.

En una realización, el al menos un constructo de expresión comprende

al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula; y
al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6; y
al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno CFP10; y
al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3615c.

En una realización, el al menos un constructo de expresión comprende

al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula; y
al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6; y
al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno CFP10; y
al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3615c; y
al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3020c.

En una realización, la proteína formadora de partícula es una polímero sintasa.

En una realización, el constructo de expresión está en un vector de alto número de copias.

En una realización, la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, está unida operativamente a un promotor fuerte.

En una realización, el promotor fuerte es un promotor viral o un promotor de fago.

En una realización, el promotor es un promotor de fago, por ejemplo un promotor de fago T7.

En una realización, la célula hospedadora se mantiene en presencia de un sustrato de una polímero sintasa, preferentemente un sustrato de una polímero sintasa cuando está presente o una mezcla de sustratos, incluyendo sustrato monomérico, o un sustrato precursor capaz de metabolizarse por la célula hospedadora para formar un sustrato de la proteína formadora de partícula.

En una realización, la célula hospedadora comprende al menos dos constructos de expresión diferentes.

En algunas realizaciones en las que la célula hospedadora comprende al menos dos constructos de expresión diferentes, al menos uno de los constructos de expresión se selecciona entre el grupo que comprende:

un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, y al menos un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, y Rv3615c, o un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, y un dominio de unión capaz de unirse a al menos un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c, o un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un adyuvante.

En otras realizaciones en las que la célula hospedadora comprende al menos dos constructos de expresión diferentes, uno de los constructos de expresión se selecciona entre el grupo que comprende:

- un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, o
- un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, o un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína determinante de tamaño de partícula, o
- un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un regulador de polímero.

En una realización, la célula hospedadora comprende una población mixta de constructos de expresión en donde cada constructo de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, comprendiendo el polipéptido de fusión:

- al menos una proteína formadora de partícula, y
- al menos un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c, o
- al menos un dominio de unión capaz de unirse a al menos un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c.

En diversas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende dos o más antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, y Rv3615c, por ejemplo, el polipéptido de fusión comprende cada uno de los antígenos del grupo que comprende ESAT6, CFP10, y Rv3615c.

En diversas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende dos o más antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c, por ejemplo, el polipéptido de fusión comprende cada uno de los antígenos del grupo que comprende ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico aislado o un constructo de expresión, comprendiendo el ácido nucleico aislado o constructo de expresión:

- al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula; y
- dos o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas entre el grupo que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno CFP10, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3615c, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3020c, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c.

En una realización, la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína formadora de partícula y las dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican el antígeno o antígenos o el dominio o dominios de unión están presentes en un único marco de lectura abierto.

En una realización, la al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína formadora de partícula está unida operativamente a un promotor fuerte.

En diversas realizaciones, el al menos un ácido nucleico comprende 20 o más ácidos nucleicos contiguos seleccionados de una de las SEQ ID NO: 11-21 del presente documento. Se contemplan particularmente secuencias de ácido nucleico aisladas que comprenden 20 o más ácidos nucleicos contiguos seleccionados de una de las SEQ ID NO: 11-15, incluyendo secuencias que codifican dos o más antígenos y una proteína formadora de partícula.

En una realización, el al menos un ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de una de las SEQ ID NO: 11-21 del presente documento.

Se contemplan particularmente sondas o cebadores que comprenden 20 o más ácidos nucleicos contiguos de una de las SEQ ID NO: 11-15, particularmente sondas o cebadores que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican dos o más antígenos y una proteína formadora de partícula.

En una realización, el constructo de expresión comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido adicional.

En una realización, el constructo de expresión comprende:

- al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula, y al menos un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c; y

al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido adicional que se une al dominio de unión capaz de unirse a un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c.

5 En una realización, el polipéptido adicional es un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula, y al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*.

En una realización, el constructo comprende además un ácido nucleico que codifica

- 10 i. al menos una tiolasa, o
ii. al menos una reductasa, o
iii. tanto (i) como (ii).

En una realización, el constructo comprende un ácido nucleico que codifica

- 15 i. al menos una tiolasa,
ii. al menos una reductasa,
iii. al menos una polímero sintasa;
iv. al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, o
20 v. al menos un dominio de unión capaz de unirse a al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*,
vi. una proteína de fusión que comprende uno o más de los apartados i) a v) anteriores,
vii. cualquier combinación de los apartados i) a vi) anteriores.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector que comprende un constructo de expresión de la invención.

25 En una realización, el vector es un vector de alto número de copias.

En una realización, el vector es un vector de bajo número de copias.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un constructo de expresión o un vector, como se ha definido anteriormente.

35 En una realización, la célula hospedadora comprende un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno CFP10 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3615c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c.

40 En otra realización, la célula hospedadora comprende un constructo de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno CFP10 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, y al menos una
45 secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3615c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno Rv3020c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c.

50 Cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, incluyendo las siguientes, pueden relacionarse con cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento.

En diversas realizaciones, la proteína formadora de partícula es una polímero sintasa.

55 En diversas realizaciones, la partícula de polímero comprende un polímero seleccionado entre poli-beta-aminoácidos, polilactatos, polioésteres y poliésteres. Lo más preferentemente, el polímero comprende polihidroxialcanoato (PHA), preferentemente poli(3-hidroxibutirato) (PHB).

60 En diversas realizaciones, la partícula de polímero comprende una partícula de polímero encapsulada por una monocapa de fosfolípido.

En diversas realizaciones, la partícula de polímero comprende dos o más polipéptidos de fusión diferentes.

65 En diversas realizaciones, la partícula de polímero comprende dos o más polipéptidos de fusión diferentes en la superficie de la partícula de polímero.

En diversas realizaciones, la partícula de polímero comprende tres o más polipéptidos de fusión diferentes, tal como tres o más polipéptidos de fusión diferentes en la superficie de la partícula de polímero.

En diversas realizaciones, la partícula de polímero comprende además al menos una sustancia unida o incorporada a la partícula de polímero, o una combinación de las mismas.

En diversas realizaciones, la sustancia es un antígeno, adyuvante o molécula inmunoestimuladora.

En diversas realizaciones, la sustancia está unida a la partícula de polímero por reticulación.

En diversas realizaciones, la polímero sintasa está unida a la partícula de polímero o a la monocapa de fosfolípido o está unida a ambas.

En diversas realizaciones, la polímero sintasa está unida covalentemente o unida no covalentemente a la partícula de polímero que forma.

En diversas realizaciones, la polímero sintasa es una PHA sintasa de la clase 1 de los géneros *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Alcaligenes*, *Delftia*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Rhodobacter*, *Paracoccus*, *Rickettsia*, *Caulobacter*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rickettsia*, *Crenarchaeota*, *Synechocystis*, *Ectothiorhodospira*, *Thiocapsa*, *Thyocystis* y *Allochrochromatium*, la clase 2 de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*, o la clase 4 del género *Bacillus*, más preferentemente entre el grupo que comprende la clase 1 de *Acinetobacter* sp. RA3849, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas punctata* FA440, *Aeromonas hydrophila*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Zoogloea ramigera*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes* sp. SH-69, *Delftia acidovorans*, *Burkholderia* sp. DSMZ9242, *Ralstonia eutrophia* H16, *Burkholderia cepacia*, *Rhodococcus rubber* PP2, *Gordonia rubripertinctus*, *Rickettsia prowazekii*, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* N1, *Thiocapsa pfennigii* 9111, *Allochrochromatium vinosum* D, *Thyocystis violacea* 2311, *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter capsularis*, *Caulobacter crescentus*, *Methylobacterium extorquens*, *Azorhizobium caulinodans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* 41, *Rhodospirillum rubrum* HA, y *Rhodospirillum rubrum* ATCC25903, la clase 2 de *Burkholderia caryophylli*, *Pseudomonas chloraphis*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Pseudomonas putida* U, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida* BM01, *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas chloraphis*, y la clase 4 de *Bacillus megaterium* y *Bacillus* sp. INT005.

En otras realizaciones, la polímero sintasa es una PHA polímero sintasa de eubacterias gramnegativas y grampositivas, o de arqueas.

En diversos ejemplos, la polímero sintasa puede comprender una PHA polímero sintasa de *C. necator*, *P. aeruginosa*, *A. vinosum*, *B. megaterium*, *H. marismortui*, *P. aureofaciens*, o *P. putida*, que tienen los números de acceso AY836680, AE004091, AB205104, AF109909, YP137339, AB049413 y AF150670, respectivamente.

Otras polímero sintasas susceptibles de usarse en la presente invención incluyen polímero sintasas, identificadas cada una por su número de acceso, de los siguientes organismos: *R. eutrophia* (A34341), *T. pfennigii* (X93599), *A. punctata* (032472), *Pseudomonas* sp. 61-3 (AB014757 y AB014758), *R. sphaeroides* (AA72004), *C. violaceum* (AAC69615), *A. borkumensis* SK2 (CAL17662), *A. borkumensis* SK2 (CAL16866), *R. sphaeroides* KD131 (ACM01571 e YP002526072), *R. opacus* B4 (BAH51880 e YP002780825), *B. multivorans* ATCC 17616 (YP001946215 y BAG43679), *A. borkumensis* SK2 (YP693934 e YP693138), *R. rubrum* (AAD53179), gamma proteobacteria HTCC5015 (ZP05061661 y EDY86606), *Azoarcus* sp. BH72 (YP932525), *C. violaceum* ATCC 12472 (NP902459), *Limnobacter* sp. MED105 (ZP01915838 y EDM82867), *M. algicola* DG893 (ZP01895922 y EDM46004), *R. sphaeroides* (CAA65833), *C. violaceum* ATCC 12472 (AAQ60457), *A. latus* (AAD10274, AAD01209 y AAC83658), *S. maltophilia* K279a (CAQ46418 e YP001972712), *R. solanacearum* IPO1609 (CAQ59975 e YP002258080), *B. multivorans* ATCC 17616 (YP001941448 y BAG47458), *Pseudomonas* sp. g113 (ACJ02400), *Pseudomonas* sp. g106 (ACJ02399), *Pseudomonas* sp. g101 (ACJ02398), *R. sp. gl32* (ACJ02397), *R. leguminosarum* bv. viciae 3841 (CAK10329 e YP770390), *Azoarcus* sp. BH72 (CAL93638), *Pseudomonas* sp. LDC-5 (AAV36510), *L. nitroferum* 2002 (ZP03698179), *Thauera* sp. MZ1T (YP002890098 y ACR01721), *M. radiotolerans* JCM 2831 (YP001755078 y ACB24395), *Methylobacterium* sp. 4-46 (YP001767769 y ACA15335), *L. nitroferum* 2002 (EEG08921), *P. denitrificans* (BAA77257), *M. gryphiswaldense* (ABG23018), *Pseudomonas* sp. USM4-55 (ABX64435 y ABX64434), *A. hydrophila* (AAT77261 y AAT77258), *Bacillus* sp. INT005 (BAC45232 y BAC45230), *P. putida* (AAM63409 y AAM63407), *G. rubripertinctus* (AAB94058), *B. megaterium* (AAD05260), *D. acidovorans* (BAA33155), *P. seriniphilus* (ACM68662), *Pseudomonas* sp. 14-3 (CAK18904), *Pseudomonas* sp. LDC-5 (AAX18690), *Pseudomonas* sp. PC17 (ABV25706), *Pseudomonas* sp. 3Y2 (AAV35431, AAV35429 y AAV35426), *P. mendocina* (AAM10546 y AAM10544), *P. nitroreducens* (AAK19608), *P. pseudoalcaligenes* (AAK19605), *P. resinovorans* (AAD26367 y AAD26365), *Pseudomonas* sp. USM7-7 (ACM90523 y ACM90522), *P. fluorescens* (AAP58480) y otras bacterias no cultivadas (BAE02881, BAE02880, BAE02879, BAE02878, BAE02877, BAE02876, BAE02875, BAE02874, BAE02873, BAE02872, BAE02871, BAE02870, BAE02869, BAE02868, BAE02867, BAE02866, BAE02865, BAE02864, BAE02863, BAE02862, BAE02861, BAE02860, BAE02859, BAE02858, BAE02857, BAE07146, BAE07145, BAE07144,

BAE07143, BAE07142, BAE07141, BAE07140, BAE07139, BAE07138, BAE07137, BAE07136, BAE07135,
 BAE07134, BAE07133, BAE07132, BAE07131, BAE07130, BAE07129, BAE07128, BAE07127, BAE07126,
 BAE07125, BAE07124, BAE07123, BAE07122, BAE07121, BAE07120, BAE07119, BAE07118, BAE07117,
 BAE07116, BAE07115, BAE07114, BAE07113, BAE07112, BAE07111, BAE07110, BAE07109, BAE07108,
 5 BAE07107, BAE07106, BAE07105, BAE07104, BAE07103, BAE07102, BAE07101, BAE07100, BAE07099,
 BAE07098, BAE07097, BAE07096, BAE07095, BAE07094, BAE07093, BAE07092, BAE07091, BAE07090,
 BAE07089, BAE07088, BAE07053, BAE07052, BAE07051, BAE07050, BAE07049, BAE07048, BAE07047,
 BAE07046, BAE07045, BAE07044, BAE07043, BAE07042, BAE07041, BAE07040, BAE07039, BAE07038,
 BAE07037, BAE07036, BAE07035, BAE07034, BAE07033, BAE07032, BAE07031, BAE07030, BAE07029,
 10 BAE07028, BAE07027, BAE07026, BAE07025, BAE07024, BAE07023, BAE07022, BAE07021, BAE07020,
 BAE07019, BAE07018, BAE07017, BAE07016, BAE07015, BAE07014, BAE07013, BAE07012, BAE07011,
 BAE07010, BAE07009, BAE07008, BAE07007, BAE07006, BAE07005, BAE07004, BAE07003, BAE07002,
 BAE07001, BAE07000, BAE06999, BAE06998, BAE06997, BAE06996, BAE06995, BAE06994, BAE06993,
 BAE06992, BAE06991, BAE06990, BAE06989, BAE06988, BAE06987, BAE06986, BAE06985, BAE06984,
 15 BAE06983, BAE06982, BAE06981, BAE06980, BAE06979, BAE06978, BAE06977, BAE06976, BAE06975,
 BAE06974, BAE06973, BAE06972, BAE06971, BAE06970, BAE06969, BAE06968, BAE06967, BAE06966,
 BAE06965, BAE06964, BAE06963, BAE06962, BAE06961, BAE06960, BAE06959, BAE06958, BAE06957,
 BAE06956, BAE06955, BAE06954, BAE06953, BAE06952, BAE06951, BAE06950, BAE06949, BAE06948,
 BAE06947, BAE06946, BAE06945, BAE06944, BAE06943, BAE06942, BAE06941, BAE06940, BAE06939,
 20 BAE06938, BAE06937, BAE06936, BAE06935, BAE06934, BAE06933, BAE06932, BAE06931, BAE06930,
 BAE06929, BAE06928, BAE06927, BAE06926, BAE06925, BAE06924, BAE06923, BAE06922, BAE06921,
 BAE06920, BAE06919, BAE06918, BAE06917, BAE06916, BAE06915, BAE06914, BAE06913, BAE06912,
 BAE06911, BAE06910, BAE06909, BAE06908, BAE06907, BAE06906, BAE06905, BAE06904, BAE06903,
 BAE06902, BAE06901, BAE06900, BAE06899, BAE06898, BAE06897, BAE06896, BAE06895, BAE06894,
 25 BAE06893, BAE06892, BAE06891, BAE06890, BAE06889, BAE06888, BAE06887, BAE06886, BAE06885,
 BAE06884, BAE06883, BAE06882, BAE06881, BAE06880, BAE06879, BAE06878, BAE06877, BAE06876,
 BAE06875, BAE06874, BAE06873, BAE06872, BAE06871, BAE06870, BAE06869, BAE06868, BAE06867,
 BAE06866, BAE06865, BAE06864, BAE06863, BAE06862, BAE06861, BAE06860, BAE06859, BAE06858,
 BAE06857, BAE06856, BAE06855, BAE06854, BAE06853 y BAE06852).

30 En diversas realizaciones, la polímero sintasa puede usarse para la producción *in vitro* de partículas de polímero mediante polimerización o facilitando la polimerización de los sustratos (R)-hidroxiacil-CoA u otro tioéster de CoA o derivados de los mismos.

35 En diversas realizaciones, el sustrato o la mezcla de sustratos comprende al menos un aminoácido, lactato, éster o ácido graso saturado o insaturado opcionalmente sustituido, preferentemente acetil-CoA.

En diversas realizaciones, el constructo de expresión está en un vector de alto número de copias.

40 En diversas realizaciones, el constructo de expresión comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido adicional.

En diversas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión comprende:

45 una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o que codifica un antígeno CFP10 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o que codifica un antígeno Rv3615c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o que codifica un antígeno Rv3020c o al menos una secuencia de ácido nucleico
 50 que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, contigua al extremo 5' o 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa, o
 una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o que codifica un antígeno CFP10 o al menos
 55 una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o que codifica un antígeno Rv3615c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o que codifica un antígeno Rv3020c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, fusionada indirectamente con el extremo 5' o 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una
 60 polímero sintasa, a través de una secuencia conectora o espaciadora polinucleotídica de una longitud deseada; o una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o que codifica un antígeno CFP10 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o que
 65 codifica un antígeno Rv3615c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o que codifica un antígeno Rv3020c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, que está insertada en la secuencia de

ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa, opcionalmente a través de una secuencia conectora o espaciadora polinucleotídica de una longitud deseada; o una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión de proteasa separado entre la secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o que codifica un antígeno CFP10 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o que codifica un antígeno Rv3615c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o que codifica un antígeno Rv3020c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, y la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa; o una secuencia de ácido nucleico que codifica un elemento de autoempalme separado entre la secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno ESAT6 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o que codifica un antígeno CFP10 o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o que codifica un antígeno Rv3615c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o que codifica un antígeno Rv3020c o al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, y la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa; o cualquier combinación de dos o más de las mismas.

En diversas realizaciones, el al menos un polipéptido de fusión comprende:

una secuencia de aminoácidos que comprende un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, contigua al extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa; o una secuencia de aminoácidos que comprende un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, fusionada indirectamente con el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa, a través de una secuencia conectora o espaciadora peptídica de una longitud deseada; o una secuencia de aminoácidos que comprende un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, que está insertada en la secuencia de aminoácidos que comprende una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa, a través de una secuencia conectora o espaciadora peptídica de una longitud deseada; o una secuencia de aminoácidos que comprende un sitio de escisión de proteasa separado entre la secuencia de aminoácidos que comprende un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, y la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa; o una secuencia de aminoácidos que comprende un elemento de autoempalme separado entre la secuencia de aminoácidos que comprende un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, o un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, o un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, o un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, y la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa; o cualquier combinación de dos o más de las mismas.

En ciertas realizaciones, tales como las mostradas a modo de ejemplo en el presente documento, una o más de las secuencias de aminoácidos que comprenden un antígeno ESAT6, CFP10, Rv3615c, o Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c son N-terminales con respecto a la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa, y una o más de las secuencias de aminoácidos que comprenden un antígeno ESAT6, CFP10, Rv3615c, o Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c son C-terminales con respecto a la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa.

En diversas realizaciones, el constructo de expresión comprende un sistema promotor constitutivo o regulable.

En diversas realizaciones, el sistema promotor regulable es un sistema promotor inducible o represivo.

En diversas realizaciones, el sistema promotor regulable se selecciona entre Lacl, Trp, fago y y ARN polimerasa de

fago.

En una realización, el promotor es cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la materia. Los promotores fuertes adecuados comprenden promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral; o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor de virus respiratorio sincitial (RSV); el promotor del virus simio 40 (SV40); promotores inducibles, tales como el promotor de MMT, el promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1; promotores de globina humana; promotores virales de timidina quinasa, tales como el promotor de timidina quinasa de Herpes simple; LTR retrovirales; el promotor de b-actina; promotores de hormona de crecimiento humana; promotores de fago tales como los promotores de ARN polimerasa T7, SP6 y T3 y el promotor del mosaico de coliflor 35S (CaMV 35S).

En diversas realizaciones, el promotor es un promotor de ARN polimerasa T7, tal como un promotor de ARN polimerasa T7 como se describe en el documento de Patente PCT/NZ2006/000251, publicado como WO 2007/037706.

En diversas realizaciones, la célula comprende dos o más constructos de expresión diferentes, cada uno de los cuales codifica un polipéptido de fusión diferente.

En diversas realizaciones, el antígeno capaz de provocar una respuesta inmune mediada por células es un antígeno derivado de un patógeno intracelular.

En diversas realizaciones, el dominio de unión capaz de unirse al antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, tal como un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células se selecciona entre una proteína, un fragmento de proteína, un dominio de unión, un dominio de unión a diana, una proteína de unión, un fragmento de proteína de unión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, un anticuerpo de dominio individual (por ejemplo, un VHH), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fc, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo Fv de cadena individual (scFv), un receptor de linfocitos T, una molécula de MHC de clase I, una molécula de MHC de clase II, o una combinación de los mismos.

Por ejemplo, en diversas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* se selecciona entre una proteína, un fragmento de proteína, un dominio de unión, un dominio de unión a diana, una proteína de unión, un fragmento de proteína de unión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, un anticuerpo de dominio individual (por ejemplo, un VHH), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fc, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo Fv de cadena individual (scFv), un receptor de linfocitos T, una molécula de MHC de clase I, una molécula de MHC de clase II, o una combinación de los mismos.

En diversas realizaciones, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por células, tal como la indicada por una respuesta de IFN- γ , en ausencia de una respuesta de IgA significativa, o en ausencia de una respuesta de IgE significativa, o en ausencia de una respuesta de IgG significativa, incluyendo la ausencia de una respuesta de IgG1 significativa, o la ausencia de una respuesta de IgG2 significativa, o en ausencia de una respuesta de IgM significativa.

En otro ejemplo, la respuesta inmunitaria es una respuesta humoral sin respuesta mediada por células significativa.

Se pretende que la referencia a un intervalo numérico desvelado en el presente documento (por ejemplo, 1 a 10) también incorpore la referencia a todos los números racionales en ese intervalo (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también cualquier intervalo numérico racional en ese intervalo (por ejemplo, 2 a 8, 1,5 a 5,5 y 3,1 a 4,7) y, por tanto, todos los subintervalos de todos los intervalos desvelados expresamente en el presente documento se desvelan expresamente por la presente. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados se han de considerar indicadas expresamente en la presente solicitud de forma similar.

En la presente memoria descriptiva, cuando se ha hecho referencia a memorias descriptivas de patentes, otros documentos externos u otras fuentes de información, generalmente se hace con el fin de proporcionar un contexto para discutir las características de la invención. A menos que se indique específicamente de otro modo, la referencia a tales documentos externos no se ha de interpretar como una admisión de que tales documentos, o tales fuentes de información, en cualquier jurisdicción, son técnica anterior, o forman parte del conocimiento general común en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los aspectos adicionales de la presente invención se volverán evidentes a partir de la siguiente descripción que se da únicamente a modo de ejemplo y por referencia a los dibujos adjuntos.

La **Figura 1** muestra una representación esquemática de genes híbridos cuyas proteínas de fusión median la producción de partículas de poliéster que presentan antígenos de TB.

La **Figura 2** representa microfotografías de microscopía de fluorescencia de *E. coli* BL21 (DE3) recombinante, que alberga pMCS69 y las diversas proteínas de fusión que codifican vectores de expresión de pET teñidas con rojo Nilo. (A) pET-14b phaC; (B) pET-14b cfp10-phaC; (C) pET-14b rv3615c-phaC; (D) pET-14b esat6-phaC; (E) pET-14b cfp10-rv3615c-phaC-esat6.

La **Figura 3** presenta un análisis de TEM de *E. coli* recombinante que alberga diversos plásmidos (A-E) y de partículas de poliéster aisladas que presentan antígenos micobacterianos (F-J). (A y F) pET-14b phaC; (B y G) pET-14b cfp10-phaC; (C y H) pET-14b rv3615c-phaC, (D e I) pET-14b esat6-phaC; (E y J) pET-14b cfp10-rv3615c-phaC-esat6.

La **Figura 4** presenta perfiles proteicos de partículas de poliéster aisladas de *E. coli* recombinante que albergan diversos plásmidos con y sin tratamiento de inhibidor de proteasas. Las proteínas de fusión en las fracciones de perlas de poliéster se analizaron mediante SDS-PAGE como sigue a continuación: Carriles 1-6, muestras sin tratamiento de inhibidor de proteasas y carriles 7-10 con tratamiento de inhibidor de proteasas. Carriles 1 y 7, marcador de peso molecular (Mark12, Invitrogen); carriles 2 y 8, PhaC (VW, 63 kDa); carril 3, Rv3615c-PhaC (75,2 kDa); carril 4, ESAT6-PhaC (74,3 kDa); carriles 5 y 9, CFP10-PhaC (75,2 kDa); carriles 6 y 10, CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6 (98,1 kDa). La presencia de proteínas de fusión de antígenos PhaC-TB se confirmó por determinación de huella peptídica triptica usando MALDI-TOF/MS (Tabla 3).

La **Figura 5** es un modelo de una partícula de poliéster presentadora de antígeno de TB triple de la invención producida mediante *E. coli* recombinante.

La **Figura 6** presenta gráficos que informan la evaluación de la reactividad de antígeno de TB *in vitro*. El ensayo ELISA se describe en *Materiales y métodos*. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. La media de la reactividad de antígeno de TB frente a un anticuerpo específico se informa $\pm$ SD.

(A) Reactividad de antígenos de TB en la superficie de partículas de poliéster. WT (partículas) es el control negativo. Se usaron antígenos de TB recombinantes (CFP10, Rv3615c, ESAT6, y la mezcla de CFP10, Rv3615c y ESAT6) como controles positivos. Las muestras de ensayo son antígenos de TB inmovilizados (perla-CFP10, perla-Rv3615c, perla-ESAT6, y perla-CFP10-Rv3615c-ESAT6). Anti-CFP10 y anti-ESAT6 fueron anticuerpos monoclonales de ratón y el anticuerpo policlonal anti-Rv3615c se produjo en conejo. * significativamente mayor que antígeno individual ($P < 0,05$).

(B) Experimento de control; el suero preinmune de conejo se usó para reemplazar a los tres anticuerpos específicos como se indica en la Figura B.

(C) Reactividades cruzadas de anticuerpos específicos con los otros dos antígenos de TB. La concentración total de proteínas de partículas de control, partículas de antígeno de TB, y antígenos recombinantes libres en esta figura fue 1 μ g/ml, 1 μ g/ml, y 0,125 μ g/ml, respectivamente. * significativamente mayor que todas las demás partículas ($P < 0,05$).

La **Figura 7** presenta gráficos que muestran la respuesta de ensayo cutáneo de TB. Se usaron cuatro reactivos de diagnóstico, PPD aviar (PPD-A), PPD bovino (PPD-B), partículas que presentan tres antígenos de TB y partículas de control para someter a ensayo piel de ganado. El resultado fue positivo si el aumento de grosor de piel fue $\geq$ 1 mm. (A) Ganado infectado experimentalmente con *M. bovis*. (B) Ganado no infectado expuesto naturalmente a micobacteria ambiental. Las barras indican la mediana.

La **Figura 8** presenta un gráfico que representa la construcción del plásmido que codifica una partícula de polímero de 4 antígenos de la invención, pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-conector-esat6-conector-rv3020c, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 2.

La **Figura 9** presenta un análisis de SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie (Life Technologies Bolt Bis-Tris al 10 %, 165 V x 35 min) de diversas muestras de la preparación y purificación de la partícula de polímero de 4 antígenos descrita en el presente documento en el Ejemplo 2, como sigue a continuación:

Carril 1 - Marcador; Carril 2 - Lisado; Carril 3 - Lavado con detergente 1 (DW1); Carril 4 - DW2; Carril 5 - Lavado cáustico; Carril 6 - Prefiltración de flujo tangencial (Pre TFF); Carril 7 - Post TFF 1; Carril 8 - Post TFF 2; Carril 9 - TFF final; Carril 10 - Producto en bruto.

La **Figura 10** presenta un gráfico que representa datos de respuesta a dosis de grosor de piel (mm) mediana de seis sujetos, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 3. Bovino - PPDB control, Aviar - PPDA control, BB - partículas de polímero que comprenden antígeno de TB tetravalentes (TTPP) sin diluir, 3 μ g - TTPP que proporcionan 3 μ g de antígenos totales, 3 μ g - TTPP que proporcionan 3 μ g de antígenos totales, 3 μ g - TTPP que proporcionan 3 μ g de antígenos totales, 1 μ g - TTPP que proporcionan 1 μ g de antígenos totales, 0,33 μ g - TTPP que proporcionan 0,33 μ g de antígenos totales, 0,11 μ g - TTPP que proporcionan 0,11 μ g de antígenos totales, 0,4 μ g - TTPP que proporcionan 0,4 μ g de antígenos totales, 0,1 μ g - TTPP que proporcionan 0,1 μ g de antígenos totales.

La **Figura 11** presenta un gráfico que representa datos de respuesta de grosor de piel (mm) media y mediana de seis sujetos en un ensayo de efectos de formulación, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 3. Bovino - PPDB control, Aviar - PPDA control, CI - TTPP en PBS/Dextrano que proporcionan 3 μ g de antígenos totales, C2 - TTPP en PBS/Dextrano que proporcionan 0,11 μ g de antígenos totales, C3 - TTPP en PBS/Dextrano que proporcionan 0,012 μ g de antígenos totales, C4 - TTPP en etanol al 2 % que proporcionan 3 μ g de antígenos totales, C5 - TTPP en etanol al 2 % que proporcionan 0,11 μ g de antígenos totales, C6 - TTPP en etanol al 2 % que

proporcionan 0,012 µg de antígenos totales, C7 -TTPP en Tris 10 mM (pH 8,5) que proporcionan 3 µg de antígenos totales, C8 -TTPP en Tris 10 mM (pH 8,5) que proporcionan 0,11 µg de antígenos totales, C9 -TTPP en Tris 10 mM (pH 8,5) que proporcionan 0,012 µg de antígenos totales.

La **Figura 12** presenta un gráfico que representa datos de respuesta de grosor de piel (mm) mediana de seis sujetos para ensayo de estabilidad y agregación, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 3. Bovino - PPDB control, Aviar - PPDA control, BB - partículas de polímero que comprenden antígeno de TB tetravalentes (TTPP) sin diluir, 4 Deg - TTPP que proporcionan 3 µg de antígenos totales almacenados durante 6 meses a 4 °C, 25 Deg - TTPP que proporcionan 3 µg de antígenos totales almacenados durante 6 meses a 25 °C, 37 Deg - TTPP que proporcionan 3 µg de antígenos totales almacenados durante 6 meses a 37 °C, 80 µm - TTPP en etanol al 2 % que proporcionan 3 µg de antígenos totales con tamaño medio de partícula de 80 µm, 20 µm - TTPP en etanol al 2 % que proporcionan 3 µg de antígenos totales con tamaño medio de partícula de 20 µm, 16 µm - TTPP en etanol al 2 % que proporcionan 3 µg de antígenos totales con tamaño medio de partícula de 16 µm.

La **Figura 13** presenta un gráfico que representa la distribución de tamaño medio de TTPP que contienen composiciones utilizadas en el Ejemplo 3 en el presente documento. Figura 13A DS627 A1 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en PBS/Dextrano que proporcionan 3 µg de antígenos totales, DS627 C4 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en etanol al 2 % que proporcionan 3 µg de antígenos totales, DS627 C7 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en Tris 10 mM (pH 8,5) que proporcionan 3 µg de antígenos totales, DS627 B4 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en etanol al 2 % con tamaño medio de partícula de 16 µm y que proporcionan 3 µg de antígenos totales, DS627 B5 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en etanol al 2 % con tamaño medio de partícula de 20 µm y que proporcionan 3 µg de antígenos totales, DS627 B6 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en etanol al 2 % con tamaño medio de partícula de 80 µm y que proporcionan 3 µg de antígenos totales. Figura 13B: DS627 B4 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en etanol al 2 % con tamaño medio de partícula de 16 µm y que proporcionan 3 µg de antígenos totales, DS627 B5 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en etanol al 2 % con tamaño medio de partícula de 20 µm y que proporcionan 3 µg de antígenos totales, DS627 B6 - TTPP producidas en el lote DS627 y formuladas en etanol al 2 % con tamaño medio de partícula de 80 µm y que proporcionan 3 µg de antígenos totales.

La **Figura 14** presenta un gráfico que representa datos de respuesta a dosis de grosor de piel (mm) mediana de seis sujetos para ensayo de variabilidad de lote, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 3. Bovino - PPDB control, Aviar - PPDA control, D1 -TTPP producidas en el lote DS498 y formuladas en PBS/Dextrano que proporcionan 3 µg de antígenos totales, D2 -TTPP producidas en el lote DS504 y formuladas en PBS/Dextrano que proporcionan 3 µg de antígenos totales, D3 -TTPP producidas en el lote DS507 y formuladas en PBS/Dextrano que proporcionan 3 µg de antígenos totales, D4 -TTPP producidas en el lote DS560 y formuladas en PBS/Dextrano que proporcionan 3 µg de antígenos totales, D5 -TTPP producidas en el lote DS585 y formuladas en PBS/Dextrano que proporcionan 3 µg de antígenos totales, D6 -TTPP producidas en el lote DS625 y formuladas en PBS/Dextrano que proporcionan 3 µg de antígenos totales.

La **Figura 15** presenta un gráfico que representa datos de IFN-γ (absorbancia a 450 nm) de 12 series de sujetos infectados con TB, como se describe en el Ejemplo 4 en el presente documento. N- control PBS, A - control PPDA, B - control PPDB, EC - antígeno ESAT6/CFP10 soluble (4 µg en pocillo), WT - PhaC-solo partículas de control, Ag 4 1 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 0,38 µg de antígenos totales, Ag 4 1/4 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 0,1 µg de antígenos totales, Ag 4 1/16 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 25 ng de antígenos totales, Ag 4 1/64 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 6 ng de antígenos totales, Ag 4 1/256 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 1,5 ng de antígenos totales, Clear Coli 1 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 0,38 µg de antígenos totales, Clear Coli 1/4 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 0,1 µg de antígenos totales, Clear Coli 1/16 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 25 ng de antígenos totales, Clear Coli 1/64 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 6 ng de antígenos totales, Clear Coli 1/256 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 1,5 ng de antígenos totales.

La **Figura 16** presenta un gráfico que representa datos de IFN-γ (absorbancia a 450 nm) de 10 series de sujetos no infectados, como se describe en el Ejemplo 4 en el presente documento. N - control PBS, A - control PPDA, B - control PPDB, EC - antígeno ESAT6/CFP10 soluble (4 µg en pocillo), WT - PhaC-solo partículas de control, Ag 4 1 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 0,38 µg de antígenos totales, Ag 4 1/4 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 0,1 µg de antígenos totales, Ag 4 1/16 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 25 ng de antígenos totales, Ag 4 1/64 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 6 ng de antígenos totales, Ag 4 1/256 - TTPP producidas en hospedador LPS+ que proporcionan 1,5 ng de antígenos totales, Clear Coli 1 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 0,38 µg de antígenos totales, Clear Coli 1/4 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 0,1 µg de antígenos totales, Clear Coli 1/16 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 25 ng de antígenos totales, Clear Coli 1/64 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 6 ng de antígenos totales, Clear Coli 1/256 - TTPP producidas en hospedador LPS- que proporcionan 1,5 ng de antígenos totales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a partículas de polímero y usos de las mismas. En particular, la presente invención se refiere a partículas de polímero funcionalizadas, por ejemplo, a procesos de producción de partículas de polímero

funcionalizadas, y a usos de las mismas en el diagnóstico, tratamiento o prevención de tuberculosis.

Las partículas de polímero funcionalizadas de la presente invención pueden comprender uno o más polipéptidos de fusión unidos a superficie, y también pueden comprender una o más sustancias incorporadas o adsorbidas al núcleo de partícula de polímero, una o más sustancias unidas a polipéptidos de fusión unidos a superficie, o una combinación de las mismas.

1. Definiciones

La expresión "región codificante" o "marco abierto de lectura" (ORF) se refiere a la cadena codificante de una secuencia de ADN genómico o una secuencia de ADNc que es capaz de producir un producto de transcripción y/o un polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La secuencia codificante se identifica mediante la presencia de un codón de inicio de traducción en 5' y un codón de terminación de traducción en 3'. Cuando se inserta en un constructo genético, una "secuencia codificante" es capaz de expresarse cuando está unida operativamente a secuencias de promotor y terminador.

La expresión "que comprende", como se usa en la presente memoria descriptiva, significa "que consiste al menos en parte en". Cuando se interpreta cada declaración de la presente memoria descriptiva que incluye la expresión "que comprende", también pueden estar presentes otras características distintas de las introducidas por la expresión. También se interpretan de la misma forma los términos relacionados tales como "comprender" y "comprende".

La expresión "reactivo de acoplamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto inorgánico u orgánico que es adecuado para unirse a al menos una sustancia o un reactivo de acoplamiento adicional que es adecuado para unirse a un reactivo de acoplamiento en un lado y a al menos una sustancia en el otro lado. Algunos ejemplos de reactivos de acoplamiento adecuados, así como métodos a modo de ejemplo para su uso incluyendo métodos adecuados para la modificación química de partículas o proteínas de fusión de la presente invención, se presentan en el documento de Patente PCT/DE2003/002799, publicado como WO 2004/020623 (Bernd Rehm), incorporado al presente documento por referencia en su totalidad.

La expresión "constructo de expresión" se refiere a un constructo genético que incluye elementos que permiten transcribir la molécula de polinucleótido inserto y, opcionalmente, traducir el transcrito en un polipéptido. Un constructo de expresión comprende por lo general, en dirección 5' a 3':

- (1) un promotor, funcional en la célula hospedadora en la que se introducirá el constructo,
- (2) el polinucleótido que se expresa, y
- (3) un terminador funcional en la célula hospedadora en la que se introducirá el constructo.

Los constructos de expresión de la invención están insertados en un vector replicable para clonación o para expresión, o que están incorporados al genoma del hospedador.

Se proporcionan algunos ejemplos de constructos de expresión susceptibles de adaptación para uso en la presente invención en el documento de Patente PCT/DE2003/002799 publicado como WO 2004/020623 (Bernd Rehm) y el documento de Patente PCT/NZ2006/000251 publicado como WO 2007/037706 (Bernd Rehm), que se incorporan cada uno al presente documento por referencia en su totalidad.

Las expresiones "forma una partícula de polímero" y "formación de partículas de polímero", como se usan en el presente documento, se refieren a la actividad de una proteína formadora de partícula como se discute en el presente documento.

Un "fragmento" de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que realiza una función que se requiere para la actividad enzimática o de unión y/o proporciona la estructura tridimensional del polipéptido.

La expresión "polipéptido de fusión", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende dos o más secuencias de aminoácidos, por ejemplo, dos o más dominios polipeptídicos, fusionados a través de los respectivos restos amino y carboxilo mediante un enlace peptídico para formar un polipéptido continuo individual. Se ha de entender que las dos o más secuencias de aminoácidos pueden estar directamente fusionadas o indirectamente fusionadas a través de sus respectivos extremos amino y carboxilo terminales a través de un conector o espaciador o un polipéptido adicional.

En una realización, una de las secuencias de aminoácidos que comprende el polipéptido de fusión comprende una proteína formadora de partícula.

En realizaciones particularmente contempladas de la invención, dos o más de las secuencias de aminoácidos que comprende el polipéptido de fusión comprenden un antígeno de *M. tuberculosis* seleccionado entre el grupo que comprende un antígeno ESAT6, un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, un antígeno Rv3615c, un dominio de unión capaz de unirse

a un antígeno Rv3615c, o un compañero de fusión.

En otras realizaciones particularmente contempladas de la invención, tres o más de las secuencias de aminoácidos que comprende el polipéptido de fusión comprenden un antígeno de *M. tuberculosis* seleccionado entre el grupo que comprende un antígeno ESAT6, un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10, un antígeno Rv3615c, un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, un antígeno Rv3020c, un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, o un compañero de fusión.

La expresión "compañero de fusión", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido tal como una proteína, un fragmento de proteína, un dominio de unión, un dominio de unión a diana, una proteína de unión, un fragmento de proteína de unión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, un anticuerpo de cadena individual, un anticuerpo de dominio individual (por ejemplo, un VHH), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fc, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo Fv de cadena individual (scFv), un dominio de unión de anticuerpo (por ejemplo, un dominio ZZ), un antígeno, un determinante antigénico, un epítipo, un hapteno, un inmunógeno, un fragmento de inmunógeno, biotina, un derivado de biotina, una avidina, una estreptoavidina, un sustrato, una enzima, una aczima, un cofactor, un receptor, un fragmento de receptor, una subunidad de receptor, un fragmento de subunidad de receptor, un ligando, un inhibidor, una hormona, una lectina, una polihistidina, un dominio de acoplamiento, un dominio de unión a ADN, un epítipo FLAG, un resto de cisteína, un péptido de genoteca, un péptido indicador, un péptido de purificación por afinidad, o cualquier combinación de dos cualesquiera o más de los mismos.

Se ha de entender que dos o más polipéptidos enumerados anteriormente pueden formar el compañero de fusión.

En una realización, las secuencias de aminoácidos del polipéptido de fusión están fusionadas indirectamente a través de un conector o espaciador, las secuencias de aminoácidos de dicho polipéptido de fusión están dispuestas en el orden, por ejemplo, polímero sintasa-conector-antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, o antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria-conector-polímero sintasa, o polímero sintasa-conector-dominio de unión de antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, o dominio de unión de antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria-conector-polímero sintasa. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos del polipéptido de fusión están indirectamente fusionadas o comprenden un polipéptido adicional dispuesto en el orden polímero sintasa-polipéptido adicional-antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria o polímero sintasa-polipéptido adicional-dominio de unión de un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, o polímero sintasa-conector-antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria-polipéptido adicional o polímero sintasa-conector-dominio de unión de un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria-polipéptido adicional. Nuevamente, se contemplan expresamente las extensiones N-terminales de la polímero sintasa en el presente documento.

La respuestas inmunitarias incluyen respuestas inmunitarias mediadas por células y/o humorales.

En una realización, las secuencias de aminoácidos del polipéptido de fusión están indirectamente fusionadas a través de un conector o espaciador, las secuencias de aminoácidos de dicho polipéptido de fusión están dispuestas en el orden, por ejemplo, polímero sintasa-conector-antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*-conector-polímero sintasa, o polímero sintasa-conector-dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*-conector-polímero sintasa. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos del polipéptido de fusión están indirectamente fusionadas o comprenden un polipéptido adicional dispuesto en el orden polímero sintasa-polipéptido adicional-antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o polímero sintasa-polipéptido adicional-dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, o polímero sintasa-conector-antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*-polipéptido adicional o polímero sintasa-conector-dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*-polipéptido adicional. Nuevamente, se contemplan expresamente las extensiones N-terminales de la polímero sintasa en el presente documento.

Un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención también puede comprender una o más secuencias polipeptídicas insertadas en la secuencia de otro polipéptido. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica tal como una secuencia de reconocimiento de proteasa está insertada en una región variable de una proteína que comprende un dominio de unión a partícula.

Convenientemente, un polipéptido de fusión de la invención está codificado por una única secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende al menos dos subsecuencias que codifican cada una un polipéptido o un dominio polipeptídico. En ciertas realizaciones, las al menos dos subsecuencias estarán presentes "en el marco" de modo que comprenderán un único marco abierto de lectura y de ese modo codificarán un polipéptido de fusión como se contemplan el presente documento. En otras realizaciones, las al menos dos subsecuencias están presentes "fuera de marco", y están separadas por un sitio de desplazamiento de marco ribosomal u otra secuencia que produzca un desplazamiento en el marco de lectura de modo que, en la traducción, se forme un polipéptido de fusión. En ciertas realizaciones, las al menos dos subsecuencias son contiguas. En otras realizaciones, tales como

las discutidas anteriormente cuando al menos dos polipéptidos o dominios polipeptídicos están indirectamente fusionados a través de un polipéptido adicional, las al menos dos subsecuencias no son contiguas.

La referencia a un "dominio de unión" o un "dominio capaz de unirse a" pretende indicar la mitad de una pareja de unión complementaria y puede incluir parejas de unión de la lista anterior. Por ejemplo, las parejas anticuerpo-antígeno, anticuerpo-dominio de unión a anticuerpo, biotina-estreptoavidina, receptor-ligando, enzima-inhibidor. Un dominio de unión a diana se unirá a una molécula diana en una muestra y es, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Un dominio de unión a polipéptido se unirá a un polipéptido y es, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un dominio de unión de un receptor o proteína de señalización.

Algunos ejemplos de sustancias que se unen mediante un dominio de unión incluyen una proteína, un fragmento de proteína, un péptido, un polipéptido, un fragmento de polipéptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un dominio de unión a anticuerpo, un antígeno, un fragmento de antígeno, un determinante antigénico, un epítipo, un hapteno, un inmunógeno, un fragmento de inmunógeno, un agente farmacéuticamente activo, un agente biológicamente activo, un adyuvante o cualquier combinación de dos cualesquiera o más de los mismos. Tales sustancias son "componentes diana" en una muestra que se analiza de acuerdo con un método de la invención.

Por consiguiente, se ha de entender que un "dominio capaz de unirse a [un antígeno]" y los equivalentes gramaticales se refieren a un componente en una pareja de unión complementaria, en donde el otro componente es el antígeno especificado.

Por consiguiente, un "dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis*" es un dominio que es capaz de unirse a uno o más antígenos de *M. tuberculosis*.

Un "antígeno de *M. tuberculosis*", como se usa en el presente documento, es un antígeno procedente de *M. tuberculosis*. Del mismo modo, otros antígenos se identifican por el organismo del que proceden.

La expresión "antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria" se refiere a un antígeno que, cuando está en contacto con uno o más agentes del sistema inmunitario, tales como uno o más anticuerpos o una o más células, es capaz de provocar o regular positivamente la sensibilidad del sistema inmunitario tal como, por ejemplo, una regulación positiva de una o más poblaciones de linfocitos T, tal como, por ejemplo, aumento de actividad o número de linfocitos T CD8+ o linfocitos T CD4+, o una regulación positiva en una o más poblaciones de linfocitos B, tal como una o más poblaciones de linfocitos B capaces de producir anticuerpos específicos frente al antígeno o capaces de unirse al antígeno, o un aumento en la cantidad o actividad de una o más poblaciones de anticuerpos.

La expresión "antígeno capaz de provocar una respuesta mediada por células" se refiere a un antígeno que, cuando está en contacto con una o más células del sistema inmunitario, es capaz de provocar o regular positivamente la sensibilidad del sistema inmunitario tal como, por ejemplo, una regulación positiva de una o más poblaciones de linfocitos T tal como, por ejemplo, un aumento de actividad o número de linfocitos T CD8+ o linfocitos T CD4+.

La expresión "constructo genético" se refiere a una molécula de polinucleótido, habitualmente ADN bicatenario, que puede tener insertada en la misma otra molécula de polinucleótido (la molécula de polinucleótido inserto) tal como, pero no limitada a, una molécula de ADNc. Un constructo genético puede contener los elementos necesarios que permitan transcribir la molécula de polinucleótido inserto y, opcionalmente, traducir el transcrito a un polipéptido. La molécula de polinucleótido inserto procede de la célula hospedadora, o procede de una célula u organismo diferente y/o es un polinucleótido recombinante. Una vez en el interior de la célula hospedadora, el constructo genético queda integrado en el ADN cromosómico hospedador. En un ejemplo, el constructo genético está unido a un vector.

La expresión "célula hospedadora" se refiere a una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula animal tal como una célula hospedadora de mamífero que es 1) una célula hospedadora productora de partícula de PHA natural, o 2) una célula hospedadora que porta un constructo de expresión que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una tiolasa y una reductasa y opcionalmente una fasina. Los genes requeridos para aumentar los carentes en la célula hospedadora para la formación de partícula de polímero dependerán de la composición genética de la célula hospedadora y de los sustratos proporcionados en el medio de cultivo.

La expresión "conector" o "espaciador", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que fusiona indirectamente dos o más polipéptidos o dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican dos o más polipéptidos. En algunas realizaciones, el conector o espaciador tiene aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o aproximadamente 100 aminoácidos o nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el conector o espaciador tiene aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o aproximadamente 1000 aminoácidos o nucleótidos de longitud. En aún otras realizaciones, el conector o espaciador tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 aminoácidos o nucleótidos de longitud, de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 300 a

aproximadamente 1000, de aproximadamente 400 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 600 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 700 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 800 a aproximadamente 1000, o de aproximadamente 900 a aproximadamente 1000 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

En una realización, el conector o espaciador puede comprender un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción. En otra realización, el conector o espaciador puede comprender una secuencia de reconocimiento de escisión de proteasa, tal como una secuencia de reconocimiento de enteroquinasa, trombina o Factor Xa, o un elemento de autoempalme tal como una inteína. En otra realización, el conector o espaciador facilita el plegado independiente de los polipéptidos de fusión.

La expresión "población mixta", como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más poblaciones de entidades, difiriendo cada población de entidades de la población mixta en ciertos aspectos con respecto a otra población de entidades de la población mixta. Por ejemplo, cuando se usa por referencia a una población mixta de constructos de expresión, esto se refiere a dos o más poblaciones de constructos de dispersión donde cada población de constructos de expresión difiere con respecto al polipéptido de fusión codificado por los miembros de esa población, o con respecto a algún otro aspecto del constructo tal como, por ejemplo, la identidad del promotor presente en el constructo. Alternativamente, cuando se usa por referencia a una población mixta de polipéptidos de fusión, esto se refiere a dos o más poblaciones de polipéptidos de fusión donde cada población de polipéptidos de fusión difiere con respecto a los polipéptidos, tales como polímero sintasa, el antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células, o el dominio de unión capaz de unirse a un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células, que contienen los miembros de esa población. Por ejemplo, en el contexto del uso en el tratamiento de tuberculosis, una población mixta de polipéptidos de fusión se refiere a dos o más poblaciones de polipéptidos de fusión donde cada población de polipéptidos de fusión difiere con respecto a los polipéptidos, tales como polímero sintasa, el antígeno de *M. tuberculosis*, o los dominios de unión a antígeno de *M. tuberculosis*, que contienen los miembros de esa población. Además, cuando se usa por referencia a una población mixta de partículas de polímero, esto se refiere a dos o más poblaciones de partículas de polímero, donde cada población de partículas de polímero difiere con respecto al polipéptido de fusión o polipéptidos de fusión que portan los miembros de esa población.

La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero mono o bicatenario de bases de desoxirribonucleótido, ribonucleótido o análogos conocidos de nucleótidos naturales, o mezclas de los mismos. La expresión incluye la referencia a una secuencia especificada así como a una secuencia complementaria a la misma, a menos que se indique de otro modo. La expresión "ácido nucleico" y el término "polinucleótido" se usan de forma intercambiable en el presente documento.

"Unido operativamente" significa que la secuencia que se expresa está situada bajo el control de elementos reguladores que incluyen promotores, elementos reguladores específicos de tejido, elementos reguladores temporales, potenciadores, represores y terminadores.

El término "sobreexpresión" se refiere generalmente la producción de un producto génico en una célula hospedadora que excede los niveles de producción en células hospedadoras normales o no transformadas. El término "sobreexpresión", cuando se usa con respecto a los niveles de ARN mensajero, indica preferentemente un nivel de expresión al menos aproximadamente 3 veces mayor que el observado habitualmente en una célula hospedadora en una célula de control o no transformada. Más preferentemente, el nivel de expresión es al menos aproximadamente 5 veces mayor, aproximadamente 10 veces mayor, aproximadamente 15 veces mayor, aproximadamente 20 veces mayor, aproximadamente 25 veces mayor, aproximadamente 30 veces mayor, aproximadamente 35 veces mayor, aproximadamente 40 veces mayor, aproximadamente 45 veces mayor, aproximadamente 50 veces mayor, aproximadamente 55 veces mayor, aproximadamente 60 veces mayor, aproximadamente 65 veces mayor, aproximadamente 70 veces mayor, aproximadamente 75 veces mayor, aproximadamente 80 veces mayor, aproximadamente 85 veces mayor, aproximadamente 90 veces mayor, aproximadamente 95 veces mayor, o aproximadamente 100 veces mayor o más, que el observado habitualmente en una célula hospedadora de control o una célula no transformada.

Los niveles de ARNm se miden usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia de Northern y RT-PCR, incluyendo RT-PCR cuantitativa.

La expresión "proteína formadora de partícula", como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas implicadas en la formación de la partícula. Por ejemplo, pueden seleccionarse entre el grupo de proteínas que comprende una polímero despolimerasa, un regulador de polímero, una polímero sintasa y una proteína determinante del tamaño de partícula. Preferentemente, la proteína formadora de partícula se selecciona entre el grupo que comprende una tiolasa, una reductasa, una polímero sintasa y una fasina. Una proteína formadora de partícula, tal como una sintasa, puede catalizar la formación de una partícula de polímero mediante polimerización de un sustrato o un derivado de un sustrato para formar una partícula de polímero. Alternativamente, una proteína formadora de partícula, tal como una tiolasa, una reductasa o una fasina, puede facilitar la formación de una partícula de polímero

facilitando la polimerización. Por ejemplo, una tiolasa o reductasa puede catalizar la producción de sustratos adecuados para una polimerasa. Una fasina puede controlar el tamaño de la partícula de polímero formada. Preferentemente, la proteína formadora de partícula comprende un dominio de unión a partícula y un dominio formador de partícula.

Como se usa en el presente documento, la expresión "mezcla de reacción formadora de partícula" se refiere a al menos un sustrato de polímero sintasa si la célula hospedadora o el constructo de expresión comprende un dominio catalítico de sintasa o una polímero sintasa y su sustrato si la célula hospedadora o el constructo de expresión comprende otra proteína formadora de partícula o un dominio de unión a partícula que no es un dominio catalítico de polímero sintasa.

Una "proteína determinante del tamaño de partícula" se refiere a una proteína que controla el tamaño de las partículas de polímero. Por ejemplo, puede proceder de la familia de las proteínas similares a fasina, seleccionada preferentemente entre las de los géneros *Ralstonia*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas*, más preferentemente el gen de fasina phaP de *Ralstonia eutropha* y el gen de fasina phaF de *Pseudomonas oleovorans*. Las fasinas son proteínas anfífilas con un peso molecular de 14 a 28 kDa que se unen fuertemente a la superficie hidrófoba de las partículas de polímero. También pueden comprender otras proteínas de célula hospedadora que se unan a partículas e influyan en el tamaño de partícula.

Se ha de entender que los patógenos son habitualmente específicos de hospedador. Por consiguiente, los métodos y composiciones de la invención son susceptibles de usarse en especies hospedadoras particulares frente a un patógeno particular, incluyendo frente a un patógeno específico de especie. Por ejemplo, las realizaciones para sujetos humanos, por ejemplo para uso en la detección de patógenos de tuberculosis específicos del ser humano, se centrarán habitualmente en *Mycobacterium tuberculosis*.

En otros ejemplos, las realizaciones para uso con sujetos bovinos, cérvidos y ovinos, se dirigirán habitualmente a *Mycobacterium* spp., incluyendo, por ejemplo, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, y otras *Mycobacterium* spp.

Por consiguiente, un "sujeto" es un animal, tal como un mamífero, incluyendo un animal mamífero de compañía o un ser humano. Los animales de compañía representativos incluyen los felinos, equinos y caninos. Los animales agrícolas representativos incluyen los bovinos, ovinos, cérvidos y porcinos. En una realización, el ser humano es un adulto, un niño o un infante, incluyendo un adulto, niño o infante inmunocomprometido o un adulto, niño o infante vacunado contra, infectado con, expuesto a, o en riesgo de infección por o exposición a, un patógeno.

El término "tratar" y sus derivados (incluyendo "tratamiento") se han de interpretar en su contexto más amplio posible. No ha de entenderse que el término implica que un sujeto se trate hasta su total recuperación. Por consiguiente, "tratar" incluye ampliamente mejora y/o prevención del inicio de síntomas o la gravedad de una afección particular.

Un "regulador de polímero", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que regula la transcripción de los genes phaA, phaB y phaC implicados en la formación de las partículas de polímero. Se retira de la regulación de transcripción por unión a la superficie de la partícula. Un ejemplo de tal regulador es el represor de fasina (phaR) de *R. eutropha* YP_725943, que se une al promotor de un gen similar a fasina, cuyo producto de expresión regula el tamaño de las partículas de polímero formadas, y evita que se lea el gen. Debido a que el represor de fasina se une a la superficie de las partículas de polímero formadas, este sitio del promotor se libera y puede comenzar la transcripción del gen subyacente. Una "polímero sintasa", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que es capaz de catalizar la formación de una partícula de polímero mediante polimerización de un sustrato o un derivado de un sustrato para formar una partícula de polímero. Se han obtenido las secuencias nucleotídicas de 88 genes de PHA sintasa de más de 45 especies de bacterias diferentes, que difieren en estructura primaria, especificidad de sustrato y composición de subunidades (Rehm, 2007).

Una polímero sintasa comprende al menos un dominio catalítico de sintasa en el extremo C-terminal de la proteína sintasa que media la polimerización del polímero y la unión de la proteína sintasa al núcleo de la partícula. Las polímero sintasas para uso en la presente invención se describen con detalle en Rehm, 2003, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Por ejemplo, la polímero sintasa es una PHA sintasa de la clase 1 de los géneros *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Alcaligenes*, *Delftia*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Rhodobacter*, *Paracoccus*, *Rickettsia*, *Caulobacter*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rickettsia*, *Crenarchaeota*, *Synechocystis*, *Ectothiorhodospira*, *Thiocapsa*, *Thyocystis* y *Allochromatium*, la clase 2 de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*, o la clase 4 de los géneros *Bacillus*, más preferentemente del grupo que comprende la clase 1 de *Acinetobacter* sp. RA3849, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas punctata* FA440, *Aeromonas hydrophila*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Zoogloea ramigera*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes* sp. SH-69, *Delftia acidovorans*, *Burkholderia* sp. DSMZ9242, *Ralstonia eutrophia* H16, *Burkholderia cepacia*, *Rhodococcus ruber* PP2, *Gordonia rubripertinctus*, *Rickettsia prowazekii*, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* NI, *Thiocapsa pfennigii* 9111, *Allochromatium vinosum* D, *Thyocystis violacea* 2311, *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter capsularis*, *Caulobacter crescentus*,

Methylobacterium extorquens, *Azorhizobium caulinodans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* 41, *Rhodospirillum rubrum* HA, y *Rhodospirillum rubrum* ATCC25903, la clase 2 de *Burkholderia caryophylli*, *Pseudomonas chloraphis*, *Pseudomonas* sp. 61-3, *Pseudomonas putida* U, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pseudocaligenes*, *Pseudomonas putida* BM01, *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas chloraphis*, y la clase 4 de *Bacillus megaterium* y *Bacillus* sp. INT005.

Otras polímero sintasas susceptibles de usarse en la presente invención incluyen polímero sintasas, identificadas cada una por su número de acceso, de los siguientes organismos: *C. necator* (AY836680), *P. aeruginosa* (AE004091), *A. vinosum* (AB205104), *B. megaterium* (AF109909), *H. marismortui* (YP137339), *P. aureofaciens* (AB049413), *P. putida* (AF150670), *R. eutropha* (A34341), *T. pfennigii* (X93599), *A. punctata* (032472), *Pseudomonas* sp. 61-3 (AB014757 y AB014758), *R. sphaeroides* (AAA72004), *C. violaceum* (AAC69615), *A. borkumensis* SK2 (CAL17662), *A. borkumensis* SK2 (CAL16866), *R. sphaeroides* KD131 (ACM01571 e YP002526072), *R. opacus* B4 (BAH51880 e YP002780825), *B. multivorans* ATCC 17616 (YP001946215 y BAG43679), *A. borkumensis* SK2 (YP693934 e YP693138), *R. rubrum* (AAD53179), gamma proteobacteria HTCC5015 (ZP05061661 y EDY86606), *Azoarcus* sp. BH72 (YP932525), *C. violaceum* ATCC 12472 (NP902459), *Limnobacter* sp. MED105 (ZP01915838 y EDM82867), *M. algicola* DG893 (ZP01895922 y EDM46004), *R. sphaeroides* (CAA65833), *C. violaceum* ATCC 12472 (AAQ60457), *A. latus* (AAD10274, AAD01209 y AAC83658), *S. maltophilia* K279a (CAQ46418 e YP001972712), *R. solanacearum* IPO1609 (CAQ59975 e YP002258080), *B. multivorans* ATCC 17616 (YP001941448 y BAG47458), *Pseudomonas* sp. g113 (ACJ02400), *Pseudomonas* sp. g106 (ACJ02399), *Pseudomonas* sp. g101 (ACJ02398), *R. sp.* gl32 (ACJ02397), *R. leguminosarum* bv viciae 3841 (CAK10329 e YP770390), *Azoarcus* sp. BH72 (CAL93638), *Pseudomonas* sp. LDC-5 (AAV36510), *L. nitroferum* 2002 (ZP03698179), *Thauera* sp. MZ1T (YP002890098 y ACR01721), *M. radiotolerans* JCM 2831 (YP001755078 y ACB24395), *Methylobacterium* sp. 4-46 (YP001767769 y ACA15335), *L. nitroferum* 2002 (EEG08921), *P. denitrificans* (BAA77257), *M. gryphiswaldense* (ABG23018), *Pseudomonas* sp. USM4-55 (ABX64435 y ABX64434), *A. hydrophila* (AAT77261 y AAT77258), *Bacillus* sp. INT005 (BAC45232 y BAC45230), *P. putida* (AAM63409 y AAM63407), *G. rubripertinctus* (AAB94058), *B. megaterium* (AAD05260), *D. acidovorans* (BAA33155), *P. seriniphilus* (ACM68662), *Pseudomonas* sp. 14-3 (CAK18904), *Pseudomonas* sp. LDC-5 (AAX18690), *Pseudomonas* sp. PC17 (ABV25706), *Pseudomonas* sp. 3Y2 (AAV35431, AAV35429 y AAV35426), *P. mendocina* (AAM10546 y AAM10544), *P. nitroreducens* (AAK19608), *P. pseudoalcaligenes* (AAK19605), *P. resinovorans* (AAD26367 y AAD26365), *Pseudomonas* sp. USM7-7 (ACM90523 y ACM90522), *P. fluorescens* (AAP58480) y otras bacterias no cultivadas (BAE02881, BAE02880, BAE02879, BAE02878, BAE02877, BAE02876, BAE02875, BAE02874, BAE02873, BAE02872, BAE02871, BAE02870, BAE02869, BAE02868, BAE02867, BAE02866, BAE02865, BAE02864, BAE02863, BAE02862, BAE02861, BAE02860, BAE02859, BAE02858, BAE02857, BAE07146, BAE07145, BAE07144, BAE07143, BAE07142, BAE07141, BAE07140, BAE07139, BAE07138, BAE07137, BAE07136, BAE07135, BAE07134, BAE07133, BAE07132, BAE07131, BAE07130, BAE07129, BAE07128, BAE07127, BAE07126, BAE07125, BAE07124, BAE07123, BAE07122, BAE07121, BAE07120, BAE07119, BAE07118, BAE07117, BAE07116, BAE07115, BAE07114, BAE07113, BAE07112, BAE07111, BAE07110, BAE07109, BAE07108, BAE07107, BAE07106, BAE07105, BAE07104, BAE07103, BAE07102, BAE07101, BAE07100, BAE07099, BAE07098, BAE07097, BAE07096, BAE07095, BAE07094, BAE07093, BAE07092, BAE07091, BAE07090, BAE07089, BAE07088, BAE07053, BAE07052, BAE07051, BAE07050, BAE07049, BAE07048, BAE07047, BAE07046, BAE07045, BAE07044, BAE07043, BAE07042, BAE07041, BAE07040, BAE07039, BAE07038, BAE07037, BAE07036, BAE07035, BAE07034, BAE07033, BAE07032, BAE07031, BAE07030, BAE07029, BAE07028, BAE07027, BAE07026, BAE07025, BAE07024, BAE07023, BAE07022, BAE07021, BAE07020, BAE07019, BAE07018, BAE07017, BAE07016, BAE07015, BAE07014, BAE07013, BAE07012, BAE07011, BAE07010, BAE07009, BAE07008, BAE07007, BAE07006, BAE07005, BAE07004, BAE07003, BAE07002, BAE07001, BAE07000, BAE06999, BAE06998, BAE06997, BAE06996, BAE06995, BAE06994, BAE06993, BAE06992, BAE06991, BAE06990, BAE06989, BAE06988, BAE06987, BAE06986, BAE06985, BAE06984, BAE06983, BAE06982, BAE06981, BAE06980, BAE06979, BAE06978, BAE06977, BAE06976, BAE06975, BAE06974, BAE06973, BAE06972, BAE06971, BAE06970, BAE06969, BAE06968, BAE06967, BAE06966, BAE06965, BAE06964, BAE06963, BAE06962, BAE06961, BAE06960, BAE06959, BAE06958, BAE06957, BAE06956, BAE06955, BAE06954, BAE06953, BAE06952, BAE06951, BAE06950, BAE06949, BAE06948, BAE06947, BAE06946, BAE06945, BAE06944, BAE06943, BAE06942, BAE06941, BAE06940, BAE06939, BAE06938, BAE06937, BAE06936, BAE06935, BAE06934, BAE06933, BAE06932, BAE06931, BAE06930, BAE06929, BAE06928, BAE06927, BAE06926, BAE06925, BAE06924, BAE06923, BAE06922, BAE06921, BAE06920, BAE06919, BAE06918, BAE06917, BAE06916, BAE06915, BAE06914, BAE06913, BAE06912, BAE06911, BAE06910, BAE06909, BAE06908, BAE06907, BAE06906, BAE06905, BAE06904, BAE06903, BAE06902, BAE06901, BAE06900, BAE06899, BAE06898, BAE06897, BAE06896, BAE06895, BAE06894, BAE06893, BAE06892, BAE06891, BAE06890, BAE06889, BAE06888, BAE06887, BAE06886, BAE06885, BAE06884, BAE06883, BAE06882, BAE06881, BAE06880, BAE06879, BAE06878, BAE06877, BAE06876, BAE06875, BAE06874, BAE06873, BAE06872, BAE06871, BAE06870, BAE06869, BAE06868, BAE06867, BAE06866, BAE06865, BAE06864, BAE06863, BAE06862, BAE06861, BAE06860, BAE06859, BAE06858, BAE06857, BAE06856, BAE06855, BAE06854, BAE06853 y BAE06852).

El fragmento N-terminal de una proteína PHA sintasa (aproximadamente los aminoácidos 1 a 200, o 1 a 150, o 1 a 100) es altamente variable y, en algunos ejemplos, está suprimido o reemplazado por un antígeno, un dominio de unión a antígeno, u otro compañero de fusión sin inactivar la enzima o evitando la unión covalente de la sintasa

mediante el dominio de unión a partícula de polímero (es decir, el fragmento C-terminal) al núcleo del polímero. El dominio de unión a partícula de polímero capaz de unirse a la sintasa comprende al menos el dominio catalítico de la proteína sintasa que media la polimerización del núcleo del polímero y la formación de las partículas de polímero.

- 5 En algunas realizaciones, el fragmento C-terminal de la proteína PHA sintasa está modificado, parcialmente suprimido o parcialmente reemplazado con un antígeno capaz de provocar la respuesta inmunitaria, un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, u otro compañero de fusión sin inactivar la enzima o evitar la unión covalente de la sintasa a la partícula de polímero.
- 10 En ciertos casos, el antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, el dominio de unión capaz de unirse a un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, u otro compañero de fusión están fusionados al extremo N-terminal o al extremo C-terminal de la proteína PHA sintasa sin inactivar la enzima o evitar la unión covalente de la sintasa a la partícula de polímero. Del mismo modo, en otros casos, el antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, el dominio de unión capaz de unirse a un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria, u otro
- 15 compañero de fusión están insertados en la proteína PHA sintasa, o de hecho en la proteína formadora de partícula. Algunos ejemplos de fusiones de PhaC se conocen en la técnica y se presentan en el presente documento.

- En un ejemplo, el fragmento N-terminal de la proteína PHA sintasa (aproximadamente los aminoácidos 1 a 200, o 1 a 150, o 1 a 100) es altamente variable y está suprimido o reemplazado por un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, u otro compañero de fusión sin inactivar la enzima o evitar la unión covalente (la unión covalente se produce a través del sitio activo desde el que sobresale el poliéster
- 20 naciente) de la sintasa mediante el dominio de unión a partícula de polímero (es decir, el fragmento C-terminal (este dominio se une mediante interacción hidrófoba)) a la partícula de polímero. El dominio de unión a partícula de polímero de la sintasa comprende al menos el dominio catalítico de la proteína sintasa que media la polimerización de la
- 25 partícula de polímero y la formación de las partículas de polímero.

- El fragmento C-terminal de la proteína PHA sintasa también puede estar modificado, parcialmente suprimido o parcialmente reemplazado, por ejemplo con los antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* descritos en el presente documento, o con un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* como se contempla en el presente
- 30 documento, u otro compañero de fusión sin inactivar la enzima o evitar la unión covalente de la sintasa a la partícula de polímero.

- En ciertos casos, el antígeno o antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o el dominio o dominios de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* u otro compañero de fusión están fusionados al extremo N-terminal o al extremo C-terminal de la proteína PHA sintasa sin inactivar la enzima o evitar la unión covalente de la sintasa a la partícula de
- 35 polímero. Del mismo modo, en otros casos, el antígeno o antígenos de X, el dominio o dominios de unión a antígeno de X, u otro compañero de fusión están insertados en la proteína PHA sintasa, o de hecho en la proteína formadora de partícula. Algunos ejemplos de fusiones de PhaC se conocen en la técnica y se presentan en el presente documento.

- Una "polímero despolimerasa", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que es capaz de hidrolizar el polímero existente, tal como el que se encuentra en una partícula de polímero, en monómeros y oligómeros solubles en agua. Algunos ejemplos de polímero despolimerasas aparecen en una amplia diversidad de bacterias y hongos degradadores de PHA, e incluyen las despolimerasas extracelulares PhaZ1-PhaZ7 de *Paucimonas lemoignei*,
- 40 las despolimerasas PhaZ de *Acidovorax* sp., *A. faecalis* (cepas AE122 y TI), *Delftia (Comamonas) acidovorans* cepa YM1069, *Comamonas testosteroni*, *Comamonas* sp., *Leptothrix* sp. cepa HS, *Pseudomonas* sp. cepa GM101 (n.º de acceso AF293347), *P. fluorescens* cepa GK13, *P. stutzeri*, *R. pickettii* (cepas A1 y K1, n.º de acceso J04223, D25315), *S. exfoliatus* K10 y *Streptomyces hygroscopicus* (véase Jendrosseck D., y Handrick, R., Microbial Degredation of Polyhydroxyalkanoates, Annual Review of Microbiology, 2002, 56:403-32).

- El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, incluye cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, pero preferentemente al menos 5 aminoácidos, incluyendo proteínas de longitud total, en las que los restos de aminoácidos están unidos mediante enlaces covalentes peptídicos. Los polipéptidos la presente invención son productos naturales purificados, o se producen parcial o completamente usando técnicas recombinantes o sintéticas.
- 50 El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro múltiplo, un polipéptido de fusión, una variante de polipéptido, o un derivado del mismo.

- El término "promotor" se refiere a elementos reguladores *cis* no transcritos corriente arriba de la región codificante que regula la transcripción génica. Los promotores comprenden elementos iniciadores *cis* que especifican el sitio de inicio de transcripción y cajas conservadas tales como la caja TATA, y motivos que están unidos mediante factores de transcripción.
- 60

- El término "terminador" se refiere a secuencias que finalizan la transcripción, que se encuentran en los extremos no traducidos 3' de genes corriente abajo de la secuencia traducida. Los terminadores son determinantes importantes de la estabilidad del ARNm y, en algunos casos, se ha descubierto que tienen funciones reguladoras espaciales.
- 65

El término "sustancia", cuando se hace referencia en relación a estar unido o absorbido en o incorporado a una partícula de polímero, pretende indicar una sustancia que está unida mediante un compañero de fusión o una sustancia que es capaz de estar absorbida en o incorporada a una partícula de polímero.

- 5 El término "variante", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas diferentes de las secuencias identificadas específicamente, en donde uno o más nucleótidos o restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos, o añadidos. Las variantes son variantes alélicas de origen natural o variantes de origen no natural. Las variantes son de especies iguales o diferentes y pueden incluir homólogos, parálogos u ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes de los polinucleótidos y polipéptidos poseen actividades biológicas que son iguales o similares a las de los polinucleótidos o polipéptidos de tipo natural. El término "variante", por referencia a polinucleótidos y polipéptidos, incluye todas las formas de polinucleótidos y polipéptidos, como se definen en el presente documento.

Variantes de polinucleótidos y polipéptidos

- 15 El término "polinucleótido" o "polinucleótidos", como se usa en el presente documento, significa un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos mono o bicatenario de cualquier longitud, pero preferentemente al menos 15 nucleótidos, e incluye, como ejemplos no limitantes, secuencias codificantes y no codificantes de un gen, complementos de secuencias sentido y antisentido, exones, intrones, ADN genómico, ADNc, pre-ARNm, ARNm, ARNr, ARNip, miARN, ARNt, ribozimas, polipéptidos recombinantes, secuencias de ADN o ARN de origen natural aisladas y purificadas, secuencias de ARN y ADN sintéticas, sondas de ácido nucleico, cebadores y fragmentos. También se contemplan una diversidad de análogos de ácido nucleico bien conocidos en la técnica.

- 25 Un "fragmento" de una secuencia polinucleotídica proporcionado en el presente documento es una subsecuencia de nucleótidos contiguos que tiene preferentemente al menos 15 nucleótidos de longitud. Los fragmentos de la invención comprenden preferentemente al menos 20 nucleótidos, más preferentemente al menos 30 nucleótidos, más preferentemente al menos 40 nucleótidos, más preferentemente al menos 50 nucleótidos y lo más preferentemente al menos 60 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de la invención. Un fragmento de una secuencia polinucleotídica puede usarse en tecnología de antisentido, silenciamiento génico, triple hélice o ribozima, o como cebador, sonda, incluyendo una micromatriz, o usarse en métodos de selección basados en polinucleótidos.

- 35 El término "fragmento", en relación con secuencias polinucleotídicas de promotor, pretende incluir secuencias que comprenden elementos *cis* y regiones de la secuencia polinucleotídica de promotor capaces de regular la expresión de una secuencia polinucleotídica a la que el fragmento está unido operativamente.

- Preferentemente, los fragmentos de secuencias polinucleotídicas de promotor de la invención comprenden al menos 20, más preferentemente al menos 30, más preferentemente al menos 40, más preferentemente al menos 50, más preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 200, más preferentemente al menos 300, más preferentemente al menos 400, más preferentemente al menos 500, más preferentemente al menos 600, más preferentemente al menos 700, más preferentemente al menos 800, más preferentemente al menos 900 y lo más preferentemente al menos 1000 nucleótidos contiguos de un polinucleótido promotor de la invención.

- 45 El término "cebador" se refiere a un polinucleótido corto, que tiene habitualmente un grupo 3'OH libre, que se hibrida en una plantilla y se usa para cebar la polimerización de un polinucleótido complementario en la plantilla. Tal cebador tiene preferentemente al menos 5, más preferentemente al menos 6, más preferentemente al menos 7, más preferentemente al menos 9, más preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 11, más preferentemente al menos 12, más preferentemente al menos 13, más preferentemente al menos 14, más preferentemente al menos 15, más preferentemente al menos 16, más preferentemente al menos 17, más preferentemente al menos 18, más preferentemente al menos 19, más preferentemente al menos 20 nucleótidos de longitud.

- 55 El término "sonda" se refiere a un polinucleótido corto que se usa para detectar una secuencia polinucleotídica que es complementaria a la sonda, en un ensayo basado en hibridación. La sonda puede consistir en un "fragmento" de un polinucleótido como se define en el presente documento. Preferentemente, tal sonda tiene al menos 5, más preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 20, más preferentemente al menos 30, más preferentemente al menos 40, más preferentemente al menos 50, más preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 200, más preferentemente al menos 300, más preferentemente al menos 400 y lo más preferentemente al menos 500 nucleótidos de longitud.

- 60 El término "variante", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas diferentes de las secuencias identificadas específicamente, en donde uno o más nucleótidos o restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos, o añadidos. Las variantes son variantes alélicas de origen natural o variantes de origen no natural. Las variantes son de especies iguales o diferentes y pueden incluir homólogos, parálogos y ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes de los polinucleótidos y polipéptidos poseen actividades biológicas que son iguales o similares a las de los polinucleótidos o polipéptidos de tipo natural. El término "variante", por referencia a polinucleótidos y polipéptidos, incluye todas las formas de polinucleótidos y polipéptidos, como se definen en el

presente documento.

Variantes de polinucleótidos

- 5 Las secuencias polinucleotídicas variantes exhiben preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 51 %, al menos un 52 %, al menos un 53 %, al menos un 54 %, al menos un 55 %, al menos un 56 %, al menos un 57 %, al menos un 58 %, al menos un 59 %, al menos un 60 %, al menos un 61 %, al menos un 62 %, al menos un 63 %, al menos un 64 %, al menos un 65 %, al menos un 66 %, al menos un 67 %, al menos un 68 %, al menos un 69 %, al menos un 70 %, al menos un 71 %, al menos un 72 %, al menos un 73 %, al menos un 74 %, al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad con respecto a una secuencia polinucleotídica especificada. La identidad se descubre en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótido, preferentemente al menos 50 posiciones de nucleótido, al menos 100 posiciones de nucleótido o más de la longitud total de la secuencia polinucleotídica especificada.

20 La identidad de secuencia polinucleotídica puede determinarse de la siguiente forma. La secuencia polinucleotídica objeto se compara con una secuencia polinucleotídica candidata usando BLASTN (del conjunto de programas BLAST, versión 2.2.10 [Oct. 2004]) en bl2seq (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), que está disponible públicamente en NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utilizan los parámetros por defecto de bl2seq excepto que se debería desconectar el filtrado de las partes de baja complejidad.

25 La identidad de secuencias polinucleotídicas puede examinarse usando los siguientes parámetros de línea de comando Unix: bl2seq -i nucleotideseql -j nucleotideseq2 -F F -p blastn.

30 El parámetro -F F desconecta el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el emparejamiento de secuencias. El programa bl2seq informa la identidad de secuencia como el número y porcentaje de nucleótidos idénticos en una línea "Identities = ".

35 La identidad de secuencia polinucleotídica también puede calcularse en la longitud completa de la superposición entre una secuencia polinucleotídica candidata y una objeto usando programas de alineación de secuencia global (por ejemplo, Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Una alineación completa del algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch se encuentra en el programa Needle del paquete EMBOSS (Rice. P. Longden. I. y Bleasby. A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Trends in Genetics, junio de 2000, vol. 16, N.º 6. pp. 276-277) que puede obtenerse en <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>. El servidor del Instituto europeo de bioinformática también proporciona la posibilidad de realizar alineaciones globales Needle-EMBOSS entre dos secuencias en línea en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>.

45 Alternativamente, puede usarse el programa GAP, que calcula una alineación global óptima de dos secuencias sin penalizar los huecos terminales. GAP se describe en la siguiente publicación: Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235.

50 Las variantes de polinucleótidos de la presente invención también incluyen las que exhiben una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que conserve la equivalencia funcional de esas secuencias y que razonablemente no cabría esperar que se produzca de forma aleatoria. Tal similitud de secuencia con respecto a los polipéptidos se determina usando el programa disponible públicamente bl2seq del conjunto de programas BLAST (versión 2.2.10 [Oct. 2004]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>).

La similitud de secuencias polinucleotídicas puede examinarse usando los siguientes parámetros de línea de comando Unix: bl2seq -i nucleotideseql -j nucleotideseq2 -F F -p Tblastx.

55 El parámetro -F F desconecta el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el emparejamiento de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y, para cada una de tales regiones, informa un "valor E" que es el número esperado de veces que podría esperarse observar tal coincidencia por casualidad en una base de datos de un tamaño de referencia fijado que contiene secuencias aleatorias. El tamaño de esta base de datos está establecido por defecto en el programa bl2seq. Para valores E pequeños, mucho menores de uno, el valor E es aproximadamente la probabilidad de tal coincidencia aleatoria.

65 Las secuencias polinucleotídicas variantes exhiben preferentemente un valor E de 1×10^{-10} , más preferentemente menos de 1×10^{-20} , menos de 1×10^{-30} , menos de 1×10^{-40} , menos de 1×10^{-50} , menos de 1×10^{-60} , menos de 1×10^{-70} , menos de 1×10^{-80} , menos de 1×10^{-90} , menos de 1×10^{-100} , menos de 1×10^{-110} , menos de 1×10^{-120} o menos de 1×10^{-123} cuando se comparan con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

Alternativamente, los polinucleótidos variantes de la presente invención se hibridan con una secuencia polinucleotídica especificada, o complementos de la misma en condiciones restrictivas.

- 5 La expresión "hibridar en condiciones restrictivas", y los equivalentes gramaticales de la misma, se refiere a la capacidad de una molécula de polinucleótido para hibridar con una molécula de polinucleótido diana (tal como una molécula de polinucleótido diana inmovilizada en una transferencia de ADN o ARN, tal como transferencia de Southern o transferencia de Northern) en condiciones definidas de temperatura y concentración salina. La capacidad de hibridar en condiciones de hibridación restrictivas puede determinarse hibridando inicialmente en condiciones menos restrictivas y a continuación aumentando la restricción hasta la restricción deseada.

10 Con respecto a las moléculas de polinucleótido mayores de aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones de hibridación restrictivas habituales son no más de 25 a 30 °C (por ejemplo, 10 °C) por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del dúplex nativo (véanse, en términos generales, Sambrook *et al.*, Eds, 1987, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press; Ausubel *et al.*, 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing). T_m para moléculas de polinucleótido mayores de aproximadamente 100 bases puede calcularse mediante la fórmula $T_m = 81,5 + 0,41 \% (G + C - \log(Na^+))$ (Sambrook *et al.*, Eds, 1987, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton y McCarthy, 1962, PNAS 84:1390). Las condiciones restrictivas habituales para polinucleótidos de más de 100 bases de longitud serían condiciones de hibridación tales como prelavado en una solución de SSC 6x, SDS al 0,2 %; hibridar a 65 °C, SSC 6x, SDS al 0,2 % durante una noche; seguido de dos lavados de 30 minutos cada uno en SSC 1x, SDS al 0,1 % a 65 °C y dos lavados de 30 minutos cada uno en SSC 0,2x, SDS al 0,1 % a 65 °C.

25 Con respecto a las moléculas de polinucleótido que tienen una longitud de menos de 100 bases, condiciones de hibridación restrictivas a modo de ejemplo son de 5 a 10 °C por debajo de T_m . En promedio, la T_m de una molécula de polinucleótido de longitud de menos de 100 pb se reduce en aproximadamente (500/longitud de oligonucleótido) °C.

30 Con respecto a los miméticos de ADN conocidos como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Nielsen *et al.*, Science. 6 de diciembre de 1991;254(5037): 1497-500), los valores de T_m son mayores que los de los híbridos ADN-ADN o ADN-ARN, y pueden calcularse usando la fórmula descrita en Giesen *et al.*, Nucleic Acids Res. 1 de noviembre de 1998; 26(21):5004-6. Condiciones de hibridación restrictivas a modo de ejemplo para un híbrido ADN-PNA que tiene una longitud de menos de 100 bases son de 5 a 10 °C por debajo de T_m .

35 Los polinucleótidos variantes de la presente invención también incluyen polinucleótidos que difieren de las secuencias de la invención pero que, como consecuencia de la degeneración del código genético, codifican un polipéptido que tiene una actividad similar a un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Una alteración de secuencia que no cambia la secuencia de aminoácidos del polipéptido es una "variación silente". Excepto para ATG (metionina) y TGG (triptófano), en algunos ejemplos, otros codones para el mismo aminoácido se cambian mediante técnicas reconocidas en la técnica, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones en un organismo hospedador particular.

45 También se incluyen en la invención alteraciones de la secuencia polinucleotídica que dan como resultado sustituciones conservativas de uno o varios aminoácidos en la secuencia polipeptídica codificada sin alterar significativamente su actividad biológica. El experto en la materia será consciente de los métodos para preparar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silentes (véase, por ejemplo, Bowie *et al.*, 1990, Science 247, 1306).

50 Los polinucleótidos variantes debidos a variaciones silentes y sustituciones conservativas en la secuencia polipeptídica codificada pueden determinarse usando el programa disponible públicamente bl2seq del conjunto de programas BLAST (versión 2.2.10 [Oct. 2004]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) mediante el algoritmo TBlastx como se ha descrito anteriormente.

Variantes de polipéptidos

55 El término "variante", por referencia a polipéptidos, incluye polipéptidos de origen natural y producidos de forma recombinante y sintética. Las secuencias polipeptídicas variantes exhiben preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 51 %, al menos un 52 %, al menos un 53 %, al menos un 54 %, al menos un 55 %, al menos un 56 %, al menos un 57 %, al menos un 58 %, al menos un 59 %, al menos un 60 %, al menos un 61 %, al menos un 62 %, al menos un 63 %, al menos un 64 %, al menos un 65 %, al menos un 66 %, al menos un 67 %, al menos un 68 %, al menos un 69 %, al menos un 70 %, al menos un 71 %, al menos un 72 %, al menos un 73 %, al menos un 74 %, al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad con respecto a las secuencias de la presente invención. La identidad se descubre en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de aminoácido, preferentemente

al menos 50 posiciones de aminoácido, al menos 100 posiciones de aminoácido, o en la longitud total de un polipéptido de la invención.

La identidad de secuencia polipeptídica puede determinarse de la siguiente forma. La secuencia polipeptídica objeto se compara con una secuencia polipeptídica candidata usando BLASTP (del conjunto de programas BLAST, versión 2.2.10 [Oct. 2004]) en bl2seq, que está disponible públicamente en NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utilizan los parámetros por defecto de bl2seq excepto que se debería desconectar el filtrado de regiones de baja complejidad.

La identidad de secuencia polipeptídica también puede calcularse en la longitud total de la superposición entre una secuencia polinucleotídica objeto y una candidata usando programas de alineación de secuencia global. EMBOSS-Needle (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10,227-235), discutidos anteriormente, también son programas de alineación de secuencia global adecuados para calcular la identidad de secuencia polipeptídica.

Las variantes de polipéptidos de la presente invención también incluyen las que exhiben una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que conserve la equivalencia funcional de esas secuencias y que razonablemente no cabría esperar que se produzca de forma aleatoria. Tal similitud de secuencia con respecto a los polipéptidos puede determinarse usando el programa disponible públicamente bl2seq del conjunto de programas BLAST (versión 2.2.10 [Oct. 2004]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). La similitud de secuencias polipeptídicas puede examinarse usando los siguientes parámetros de línea de comando Unix:
bl2seq -i peptideseq1 -j peptideseq2 -F F -p blastp.

Las secuencias polipeptídicas variantes exhiben preferentemente un valor E de 1×10^{-10} , más preferentemente menos de 1×10^{-20} , menos de 1×10^{-30} , menos de 1×10^{-40} , menos de 1×10^{-50} , menos de 1×10^{-60} , menos de 1×10^{-70} , menos de 1×10^{-80} , menos de 1×10^{-90} , menos de 1×10^{-100} , menos de 1×10^{-110} , menos de 1×10^{-120} o menos de 1×10^{-123} cuando se comparan con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

El parámetro -F F desconecta el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el emparejamiento de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y, para cada una de tales regiones, informa un "valor E" que es el número esperado de veces que podría esperarse observar tal coincidencia por casualidad en una base de datos de un tamaño de referencia fijado que contiene secuencias aleatorias. Para valores E pequeños, mucho menores de uno, este es aproximadamente la probabilidad de tal coincidencia aleatoria.

También están incluidas en la invención sustituciones conservativas de uno o varios aminoácidos de una secuencia polipeptídica descrita sin alterar significativamente su actividad biológica. El experto en la materia será consciente de los métodos para realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silentes (véase, por ejemplo, Bowie *et al.*, 1990, Science 247, 1306).

Una variante de polipéptido de la presente invención también incluye la que se produce a partir del ácido nucleico que codifica un polipéptido, pero difiere del polipéptido de tipo natural en que se procesa de modo diferente de modo que tiene una secuencia de aminoácidos alterada. Por ejemplo, se produce una variante mediante un patrón de corte y empalme alternativo del transcrito de ARN primario al que produce un polipéptido de tipo natural.

El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido, habitualmente ADN bicatenario, que se usa para transportar el constructo genético a una célula hospedadora. En ciertos ejemplos, el vector es capaz de replicación en al menos un sistema hospedador adicional, tal como *E. coli*.

2. Tuberculosis

Se ha de entender que las partículas de polímero, los métodos y las composiciones de la presente invención se refieren en parte a la identificación, prevención o tratamiento de tuberculosis.

La tuberculosis es una grave preocupación de salud mundial, que da como resultado más de 2 millones de muertes humanas a nivel mundial al año. La enfermedad, en sujetos humanos, está causada por la bacteria *M. tuberculosis*. La bacteria invade habitualmente los pulmones, a través de inhalación, causando infección en los pulmones, que puede extenderse finalmente a otras partes del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central, sistema linfático, sistema circulatorio, sistema genitourinario, sistema gastrointestinal, huesos, articulaciones y piel (Dietrich, 2006; Mustafa, 2001). Diversas formas de tuberculosis en animales agrícolas, tales como tuberculosis bovina (causada habitualmente por *M. bovis*) y enfermedad de Johne (causada habitualmente por *M. paratuberculosis*), también tienen un efecto significativo negativo en la producción. *Mycobacterium* es un género de *Actinobacteria*. El género incluye patógenos que se conoce que causan diversas enfermedades en mamíferos, incluyendo tuberculosis y lepra. Algunos ejemplos de especies de patógenos incluyen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*; *M. leprae* (lepra), *M. avium paratuberculosis* (asociada a enfermedad de Crohn en seres humanos y enfermedad de Johne en ovejas).

La extensión de la infección por *M. tuberculosis* o *M. bovis* está limitada por el sistema inmunitario. Numerosos

individuos muestran pocos síntomas distintos de tos y fiebre. Sin embargo, aproximadamente un 30 % de los individuos no pueden controlar suficientemente la infección y desarrollan una enfermedad primaria. A pesar de esto, la enfermedad es capaz de permanecer durmiente en los individuos, infectándoles nuevamente años o incluso décadas después. Por esta razón, *M. tuberculosis* o *M. bovis* son poco comunes entre las bacterias infecciosas, ya que pueden evadir la respuesta inmunitaria y sobrevivir en una fase refractaria sin replicación o con baja replicación durante largos períodos de tiempo.

La infección por tuberculosis se expresa en tres fases. El primer estadio agudo se identifica por una proliferación de bacterias en los órganos corporales. Rápidamente, va seguido de una respuesta inmunitaria, que controla la infección y finalmente da como resultado una disminución en la carga bacteriana. Después de la fase aguda, se establece la segunda fase latente. Durante este segundo estadio, la carga bacteriana se mantiene a un nivel estable y bajo. *M. tuberculosis* o *M. bovis* cambia de un estado de multiplicación activo en la fase aguda a un estado durmiente en la fase latente. Puede producirse una tercera fase de reactivación, mediante la cual las bacterias comienzan a replicarse nuevamente. Los factores que influyen en este tercer estadio aún se desconocen en gran medida (Barnes y Cave, 2003).

Se piensa que se producen cambios en la especificidad antigénica de la respuesta inmunitaria en los diferentes estadios de la infección, dado que la bacteria es capaz de modular la expresión génica durante la transición de replicación activa a estado durmiente.

2.1 Estrategias de tratamiento actuales

Las estrategias de tratamiento actuales para la protección frente a tuberculosis incluyen vacunas específicas frente a antígenos conocidos, o tratamiento antibiótico en pacientes infectados con patógenos bacterianos intracelulares.

La carencia de vacunas adecuadas para proteger frente a la reactivación de los patógenos intracelulares, de forma profiláctica antes de la infección, o terapéutica después del inicio de la infección, ha motivado la necesidad de estrategias de tratamiento nuevas y mejoradas frente a patógenos intracelulares.

Por ejemplo, la única vacuna disponible en la actualidad para la tuberculosis es Bacille Calmette-Gueurin (BCG), que contiene cepas atenuadas vivas de *Mycobacterium bovis*. La eficacia de BCG en el control de la infección por tuberculosis es limitada. Aunque la vacuna parece proteger a los niños frente a la enfermedad primaria, su eficacia de protección frente a la forma adulta de la enfermedad (reactivación después de latencia) es reducida (Organización Mundial de la Salud - <http://www.who.int>). También se ha informado que la eficacia de BCG es limitada en numerosos países del tercer mundo donde la tuberculosis es prevalente. Además, la vacuna BCG es una vacuna viva que no es adecuada para administración a pacientes que están inmunocomprometidos. Aunque, según se informa, la vacuna BCG reduce la diseminación de *M. tuberculosis* al bazo (y otros órganos), no previene el crecimiento bacteriano en los pulmones.

La carencia de una vacuna adecuada para proteger frente a la reactivación, de forma profiláctica antes de la infección, o terapéutica después del inicio de la infección, junto con otros problemas asociados a las vacunas vivas, ha motivado la necesidad de estrategias de diagnóstico y tratamiento nuevas y mejoradas frente a la tuberculosis.

3. Respuesta inmunitaria

3.1. Respuesta mediada por células

La inmunidad mediada por células está mediada principalmente por linfocitos T. Los antígenos patógenos se expresan en la superficie de células presentadoras de antígeno (tales como macrófagos, linfocitos B, y células dendríticas), unidos a moléculas mayores de histocompatibilidad MHC de Clase I o MHC de Clase II. La presentación de antígeno patógeno acoplado a MHC de Clase II activa la respuesta de linfocitos T cooperadores (CD4+). Tras la unión del linfocito T al complejo antígeno-MHC II, los linfocitos T CD4+ proliferan, liberando citoquinas, incluyendo interferón gamma (IFN- γ) e interleuquina 2 (IL-2), IL-4, IL-7, e IL-12.

La presentación de antígenos patógenos unidos a moléculas de MHC de Clase I activa la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CD8+). Tras la unión del linfocito T al complejo antígeno-MHC I, los linfocitos CD8+ segregan perforina, que da como resultado la lisis, hinchamiento y muerte de la célula de patógeno. Alternativamente, los linfocitos CD8+ inducen muerte celular programada o apoptosis. La activación de linfocitos T CD8+ está amplificada por la liberación de citoquinas específicas mediante los linfocitos T CD4+.

Se cree que una respuesta inmunitaria mediada por células es fundamental para la inmunidad frente a diversos patógenos, incluyendo patógenos intracelulares tales como *M. tuberculosis*.

Los métodos para evaluar y monitorizar el inicio o progreso de una respuesta mediada por células en un sujeto se conocen bien en la técnica. Métodos convenientes a modo de ejemplo incluyen los que evalúan la presencia o el nivel de una o más citoquinas asociadas a una respuesta mediada por células, tales como las identificadas en el presente

documento incluyendo, por ejemplo, interferón gamma. Del mismo modo, son susceptibles de usarse en la presente invención métodos basados en células para evaluar o monitorizar el inicio o progreso de una respuesta mediada por células, y pueden incluir ensayos de proliferación o activación celular, incluyendo ensayos dirigidos a la identificación de activación o expansión de una o más poblaciones de células inmunitarias, tales como linfocitos T.

5 En ciertas realizaciones, son preferentes los métodos de la invención que provocan tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta humoral.

10 En otras realizaciones, son preferentes los métodos de la invención que provocan principalmente una respuesta mediada por células. Tales métodos pueden incluir los que provocan una respuesta inmunitaria mediada por células sin una respuesta humoral significativa, o sin ninguna respuesta humoral detectable. En un ejemplo, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por células, tal como la indicada por una respuesta de IFN- γ , en ausencia de una respuesta de IgA significativa, o en ausencia de una respuesta de IgE significativa, o en ausencia de una respuesta de IgG significativa, incluyendo la ausencia de una respuesta de IgG1 significativa, o la ausencia de una respuesta de IgG2 significativa, o en ausencia de una respuesta de IgM significativa.

3.2. Respuesta humoral

20 La respuesta inmunitaria humoral está mediada por anticuerpos segregados producidos por linfocitos B. Los anticuerpos segregados se unen a antígenos presentados en la superficie de patógenos invasores, marcándolos para la destrucción.

25 Se ha sugerido que una respuesta mediada por células y humoral combinada (tal como la producida como consecuencia de una respuesta mediada por células iniciada) sería beneficiosa para conseguir una respuesta inmunitaria mucho más sensible o mejorar el nivel de protección frente a patógenos intracelulares.

Nuevamente, los métodos para evaluar y monitorizar el inicio o progreso de una respuesta humoral se conocen bien en la técnica. Estos incluyen ensayos de unión a anticuerpos, ELISA, ensayos de punción cutánea, y similares.

30 4. Antígenos de tuberculosis

Se ha de entender que se ha caracterizado una gran mayoría de antígenos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Antígenos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* a modo de ejemplo son la diana antigénica segregada tempranamente (ESAT)-6, Ag85A, Ag85B (MPT59), Ag85B, Ag85C, MPT32, MPT51, MPT59, MPT63, MPT64, MPT83, MPB5, MPB59, MPB64, MTC28, 35 MTB2, MTB8.4, MTB9.9, MTB32A, MTB39, MTB41, TB10.4, TB10C, TB11B, TB12.5, TB13A, TB14, TB15, TB15A, TB16, TB16A, TB17, TB18, TB21, TB20.6, TB24, TB27B, TB32, TB32A, TB33, TB38, TB40.8, TB51, TB54, TB64, CFP6, CFP7, CFP7A, CFP7B, CFP8A, CFP8B, CFP9, CFP10, CFP11, CFP16, CFP17, CFP19, CFP19A, CFP19B, CFP20, CFP21, CFP22, CFP22A, CFP23, CFP23A, CFP23B, CFP25, CFP25A, CFP27, CFP28, CFP28B, CFP29, CFP30A, CFP30B, CFP50, CWP32, hspX (alfa-cristalina), APA, derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD), 40 ST-CF, PPE68, LppX, PstS-1, PstS-2, PstS-3, HBHA, GroEL, GroEL2, GrpES, LHP, lipoproteína de 19 kDa, 71 kDa, RD1-ORF2, RD1-ORF3, RD1-ORF4, RD1-ORF5, RD1-ORF8, RD1-ORF9A, RD1-ORF9B, Rv1984c, Rv0577, Rv1827, BfrB, Tpx, Rv1352, Rv1810, PpiA, Cut2, FbpB, FbpA, FbpC, DnaK, FecB, Ssb, Rp1L, FixA, FixB, AhpC2, Rv2626c, Rv1211, Mdh, Rv1626, Adk, C1pP, SucD (Belisle *et al.*, 2005; documentos de Patente US 7.037.510; US 2004/0057963; US 2008/0199493; US 2008/0267990), o al menos una parte antigénica o epítipo de linfocito T de 45 cualquiera de los antígenos mencionados anteriormente.

Sin embargo, los presentes solicitantes han determinado que una combinación de los antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c es particularmente eficaz en la presente invención.

50 La secuencia de aminoácidos del antígeno ESAT6 es la siguiente:

MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQQK
WDATATELNALQNLARTISEAGQAMASTEAGNVVTGMFA [SEQ ID NO: 1].

La secuencia de aminoácidos del antígeno CFP10 es la siguiente:

55 MAEMKTDAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQAAVVR
FQEAANKQKQELDEISTNIRQAGVQYSRADEEQQALSSQMFG [SEQ ID NO: 2].

La secuencia de aminoácidos del antígeno Rv3615c es la siguiente:

MTENLTVQPERLGV LASHHDNA AV DASSGVEAAAGLGESVAITHGPYCSQFNDTLNVY
LTAHNALGSSLHTAGVDLAKSLRIA AKIYSEADEAWRKAIDGLFT [SEQ ID NO: 3].

La secuencia de aminoácidos del antígeno Rv3020c es la siguiente:

GGGGGMSLLDAHIPQLIASHTAFAAKAGLMRHTIGQAEQQAMSAQAFHQGESAAAFQG
AHARFVAAAAKVNTLLDIAQANLGEAAGTYVAADAAAASSYTGF [SEQ ID NO: 4].

La secuencia de aminoácidos del antígeno Rv2346c es la siguiente:

MTINYQFGDVDAHGAMIRAQAGLLEAEHQAIVRDVLAAGDFWGGAGSVACQEFITQL
GRNFQVIYEQANA HGQKVQAAGNNMAQTDSAVGSSWA [SEQ ID NO: 5].

En diversos ejemplos, los dos o más antígenos, por ejemplo tres, cuatro, o los cinco antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en ESAT6, CFP10, Rv3615c, Rv3020c, y Rv2346c, o dos o más dominios de unión capaces de unirse a los antígenos especificados, o cualquier combinación de los mismos, se producen como una proteína de fusión, comprendiendo además en ciertas realizaciones un polipéptido formador de partícula. En ciertas realizaciones, pueden utilizarse además otros antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, incluyendo otros antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* seleccionados entre los antígenos mencionados anteriormente.

Por ejemplo, en una realización, los dos o más antígenos comprenden una fusión ESAT6-Rv3020c, por ejemplo para una fusión en el marco en el extremo C-terminal de la polímero sintasa, tal como phaC, que comprende la secuencia de aminoácidos:

EMTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKK
WDATATELNNALQNLARTISEAGQAMASTE GNVTGMFAGGGGGMSLLDAHIPQLIASH
TFAAKAGLMRHTIGQAEQQAMSAQAFHQGESAAAFQGAHARFVAAAAKVNTLLDIA
QANLGEAAGTYVAADAAAASSYTGF [SEQ ID NO: 6].

En otro ejemplo, los dos o más antígenos comprenden CFP10, Rv3615c, y ESAT6, por ejemplo como un polipéptido de fusión que comprende además una polímero sintasa, tal como PhaC. Por ejemplo, el polipéptido de fusión comprende CFP10 y Rv3615c fusionados al extremo N-terminal de PhaC, con ESAT6 fusionado al extremo C-terminal, tal como un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en el presente documento como SEQ ID NO: 10.

En otras realizaciones, los polipéptidos de fusión de la invención comprenden las fusiones de antígeno que se describen en el presente documento en los Ejemplos incluyendo, por ejemplo, los polipéptidos de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 7 a 10, incluyendo las codificadas por las secuencias de nucleótidos de una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 11 a 15.

Se ha de entender que los polipéptidos de fusión que comprenden dos o más antígenos para uso en la presente invención pueden codificarse por secuencias de ácido nucleico adecuadas para expresión, incluyendo las optimizadas para expresión en diferentes células hospedadoras. Por ejemplo, el polipéptido de fusión ESAT6-Rv3020c representado en el presente documento como SEQ ID NO: 6 puede codificarse por una secuencia nucleotídica optimizada para expresión en *E. coli*, usando optimización de codones, tal como la secuencia nucleotídica:

ctcgagatgacggaacaacaatggaactttgctggcatcgaagccgccgcatctgctattcaaggcaatgtgacctctatccactcgtctggtgatgaaaggcaaacagagcttgacaaactggcagcagcatggggcggtagcggctcgaagcclatcaagggtgfcagcaaaaatgggacgctaccgcgacggaactgaacaatgccctgcagaacctggcacgtacgatttctgaagcaggtcaagctatggcaagcacggaaggcaatgtcacgggcatgttcgagggcgggcgggcgcatgagcctgctggatgcgcatattccgcagctgattcgagccataaccgcgtttgcgggcgaagcgggcctgatgcgtcataccattggccagggcgaacagcagggcgtgagcgcgcagggcgtttcatcagggcgaaagcgggcgggcgttcagggcgcgcatgcgcgtttgtggcgggcgggcgaaagtgaacaccctgctggatattggcgagggcgaacctgggcgaagcgggcgacacatgtggcgggcggtgaggcgggcgagcagctataccggcttttaaggatcc [SEQ ID NO: 11].

- 5 En otra realización de secuencias codificantes de ácido nucleico optimizadas para expresión en un hospedador particular, el polipéptido de fusión CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6 que comprende la secuencia de aminoácidos representada como se SEQ ID NO: 10 se codifica por una secuencia nucleotídica optimizada para expresión en *E. coli*, usando optimización de codones, tal como la secuencia nucleotídica:

atggcagaaatgaaaacggatgcggcgaccctggcacaagaagcgggcaactttgaacgtattagcggcgacctgaaaacccaaatcgatcaggttgaaagcaccgcgggttctctgcaaggccagtggtggtgcggcggtacggcagctcaagcggcggtggttcgtttcaggaagcagctaaacaacaaacaggaactggatgaaatttaaccaatattccgtcaagccggcggtgagctatcgcgcgacagcaagaacagcaacaggctctgagctctcaaatgggtttcggggcgggcggtggcggtggccgatgaccgaaaacctgacggttcagccggaacgtctgggtgtcctggcgaatcatcacgataatgcagcagtcgacgccagttccggtgtggaagcagctgcaggtctgggtgaaagtgtggcgattacctatggtcgtattgtctccagtttaacgataccctgaatgtttacctgacggccataacgcactgggttcacgtgcacacggctggtgtcgacctggcaaaatctctgcgcacgccgcaaaaatctattcagaagcagacgaagcgtggcgtaaaagcaatcagggcctgttcaccaatgtgcgaccggcaaaaggcgcgagcttccacgcaggaaggcaagtcccaaccattcaaggtcagccggggccattcgatccagccacatggctggaatgggtcccgccagtggcagggcactgaaggcaacggccacgcggccgctccggcattccgggcttgatgcgctggcagggcgtcaagatgcgccggcgagctgggtgatattccagcagcgctacatgaaggacttctcagcgctgtggcagggccatggccgagggcaaggccgagggccaccggtccgctgcacgaccggcgcttcgccggcgacgcatggcgaccaacctcccatatcgcttcgctgccgcttctacctgctcaatgcgcgcgcttgaccgagctggccgatgccgtcagggccgatgccaagaccggccagcgcatccgcttcgcgatctcgcaatgggtcgatgcgatgtcgccgccaacttctgccaccaatcccaggcgacgcgctgctgacgagtcggcgggcggaatcgctcgctgccggcggtgcgcaacatgatggaagacctgacacgcggcaagatctcgacagccgagagcgcggtttgaggtcgccgcaatgtcgcggtgaccgaaggcgccgtggtcttcgagaacgagtaactccagctgttcagtaagaagccgctgaccgacaaggtgcacgcgcggcgctgctgatgtggtcgccgtgcatacaagtaclacatcttgacctgcagccggagagctcgctggtgcgccatgtggtgagcagggacatacgggtttctggtgtcgtggcgaatccggagcggcagcatggccggcagcacctgggacgactacatcgagcacgcgccatccgcgccatcgaagtgcgcgcgacatcagcgccaggacaagatcaacgtgctcggttctgctggtggcgccaccattgtctgaccgcgctggcggtgtggcgcgcgggcgagcaccggccgccagcgctcacgctgctgaccacgctgctggactttgccgacacgggcatcctcgacgtctttgtcgacgagggccatgtgcagttgcgcgaggccacgctggggcgggcgccggcgccgctgcgcgctgctgcgcggccttgagctggccaatacttctgttcttcgccccgaacgacctggtgtggaactacgtggtcgacaactacctgaaggcgcaacacggcggtgcggtcgtgttctggaacggcgacgccaccaacctgccggggcggtgtgactgctggtacctgcgccacacctaactgcagaacgagctcaaggtaccgggcaagctgaccgtgtgcggcggtgccgtggacctggccagcatcgacgtgccgacctatatctacggctcgcgcgaagaccatactgtgccgtggaccgcggcctatgcttcgaccgcgctgctggcgaaacagctgcgcttcgtggtggtgcgtcgggacatacgcgggtgtgatcaaccgccggccaagaacagcgagccactggactaacgatgcgctgccggagtcgccgagcaatggctggccggcgccatcgagcatcacggcagctggtggccgactggaccgatggctggccggcgagccggcgcgaaacgcgcgcggccccaactatggcaatgcgcgtatcgcgcaatcgaaccgcgctggcgatacgtcaagccaaggcacatatggtgctggcggtggcgattgataaacgcggagggcggtggagggcctcgagatgacggaacaacaatggaactttgctggcatcgaagccggcgcatctgctattcaaggcaatgtgacctctatccactcgtgctggtgatgaaggcaaacagagcttgacaaactggcagcagcatggggcggtagcggtctgaagcclatcaagggtgtgcagcaaaaatgggacgctaccgcgacggaactgaacaatgccctgcagaacctggcacgtacgatttctgaagcaggtcaagctatggcaagcacggaaggcaatgtcacgggcatgttcgataa [SEQ ID NO: 15].

- 10 En otras realizaciones, los polipéptidos de fusión de la invención incluyen los codificados por las secuencias nucleotídicas de una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 11 a 15.

5. Constructos de expresión

- 15 Los procesos para producir y usar constructos de expresión para la expresión de polipéptidos de fusión en microorganismos, células vegetales o células animales (sistemas celulares de expresión) o en sistemas de expresión

sin células, y las células hospedadoras que comprenden constructos de expresión útiles para formar partículas de polímero para uso en la invención, se conocen bien en la técnica (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1987; Ausubel *et al.*, 1987).

5 Los constructos de expresión para uso en métodos de la invención, en una realización, están insertados en un vector replicable para clonación o para expresión o, en otra realización, están incorporados al genoma del hospedador. Diversos vectores están disponibles públicamente. El vector está, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, se inserta ADN en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes de vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores seleccionables, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción. La construcción de vectores adecuados que contengan uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación convencionales en la técnica.

15 Los vectores de expresión y clonación contienen ambos una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Tales secuencias se conocen bien para una diversidad de bacterias, levaduras y virus.

20 En una realización, el constructo de expresión está presente en un vector de alto número de copias.

En una realización, el vector de alto número de copias se selecciona entre los que están presentes de 20 a 3000 copias por célula hospedadora.

25 En una realización, el vector de alto número de copias contiene un origen de replicación (ori) de alto número de copias, tal como un origen de replicación ColE1 o procedente de ColE1. Por ejemplo, el origen de replicación procedente de ColE-1 puede comprender el origen de replicación pUC19.

Los expertos en la materia conocen numerosos orígenes de replicación de alto número de copias adecuados para uso en los vectores de la presente invención. Estos incluyen el origen de replicación procedente de ColE1 de pBR322 y sus derivados así como otros orígenes de replicación de alto número de copias, tales como M13 FR ori o p15A ori. El origen de plásmido 2μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero.

35 Preferentemente, el origen de replicación de alto número de copias comprende el origen de replicación pUC19 procedente de ColE1.

40 El sitio de restricción se sitúa en el origen de replicación de modo que la clonación de un inserto en el sitio de restricción inactive el origen, haciéndolo incapaz de dirigir la replicación del vector. Alternativamente, el al menos un sitio de restricción se sitúa en el origen de modo que la clonación de un inserto en el sitio de restricción lo haga capaz de soportar solo la replicación de un bajo número de copias o una única copia del vector.

45 Los vectores de expresión y clonación contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado marcador seleccionable, para detectar la presencia del vector en la célula hospedadora transformada. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para bacilos.

50 Los marcadores seleccionables usados habitualmente en transformación vegetal incluyen el gen de neomicina fosfotransferasa II (NPTII) que confiere resistencia a kanamicina, el gen *aadA*, que confiere resistencia a espectinomycin y estreptomycin, la fosfinotricina acetil transferasa (gen *bar*) para resistencia a Ignite (AgrEvo) y Basta (Hoechst), y el gen de higromicina fosfotransferasa (*hpt*) para resistencia a higromicina.

Algunos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para realizar constructos de expresión, tales como DHFR o timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo natural es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe en Urlaub *et al.*, 1980. Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, 1979; Kingsman *et al.*, 1979; Tschemper *et al.*, 1980). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, n.º ATCC 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

65 Un constructo de expresión útil para formar partículas de polímero incluye preferentemente un promotor que controla la expresión de al menos un ácido nucleico que codifica una polímero sintasa, proteína formadora de partícula o polipéptido de fusión.

Se conocen promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. Los promotores

adecuados para uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, 1978; Goeddel *et al.*, 1979], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer *et al.*, 1983]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ácido nucleico que codifica una polímero sintasa, proteína formadora de partícula o polipéptido de fusión.

Algunos ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, 1980] u otras enzimas glicolíticas [Hess *et al.*, 1968; Holland, 1978], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Algunos ejemplos de promotores adecuados para uso en células hospedadores vegetales, incluyendo tejidos u órganos de una planta monocotiledónea o dicotiledónea, incluyen promotores específicos de célula, tejido y órgano, promotores específicos de ciclo celular, promotores temporales, promotores inducibles, promotores constitutivos que son activos en la mayoría de los tejidos vegetales, y promotores recombinantes. La elección del promotor dependerá de la expresión temporal y espacial deseada del polinucleótido clonado. Los promotores son los procedentes de la célula hospedadora, o promotores que provienen de genes de otras plantas, virus, y bacterias y hongos patógenos de plantas. Los expertos en la materia podrán seleccionar, sin experimentación excesiva, promotores que sean adecuados para uso en modificar y modular constructos de expresión usando constructos genéticos que comprenden las secuencias polinucleotídicas de la invención. Algunos ejemplos de promotores vegetales constitutivos incluyen el promotor CaMV 35S, el promotor de nopalina sintasa y el promotor de octopina sintasa, y el promotor Ubi 1 del maíz. En la bibliografía científica se describen promotores vegetales que son activos en tejidos específicos, responden a señales de desarrollo internas o estreses abióticos o bióticos externos. Se describen promotores a modo de ejemplo, por ejemplo, en el documento de Patente WO 02/00894, que se incorpora al presente documento por referencia.

Algunos ejemplos de promotores adecuados para uso en células hospedadoras de mamífero comprenden los obtenidos a partir de genomas de virus tales como polioma virus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, sarcomavirus aviar, citomegalovirus, aretrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

En algunos ejemplos, la transcripción de un constructo de expresión mediante eucariotas superiores aumenta por inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN de acción *cis*, habitualmente de 10 a 300 pb que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Se conocen numerosas secuencias de potenciador de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, por lo general, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Algunos ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Por lo general, el potenciador se corta y empalma en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de la polímero sintasa, proteína formadora de partícula o polipéptido de fusión, pero se sitúa preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levadura, hongo, insecto, planta, animal, humana o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Tales secuencias están disponibles habitualmente en regiones no traducidas en 5', y en ocasiones en 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica la polímero sintasa, proteína formadora de partícula o polipéptido de fusión.

En una realización, el constructo de expresión comprende un promotor inducible corriente arriba, tal como un promotor BAD, que está inducido por arabinosa.

En una realización, el constructo de expresión comprende un sistema promotor constitutivo o regulable.

En una realización, el sistema promotor regulable es un sistema promotor inducible o represivo.

Aunque es deseable usar promotores fuertes en la producción de proteínas recombinantes, la regulación de estos promotores es esencial dado que la sobreproducción constitutiva de proteínas heterólogas conduce a disminuciones

en la velocidad de crecimiento, estabilidad del plásmido y viabilidad del cultivo.

Una diversidad de promotores están regulados por la interacción de una proteína represora con el operador (una región corriente abajo del promotor). Los operadores mejor conocidos son los del operón lac y del bacteriófago λ . Se proporciona una revisión de promotores regulados en *E. coli* en la Tabla 1 de Friehs & Reardon, 1991.

Una diferencia principal entre los cultivos bacterianos convencionales y los que implican *E. coli* recombinante es la separación de las fases de crecimiento y producción o inducción. La producción de proteína recombinante a menudo se aprovecha de promotores regulados para conseguir altas densidades celulares en la fase de crecimiento cuando el promotor "no está activo" y la carga metabólica de la célula hospedadora es ligera) y a continuación altas velocidades de producción de proteína heteróloga en la fase de inducción (después de la inducción para volver el promotor "activo").

En una realización, el sistema promotor regulable se selecciona entre Lad, Trp, fago λ y ARN polimerasa de fago.

En una realización, el sistema promotor se selecciona entre el promotor lac o Ptac y el represor lad, o el promotor trp y el represor TrpR.

En una realización, el represor Lad se inactiva por adición de isopropil- β -D-tiogalato piranosido (IPTG) que se une al represor activo y causa la disociación del operador, permitiendo la expresión.

En una realización, el sistema promotor trp usa un medio sintético con una concentración de triptófano definida de modo que, cuando la concentración cae por debajo de un umbral, el sistema se vuelve autoinducible. En una realización, se añade ácido 3- β -indol-acrílico para inactivar el represor TrpR.

En una realización, el sistema promotor puede hacer uso del represor de bacteriófago λ y cl. Este represor hace uso del profago λ y previene la expresión de todos los genes líticos por interacción con dos operadores denominados OL y OR. Estos operadores se superponen con dos promotores fuertes, PL y PR, respectivamente. En presencia del represor cl, se previene la unión de ARN polimerasa. El represor cl puede inactivarse por irradiación UV o tratamiento de las células con mitomicina C. Una forma más conveniente de permitir la expresión del polipéptido recombinante es la aplicación de una versión sensible a la temperatura del represor cl, cl857. Las células hospedadoras que portan un sistema de expresión basado en λ pueden crecer en la fase media-exponencial a baja temperatura y a continuación transferirse a alta temperatura para inducir la expresión del polipéptido recombinante.

Un sistema de expresión ampliamente usado hace uso de la ARN polimerasa de fago T7 que reconoce solo promotores encontrados en el ADN de T7, y no los promotores presentes en los cromosomas de la célula hospedadora. Por tanto, el constructo de expresión puede contener uno de los promotores de T7 (normalmente el promotor presente delante del gen 10) al que se fusionará el gen recombinante. El gen que codifica la ARN polimerasa de T7 está presente en el constructo de expresión, en un segundo constructo de expresión compatible o integrado en el cromosoma de la célula hospedadora. En los tres casos, el gen está fusionado a un promotor inducible que permite su transcripción y traducción durante la fase de expresión.

Las cepas de *E. coli* pLysS BL21 (DE3) y BL21 (DE3) (Invitrogen, CA) son ejemplos de células hospedadoras que portan el gen de ARN polimerasa de T7 (existen algunas cepas más de *E. coli* muy adecuadas y comercialmente disponibles que albergan el gen de ARN polimerasa de T7 tales como, por ejemplo, KRX y XJ (autolisado)). Se conocen en la técnica otras cepas de células que portan el gen de ARN polimerasa de T7, tales como *Pseudomonas aeruginosa* ADD1976 que alberga el gen de ARN polimerasa de T7 integrado en el genoma (Brunschwig y Darzins, 1992) y *Cupriavidus necator* (anteriormente *Ralstonia eutropha*) que alberga el gen de ARN polimerasa de T7 integrado en el genoma bajo el control del promotor phaP (Barnard *et al.*, 2004).

La ARN polimerasa de T7 ofrece tres ventajas con respecto a las enzimas de la célula hospedadora: en primer lugar, consiste solo en una subunidad, en segundo lugar ejerce una capacidad de procesamiento mayor, y en tercer lugar es insensible a la rifampicina. La última característica puede usarse especialmente para potenciar la cantidad de polipéptido de fusión por adición de este antibiótico aproximadamente 10 min después de la inducción del gen que codifica la ARN polimerasa de T7. Durante ese tiempo, se habrá sintetizado suficiente polimerasa para permitir una expresión a alto nivel del polipéptido de fusión, y la inhibición de las enzimas de la célula hospedadora previene la expresión adicional de todos los demás genes presentes tanto en el plásmido como en el cromosoma. Se conocen en la técnica otros antibióticos que inhiben la ARN polimerasa bacteriana, pero no la ARN polimerasa de T7, tales como estreptolidigina y estreptovaricina.

Dado que todos los sistemas promotores son permeables, la expresión a bajo nivel del gen que codifica la ARN polimerasa de T7 puede ser perjudicial para la célula en los casos en donde el polipéptido recombinante codifique una proteína tóxica. Estas moléculas de polimerasa presentes durante la fase de crecimiento pueden inhibirse por expresión del gen codificado de T7 para lisozima. Esta enzima es una proteína difuncional que corta un enlace en la pared celular de la célula hospedadora e inhibe selectivamente la ARN polimerasa de T7 uniéndose a la misma, un mecanismo de retroalimentación que asegura un estallido controlado de la transcripción durante infección de T7. La

cepa de *E. coli* pLysS BL21 (DE3) es un ejemplo de una célula hospedadora que porta el plásmido pLysS que expresa constitutivamente lisozima de T7.

En una realización, el sistema promotor hace uso de promotores tales como API o APR, que se inducen o "activan" para iniciar el ciclo de inducción mediante un desplazamiento de temperatura, tal como elevando la temperatura de aproximadamente 30-37 °C a 42 °C para iniciar el ciclo de inducción.

Un promotor fuerte puede potenciar la densidad de polipéptidos de fusión en la superficie de la partícula durante la producción *in vivo*.

Algunos polipéptidos de fusión a modo de ejemplo comprenden: una polímero sintasa, y dos cualesquiera o más de los siguientes

- (i) un antígeno ESAT6,
- (ii) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6,
- (iii) un antígeno CFP10,
- (iv) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10,
- (v) un antígeno Rv3615c,
- (vi) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c
- (vii) un antígeno Rv3020c,
- (viii) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c.

Otros polipéptidos de fusión a modo de ejemplo comprenden: una polímero sintasa, y dos cualesquiera o más de los siguientes

- (ix) un antígeno ESAT6,
- (x) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6,
- (xi) un antígeno CFP10,
- (xii) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10,
- (xiii) un antígeno Rv3615c,
- (xiv) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c
- (xv) un antígeno Rv3020c,
- (xvi) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, y
- (xvii) un antígeno Rv2346c
- (xviii) un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c.

Una vez expresado, el polipéptido de fusión es capaz de formar o facilitar la formación de una partícula de polímero.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos la polímero sintasa está fusionada indirectamente con las otras secuencias de ácido nucleico a través de una secuencia conectora o espaciadora polinucleotídica de una longitud deseada.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión que comprende el antígeno o antígenos o dominio o dominios de unión es contigua al extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende una polímero sintasa.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión que comprende el antígeno o antígenos o dominio o dominios de unión está fusionada indirectamente al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento de polímero sintasa a través de un conector o espaciador peptídico de una longitud deseada que facilita el plegamiento independiente de los polipéptidos de fusión.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión que comprende el antígeno o antígenos o dominio o dominios de unión es contigua al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa, o un fragmento de sintasa C-terminal.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión que comprende el antígeno o antígenos o dominio o dominios de unión está fusionada indirectamente al extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende una proteína formadora de película, preferentemente una polímero sintasa, o un fragmento de polímero sintasa N-terminal a través de un conector o espaciador peptídico de una longitud deseada para facilitar el plegamiento independiente de los polipéptidos de fusión.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión que comprende el antígeno o antígenos o dominio o dominios de unión es contigua al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos que codifica una despolimerasa, o un fragmento de despolimerasa C-terminal.

Una ventaja de los polipéptidos de fusión de acuerdo con la presente invención es que la modificación de las proteínas

que se unen a la superficie de las partículas de polímero no afecta a la funcionalidad de las proteínas implicadas en la formación de las partículas de polímero. Por ejemplo, la funcionalidad de la polímero sintasa se retiene si un polipéptido recombinante está fusionado al extremo N-terminal de la misma, dando como resultado la protección de un polipéptido recombinante en la superficie de la partícula. Aunque la funcionalidad de una proteína se vería perjudicada por la fusión, esta desventaja se compensa con la presencia de una proteína formadora de partícula adicional que realiza la misma función y está presente en estado activo.

De esta forma, es posible asegurar un enlace estable del polipéptido recombinante unido a las partículas de polímero mediante las proteínas formadoras de partícula.

Se ha de entender que la disposición de las proteínas en el polipéptido de fusión depende del orden de las secuencias génicas en el ácido nucleico contenido en el plásmido.

Por ejemplo, puede desearse producir un polipéptido de fusión en donde el antígeno de *M. tuberculosis* esté fusionado indirectamente a la polímero sintasa. La expresión "fusionado indirectamente" se refiere a un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa, y al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o un dominio de unión capaz de unirse a al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* que están separados por una proteína adicional que puede ser cualquier proteína que se desee expresar en el polipéptido de fusión.

Cuando se usa en el contexto de partículas para uso en el diagnóstico o tratamiento de tuberculosis, puede desearse producir un polipéptido de fusión en donde el antígeno o antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o al menos un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* estén fusionados indirectamente a la polímero sintasa.

En una realización, la proteína adicional se selecciona entre una proteína formadora de partícula o un polipéptido de fusión, o un conector o espaciador para facilitar el plegado independiente de los polipéptidos de fusión, como se ha discutido anteriormente. En esta realización, sería necesario ordenar la secuencia de genes en el plásmido para reflejar la disposición deseada del polipéptido de fusión.

En otras realizaciones, el antígeno o antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o el dominio o dominios de unión capaces de unirse a al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* están fusionados directamente a la polímero sintasa. La expresión "fusionado directamente" se usa en el presente documento para indicar que dos o más polipéptidos están unidos mediante enlaces peptídicos.

También es posible formar una partícula en donde la partícula comprende al menos dos polipéptidos de fusión distintos que están unidos a la partícula de polímero. Por ejemplo, un primer polipéptido de fusión que comprende un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o un dominio de unión capaz de unirse a al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* fusionado a una polímero sintasa podría estar unido a la partícula de polímero. Cuando se usa en el contexto de partículas para uso en el tratamiento de tuberculosis, la partícula a modo de ejemplo comprende un primer polipéptido de fusión que comprende un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, por ejemplo, o al menos un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* fusionado a una polímero sintasa unida a la partícula de polímero.

En una realización, el constructo de expresión se expresa *in vivo*. Preferentemente, el constructo de expresión es un plásmido que se expresa en un microorganismo, preferentemente *Escherichia coli*.

En una realización, el constructo de expresión se expresa *in vitro*. Preferentemente, el constructo de expresión se expresa *in vitro* usando un sistema de expresión sin células.

En una realización, uno o más genes pueden estar insertados en un único constructo de expresión, o uno o más genes pueden estar integrados en el genoma de la célula hospedadora. En todos los casos, la expresión puede controlarse a través de promotores, como se ha descrito anteriormente.

En una realización, el constructo de expresión codifica además al menos un polipéptido de fusión adicional que comprende un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o al menos un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* y una proteína formadora de partícula, como se ha discutido anteriormente.

Se muestran plásmidos útiles en el presente documento en los ejemplos y se describen con detalle en el documento de Patente PCT/DE2003/002799 publicado como WO 2004/020623 (Bernd Rehm) y el documento de Patente PCT/NZ2006/000251 publicado como WO 2007/037706 (Bernd Rehm), que se incorporan cada uno al presente documento por referencia en su totalidad.

Se ha de entender que el dominio de unión capaz de unirse a al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* es capaz de unirse a un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* presente en el sujeto al que se administra el dominio de unión o en el que se va a provocar la respuesta inmunitaria.

De ese modo, en el contexto del uso para el diagnóstico o tratamiento de tuberculosis, se ha de entender que los

dominios de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* son capaces de unirse a al menos un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, por ejemplo, un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* presente en el sujeto al que se administra el dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o en el que se va a provocar la respuesta inmunitaria.

6. Hospedadores para producción de partículas

Las partículas de la presente invención se producen convenientemente en una célula hospedadora, usando uno o más constructos de expresión, como se describe en el presente documento. Las partículas de polímero de la invención pueden producirse permitiendo que la célula hospedadora exprese el constructo de expresión. Esto puede conseguirse introduciendo en primer lugar el constructo de expresión en la célula hospedadora o un progenitor de la célula hospedadora, por ejemplo transformando o transfectando una célula hospedadora o un progenitor de la célula hospedadora con el constructo de expresión, o asegurando de otro modo que el constructo de expresión esté presente en la célula hospedadora.

Después de la transformación, la célula hospedadora transformada se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de polipéptidos de fusión a partir de los constructos de expresión y para la formación de partículas de polímero. Tales condiciones comprenden las adecuadas para la expresión del constructo de expresión elegido, tal como un plásmido en un organismo adecuado, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, y particularmente cuando se desea alto rendimiento o sobreexpresión, la provisión de un sustrato adecuado en el medio de cultivo permite que el componente de proteína formadora de partícula de un polipéptido de fusión forme una partícula de polímero.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para producir partículas de polímero, comprendiendo el método:

proporcionar una célula hospedadora que comprende al menos un constructo de expresión de la invención, mantener la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del constructo de expresión y para la formación de partículas de polímero; y separar las partículas de polímero de las células hospedadoras.

Preferentemente, la célula hospedadora es, por ejemplo, una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula animal, preferentemente una célula hospedadora aislada o no humana. Las células hospedadoras útiles en métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1987; Ausubel *et al.*, 1987) para la producción de partículas de polímero recombinantes son frecuentemente adecuadas para uso en los métodos de la presente invención, teniendo en cuenta las consideraciones discutidas anteriormente.

Las células hospedadoras procariotas adecuadas comprenden, por ejemplo, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo *Enterobacteriaceae* tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen otras *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia* spp., *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Actinomycetes* tales como *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*.

En algunas realizaciones, puede usarse, por ejemplo, *E. coli* cepa W3110 porque es una cepa hospedadora común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas en el hospedador, incluyendo ejemplos de tales hospedadores *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo tonA; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo tonA ptr3; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kanr; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanr; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación por delección de degP no resistente a kanamicina.

En algunas realizaciones preferentes, pueden usarse, por ejemplo, cepas de *Lactococcus lactis* que no producen endotoxinas de lipopolisacárido. Algunos ejemplos de cepas de *Lactococcus lactis* incluyen MG1363 y *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* NZ9000.

Además de procariotas, microbios eucariotas tales como, por ejemplo, hongos filamentosos y levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para uso en los métodos de la invención. Algunos ejemplos incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, un microorganismo hospedador eucariota inferior usado habitualmente. Otros ejemplos incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, 1981; documento de Patente EP 139.383), hospedadores *Kluyveromyces* (documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.943.529; Fleer *et al.*, 1991) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, 1983), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K.*

bulgaricus (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, 1990), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento de Patente EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento de Patente EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, 1988); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento de Patente EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, 1979); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento de Patente EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento de Patente WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y hospedadores *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, 1983; Tilburn *et al.*, 1983; Yelton *et al.*, 1984) y *A. niger* (Kelly y Hynes, 1985). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en el presente documento y comprenden levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas entre los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Puede encontrarse una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras en Anthony, 1982.

Algunos ejemplos de células hospedadoras de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para transfección está disponible públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse como los virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Algunos ejemplos de líneas celulares de hospedadores mamíferos son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células renales de hámster pequeño (BHK, ATCC CCL10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, 1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, 1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Serán preferentes líneas celulares eucariotas, y particularmente líneas celulares de mamífero, cuando, por ejemplo, el antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células o el dominio de unión capaz de unirse al antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células o el antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o el dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* requiera una o más modificaciones postraduccionales tales como, por ejemplo, glicosilación. Por ejemplo, uno o más antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células pueden requerir modificación postraducciona para ser inmunogénicos u óptimamente inmunogénicos, y de ese modo pueden expresarse de forma útil en un hospedador de expresión capaz de tales modificaciones postraduccionales.

En una realización, la célula hospedadora es una célula con un citosol oxidante, por ejemplo *E. coli* cepa Origami (Novagen).

En otra realización, la célula hospedadora es una célula con un citosol reductor, preferentemente *E. coli*.

La célula hospedadora puede seleccionarse, por ejemplo, entre los géneros que comprenden *Ralstonia*, *Acaligenes*, *Pseudomonas* y *Halobiforma*. Preferentemente, el microorganismo usado se selecciona entre el grupo que comprende, por ejemplo, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas tragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Halobiforma haloterrestis*. Este grupo comprende microorganismos que son capaces de producir de forma natural partículas biocompatibles y biodegradables, y microorganismos, tales como, por ejemplo, *E. coli*, que no son capaces de hacerlo debido a su composición genética. Los genes requeridos para permitir que estos últimos microorganismos produzcan las partículas se introducen como se ha descrito anteriormente.

Las arqueas extremadamente halófilas producen partículas de polímero con niveles inferiores de unión inespecífica de proteína, permitiendo un aislamiento y una purificación más sencillos de las partículas a partir de las células.

En principio, puede usarse cualquier célula hospedadora cultivable para la producción de partículas de polímero mediante el proceso descrito anteriormente, incluso si la célula hospedadora no puede producir los sustratos requeridos para formar las partículas de polímero debido a un metabolismo diferente. En tales casos, se añaden los sustratos necesarios al medio de cultivo y a continuación se convierten en partículas de polímero mediante las proteínas expresadas por los genes que se han introducido en la célula.

Los genes utilizados para permitir que estas últimas células hospedadoras produzcan las partículas de polímero incluyen, por ejemplo, una tiolasa, una reductasa o una polímero sintasa, tal como tiolasa de phaA, cetoacil reductasa de phaB o sintasa de phaC de *Ralstonia eutropha*. Los genes que se usan para aumentar aquellos de los que carece

la célula hospedadora para la formación de partículas de polímero dependerán de la composición genética de la célula hospedadora y de los sustratos provistos en el medio de cultivo.

Los genes y proteínas implicados en la formación de partículas de polihidroxialcanoato (PHA), y consideraciones generales para la formación de partículas, se informan en Madison, *et al.*, 1999; el documento de Solicitud Internacional PCT Publicada WO 2004/020623 (Bernd Rehm); y Rehm, 2003; Brockelbank JA *et al.*, 2006; Peters y Rehm, 2006; Backstrom *et al.*, (2006) y Rehm, (2006), todos los cuales se incorporan al presente documento por referencia.

Una polímero sintasa sola puede usarse en cualquier célula hospedadora con (R)-hidroxiacil-CoA o u otro tioéster de CoA o derivados de los mismos como sustrato.

La partícula de polímero también puede formarse *in vitro*. Por ejemplo, se usa preferentemente un sistema de expresión sin células. En tales sistemas, se proporciona una polímero sintasa. Será preferente polímero sintasa purificada, tal como la obtenible a partir de producción recombinante, o en sistemas sin células capaces de traducción de proteínas, que es obtenible en el propio sistema sin células por introducción de un constructo de expresión que codifica una polímero sintasa. Para producir un entorno que permita la formación de partículas *in vitro*, deberían incluirse en el medio los sustratos necesarios para la formación de partículas de polímero.

La polímero sintasa puede usarse para la producción *in vitro* de partículas de polímero funcionalizadas usando, por ejemplo, (R)-hidroxiacil-CoA o u otro tioéster de CoA como sustrato.

Los polipéptidos de fusión pueden purificarse a partir de células lisadas usando un clasificador celular, centrifugación, filtración o cromatografía de afinidad antes de usarse en la producción de partículas de polímero *in vitro*.

La formación de partículas de polímero *in vitro* permite el control óptimo de la composición superficial, incluyendo el nivel de cobertura de polipéptidos de fusión, composición de fosfolípidos, etc.

Se ha de entender que las características de la partícula de polímero pueden influirse o controlarse mediante el control de las condiciones en las que se produce la partícula de polímero. Esto puede incluir, por ejemplo, la composición genética de la célula hospedadora, por ejemplo, mutantes de división celular que producen grandes gránulos, como se discute en Peters y Rehm, 2005. Las condiciones en las que se mantiene una célula hospedadora, por ejemplo temperatura, presencia de sustrato, presencia de una o más proteínas formadoras de partícula tales como proteína determinante del tamaño de partícula, presencia de un regulador de polímero, y similares.

En una realización, una característica deseable de la partícula de polímero es que es persistente. El término "persistente" se refiere a la capacidad de la partícula de polímero para resistir la degradación en un entorno seleccionado. Una característica deseable adicional de la partícula de polímero es que se forma a partir de la polímero sintasa o proteína formadora de partícula y se une al extremo C-terminal o N-terminal de la polímero sintasa o proteína formadora de partícula durante el ensamblaje de la partícula.

En algunas realizaciones de la invención, es deseable conseguir la sobreexpresión de los constructos de expresión en la célula hospedadora. Los mecanismos para la sobreexpresión de un constructo de expresión particular se conocen bien en la técnica, y dependerán del propio constructo, el hospedador en el que se va a expresar, y otros factores que incluyen el grado de sobreexpresión deseado o requerido. Por ejemplo, puede conseguirse sobreexpresión mediante i) el uso de un sistema promotor fuerte, por ejemplo el sistema promotor de ARN polimerasa de T7 en hospedadores procariotas; ii) el uso de un plásmido de alto número de copias, por ejemplo un plásmido que contiene el origen de replicación *colEI*, o iii) la estabilización del ARN mensajero, por ejemplo a través del uso de secuencias de fusión, o iv) la optimización de la traducción, por ejemplo a través de la optimización del uso de codones, de sitios de unión ribosomales, o sitios de terminación, y similares. Los beneficios de la sobreexpresión pueden permitir la producción de partículas de menor tamaño cuando se desee y la producción de un mayor número de partículas de polímero.

La composición de los polímeros que forman las partículas de polímero puede afectar a las propiedades mecánicas o fisicoquímicas de las partículas de polímero. Por ejemplo, las partículas de polímero que difieren en la composición de polímero pueden diferir en semivida o pueden liberar sustancias biológicamente activas, en particular ingredientes farmacéuticamente activos, a diferentes velocidades. Por ejemplo, las partículas de polímero compuestas por 3-hidroxiácidos grasos C₆-C₁₄ exhiben una mayor velocidad de degradación polimérica debido a la baja cristalinidad del polímero. Un aumento en la proporción molar de constituyentes poliméricos con cadenas laterales relativamente grandes en la cadena principal del polímero reduce habitualmente la cristalinidad y da como resultado propiedades elastoméricas más pronunciadas. Por consiguiente, controlando la composición del polímero de acuerdo con el proceso descrito en la invención, es posible influir en la biodegradabilidad de las partículas de polímero y de ese modo afectar a la duración de las partículas de polímero (y, cuando están presentes el uno o más antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células o los dominios de unión de los antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células en la partícula o el uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* o dominios de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* en la partícula, se mantienen en, por ejemplo, un sujeto al que se administran, o afectan a la velocidad de liberación de las sustancias biológicamente activas presentes sobre

o en las partículas de polímero, en agentes farmacéuticamente activos particulares o ingredientes para el cuidado de la piel).

5 Preferente, se introduce al menos un ácido graso con grupos laterales funcionales en el medio de cultivo como sustrato para la formación de las partículas de polímero, introduciéndose de forma particularmente preferente al menos un hidroxigraso y/o al menos un mercaptograso y/o al menos un β -aminoácido graso. Se ha de entender que "ácidos grasos con grupos laterales funcionales" significa ácidos grasos saturados o insaturados. Estos también incluyen ácidos grasos que contienen grupos laterales funcionales que se seleccionan entre el grupo que comprende grupos metilo, grupos alquilo, grupos hidroxilo, grupos fenilo, grupos sulfhidrilo, grupos amino primario, secundario y terciario, grupos aldehído, grupos ceto, grupos éter, grupos carboxilo, grupos O-éster, grupos tioéster, grupos amida de ácido carboxílico, grupos hemiacetal, grupos acetal, grupos fosfatomonoéster y grupos fosfatodiesté. El uso de los sustratos viene determinado por la composición deseada y las propiedades deseadas de la partícula de polímero.

15 El sustrato o la mezcla de sustratos puede comprender al menos un aminoácido, lactato, éster o ácido graso saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, preferentemente acetil-CoA.

20 En una realización, se proporciona en la mezcla de sustratos un adyuvante, un agente o molécula inmunomodulador, tal como un agente o molécula inmunoestimulador, u otro compuesto útil en la preparación de vacunas, y se incorpora a la partícula de polímero durante la formación de partículas de polímero, o se permite que se difunda en la partícula de polímero.

25 La partícula de polímero puede comprender, por ejemplo, un polímero seleccionado entre poli-beta-aminoácidos, polilactatos, polioésteres y poliésteres. Lo más preferentemente, el polímero comprende polihidroxialcanoato (PHA), preferentemente poli(3-hidroxibutirato) (PHB).

La polimerasa o partícula de polímero comprende preferentemente una monocapa fosfolipídica que encapsula la partícula de polímero. Preferentemente, dicha proteína formadora de partícula abarca dicha monocapa lipídica.

30 La polimerasa o proteína formadora de partícula está unida preferentemente a la partícula de polímero o a la monocapa fosfolipídica o está unida a ambas.

La proteína formadora de partícula está unida preferentemente covalentemente o no covalentemente a la partícula de polímero que forma.

35 Preferentemente, al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % del área superficial de la partícula de polímero está cubierta por polipéptidos de fusión.

40 En ciertas circunstancias, puede ser deseable controlar el tamaño de las partículas producidas en los métodos de la invención, por ejemplo, para producir partículas particularmente adecuadas para una aplicación dada. Por ejemplo, puede ser deseable producir partículas de polímero que comprendan uno o más antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células de un tamaño relativamente grande, por ejemplo para provocar una respuesta inmunitaria mediada por células robusta. Por ejemplo, en el contexto de partículas para uso en el tratamiento de tuberculosis, puede ser deseable producir partículas de polímero que comprendan uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* de un tamaño relativamente grande, por ejemplo para provocar una respuesta inmunitaria mediada por células robusta. Se describen métodos para controlar el tamaño de partículas de polímero en los documentos de Patente PCT/DE2003/002799, publicado como WO 2004/020623, y PCT/NZ2006/000251, publicado como WO 2007/037706.

50 En algunas realizaciones, el tamaño de partícula se controla, por ejemplo, controlando la expresión de la proteína formadora de partícula, o controlando la expresión de una proteína determinante del tamaño de partícula, si estuviera presente.

55 En otras realizaciones de la presente invención, el control del tamaño de partícula puede conseguirse, por ejemplo, controlando la disponibilidad de un sustrato, por ejemplo la disponibilidad de un sustrato en el medio de cultivo. En ciertos ejemplos, el sustrato puede añadirse al medio de cultivo en una cantidad tal que sea suficiente para asegurar el control del tamaño de la partícula de polímero.

60 Se ha de entender que puede usarse una combinación de tales métodos, permitiendo la posibilidad de ejercer un control aún más eficaz en el tamaño de partícula.

65 En diversas realizaciones, por ejemplo, puede controlarse el tamaño de partícula para producir partículas que tengan un diámetro de aproximadamente 10 nm a 3 μ m, preferentemente de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 900 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 800 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 700 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 400 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente

300 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 200 nm, y de forma particularmente preferente de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 nm.

En otras realizaciones, por ejemplo, puede controlarse el tamaño de partícula para producir partículas que tengan un diámetro de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 30 nm, o de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 20 nm.

Se contemplan específicamente otros intervalos de tamaño medio de polímero, por ejemplo, que incluyan intervalos dentro de los intervalos enumerados anteriormente, por ejemplo partículas de polímero que tengan un diámetro de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 nm, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nm, etc.

En diversas realizaciones, por ejemplo, un 90 % de las partículas producidas tiene un diámetro de aproximadamente 200 nm o inferior, un 80 % tiene un diámetro de aproximadamente 150 nm o inferior, un 60 % tiene un diámetro de aproximadamente 100 nm o inferior, un 45 % tiene un diámetro de aproximadamente 80 nm o inferior, un 40 % tiene un diámetro de aproximadamente 60 nm o inferior, un 25 % tiene un diámetro de aproximadamente 50 nm o inferior, y un 5 % tiene un diámetro de aproximadamente 35 nm o inferior.

En diversas realizaciones, por ejemplo, el método produce partículas de polímero con un diámetro medio de menos de aproximadamente 200 nm, menos de aproximadamente 150 nm, o menos de aproximadamente 110 nm.

7. Composiciones y formulaciones

Las partículas de polímero de la invención pueden formularse como composiciones adecuadas para uso en los métodos de la invención para una diversidad de aplicaciones diferentes, por ejemplo, formuladas para administración mediante una vía particular o formuladas para almacenamiento, pueden mantenerse de forma estable como partículas fuera de la célula hospedadora que las produjo, y que estas partículas pueden diseñarse para adaptarse a una diversidad de aplicaciones.

En una realización, por ejemplo, las composiciones útiles en el presente documento se formulan para permitir la administración a un sujeto mediante cualquier vía elegida, incluyendo, pero sin limitación, administración oral o parenteral (incluyendo tópica, subcutánea, intramuscular e intravenosa).

De ese modo, por ejemplo, una composición farmacéutica útil de acuerdo con la invención puede formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado (incluyendo excipientes, diluyentes, sustancias auxiliares y combinaciones de los mismos) seleccionados con respecto a la vía de administración destinada y la práctica farmacéutica convencional. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas destinadas para vacunación pueden contener uno o más adyuvantes o inmunoestimuladores, como se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, una composición útil de acuerdo con la invención puede administrarse por vía oral en forma de polvo, líquido, comprimido o cápsula, o por vía tópica en forma de pomada, crema o loción. Las formulaciones adecuadas pueden contener agentes adicionales según se requiera, incluyendo agentes emulgentes, antioxidantes, aromatizantes o colorantes, y pueden adaptarse para liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

De ese modo, la invención también se refiere a dosis, formas de dosificación, formulaciones, composiciones y/o dispositivos que comprenden una o más partículas de polímero de la invención, incluyendo las desveladas en el presente documento, útiles para el diagnóstico o terapia de enfermedades, trastornos y/o afecciones en seres humanos y otros mamíferos u otras enfermedades desveladas en el presente documento. El uso de estas formas de dosificación, formulaciones, composiciones y/o dispositivos que comprenden una o más partículas de polímero de la invención permite identificación y/o tratamiento eficaces de estas afecciones. La invención proporciona, por ejemplo, formas de dosificación, formulaciones, dispositivos y/o composiciones que contienen una o más partículas de polímero de la invención. Las formas de dosificación, formulaciones, dispositivos y/o composiciones de la invención pueden formularse para optimizar biodisponibilidad, inmunogenicidad o para mantener las concentraciones plasmáticas, sanguíneas o tisulares en el intervalo inmunogénico, diagnóstico o terapéutico, incluyendo durante períodos prolongados. También pueden usarse preparaciones de suministro controlado, por ejemplo, para optimizar la concentración de antígeno en el sitio de acción.

Las formas de dosificación, formulaciones, dispositivos y/o composiciones de la invención se formulan, en ciertas realizaciones, para administración periódica, por ejemplo para proporcionar exposición continuada a las una o más partículas de polímero de la invención. Las estrategias para provocar una respuesta inmunológica beneficiosa, por ejemplo las que emplean una o más vacunaciones de "refuerzo", se conocen bien en la técnica, y tales estrategias pueden adoptarse en la práctica de la presente invención.

Las composiciones de diagnóstico de la presente invención se formulan, en ciertas realizaciones, para administración

tópica, por ejemplo, se formulan para uso en ensayos de punción de piel.

Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación pueden administrarse por vía parenteral, y esta vía será preferente para ciertas realizaciones de métodos para provocar una respuesta inmunitaria, tales como los descritos en el presente documento. Algunos ejemplos de formas de dosificación parenterales incluyen soluciones acuosas, solución salina isotónica o glucosa al 5 % del agente activo, u otros excipientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos. Por ejemplo, pueden utilizarse ciclodextrinas u otros agentes solubilizantes bien conocidos por los expertos familiarizados con la técnica, como excipientes farmacéuticos para el suministro del agente terapéutico.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, obleas, o formas similares, o cualquier forma líquida tal como jarabes, soluciones acuosas, emulsiones y similares, capaces de proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de polímero de la invención. Las cápsulas pueden contener cualquier material farmacéuticamente aceptable convencional tal como gelatina o celulosa. Los comprimidos pueden formularse de acuerdo con procedimientos convencionales por compresión de mezclas de los ingredientes activos con un vehículo sólido y un lubricante. Algunos ejemplos de vehículos sólidos incluyen almidón, azúcar y bentonita. Los ingredientes activos también pueden administrarse en forma de un comprimido de cubierta dura o una cápsula que contiene un aglutinante, por ejemplo, lactosa o manitol, una carga convencional, y un agente de formación de comprimidos.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración transdérmica incluyen, pero no se limitan a, parches transdérmicos, vendas transdérmicas, y similares. Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración tópica de las composiciones y formulaciones de la invención son cualquier loción, barra, pulverización, pomada, pasta, crema, gel, etc., tanto si se aplican directamente la piel como se hace mediante un intermediario tal como una almohadilla, parche o similar.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración con supositorio de las composiciones y formulaciones de la invención incluyen cualquier forma de dosificación sólida insertada en un orificio corporal, particularmente las insertadas por vía rectal, vaginal y uretral.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para inyección de las composiciones y formulaciones de la invención incluyen el suministro mediante bolo tal como administraciones individuales o múltiples mediante inyección intravenosa, administración subcutánea, subdérmica e intramuscular o administración oral.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración retardada de las composiciones y formulaciones de la invención incluyen microgránulos o cilindros pequeños de partículas de polímero de la invención o formas sólidas en donde las partículas de polímero de la invención están atrapadas en una matriz polimérica biodegradable, microemulsiones, liposomas o están microencapsuladas.

Algunos ejemplos de dispositivos de infusión para composiciones y formulaciones de la invención incluyen bombas de infusión que contienen una o más partículas de polímero de la invención en una cantidad deseada para un número deseado de dosis o administración continua, e incluyen bombas implantables de fármacos.

Algunos ejemplos de dispositivos de infusión implantables para composiciones y formulaciones de la invención incluyen cualquier forma sólida en la que las partículas de polímero de la invención estén encapsuladas dentro de o dispersas en un polímero biodegradable o polímero sintético, tal como silicona, caucho de silicona, Silastic, o polímero similar.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración transmucosa de las composiciones y formulaciones de la invención incluyen soluciones de depósito para enemas, pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas, soluciones nebulizadas, polvos y formulaciones similares que contienen, además de ingredientes activos, vehículos tales como los conocidos en la técnica por ser apropiados. Se contemplan específicamente formas de dosificación adecuadas para inhalación o insuflación de las composiciones y formulaciones de la invención, incluyendo composiciones que comprenden soluciones y/o suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o una mezcla de los mismos y/o polvos. La administración transmucosa de las composiciones y formulaciones de la invención puede utilizar cualquier membrana mucosa, pero utiliza habitualmente los tejidos nasal, bucal, vaginal y rectal. Las formulaciones adecuadas para administración nasal de las composiciones y formulaciones de la invención pueden administrarse en forma líquida, por ejemplo, pulverización nasal, gotas nasales, o mediante administración de aerosol mediante nebulizador, incluyendo soluciones acuosas o aceitosas de las partículas de polímero. Las formulaciones para administración nasal, en donde el vehículo es sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, de menos de aproximadamente 100 micrómetros, preferentemente menos, lo más preferentemente menos de aproximadamente 50 micrómetros, que se administra de la forma en que se hace con el rapé, es decir, por inhalación rápida a través de los conductos nasales desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones de la invención pueden prepararse como soluciones acuosas, por ejemplo, en solución salina, soluciones que emplean alcohol bencílico u otro conservante adecuado, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración bucal de las composiciones y formulaciones de la invención incluyen pastillas para chupar, comprimidos y similares, composiciones que comprenden soluciones y/o suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos y/o polvos.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración sublingual de las composiciones y formulaciones de la invención incluyen pastillas para chupar, comprimidos y similares, composiciones que comprenden soluciones y/o suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos y/o polvos.

Algunos ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración oftálmica de las composiciones y formulaciones de la invención incluyen insertos y/o composiciones que comprenden soluciones y/o suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Algunos ejemplos de formulaciones de composiciones, incluyendo vacunas y formulaciones farmacológicas controladas, útiles para la administración de las composiciones y formulaciones de la invención, se encuentran, por ejemplo, en S. C. (Ed.). *Martindale. The Complete Drug Reference*, 33ª edición, Pharmaceutical Press, Chicago, 2002, pág. 2483; Aulton, M. E. (Ed.) *Pharmaceutics. The Science of Dosage Form Design*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000, pág. 734; y, Ansel, H. C., Allen, L. V. y Popovich, N. G. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª Ed., Lippincott 1999, pág. 676. Algunos excipientes empleados en la fabricación de sistemas de suministro farmacológico se describen en diversas publicaciones conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, Kibbe, E. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3ª Ed., American Pharmaceutical Association, Washington, 2000, pág. 665. USP también proporciona ejemplos de formas de dosificación oral de liberación modificada, incluyendo las formuladas como comprimidos o cápsulas. Véase, por ejemplo, *The United States Pharmacopeia 23/National Formulary 18*, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville MD, 1995 (en lo sucesivo "USP"), que también describe ensayos específicos para determinar las capacidades de liberación de fármaco de comprimidos y cápsulas de liberación prolongada y liberación retardada. El ensayo de USP para liberación de fármaco para artículos de liberación prolongada y liberación retardada se basa en la disolución del fármaco desde la unidad de dosificación frente al tiempo de ensayo transcurrido. Pueden encontrarse descripciones de diversos aparatos y procedimientos de ensayo en USP. Se han proporcionado directrices adicionales concernientes al análisis de formas de dosificación de liberación prolongada en la FDA (véase, *Guidance for Industry. Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations*. Rockville, MD: Center for Drug Evaluation y Research, Food and Drug Administration, 1997).

Algunos ejemplos adicionales de formas de dosificación de la invención incluyen, pero no se limitan a, formas de dosificación de liberación modificada (MR) incluyendo formas de liberación retardada (DR); formas de acción prolongada (PA); formas de liberación controlada (CR); formas de liberación extendida (ER); formas de liberación temporizada (TR); y formas de acción prolongada (LA). En la mayoría de los casos, estos términos se usan para describir formas de dosificación administradas por vía oral aunque, sin embargo, estos términos pueden ser aplicables a cualquier forma de dosificación, formulación, composición y/o dispositivo descrito en el presente documento. Estas formulaciones efectúan la liberación farmacológica total retrasada durante cierto tiempo después de la administración del fármaco, y/o la liberación del fármaco en pequeñas alícuotas intermitentemente después de la administración, y/o la liberación del fármaco lentamente a una velocidad controlada gobernada por el sistema de suministro, y/o la liberación del fármaco a una velocidad constante que no varía, y/o la liberación del fármaco durante un período significativamente mayor que las formulaciones habituales.

En ciertas realizaciones, una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de una o más partículas de polímero de la invención o de uno o más antígenos que comprenden una o más partículas de polímero de la invención es de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg. Algunos intervalos de dosificación diagnóstica o terapéuticamente eficaz a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 400 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 90 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 70 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 60 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 50 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 200 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 300 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 400 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 500 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 600 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 700 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 800 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 900 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg a

aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 45 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg.

- 5 Otros intervalos de dosificación diagnóstica o terapéuticamente eficaz incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1 g/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 950 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 900 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 850 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 800 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 700 mg/kg, 5 mg/kg a aproximadamente 600 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 400 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg.

- En algunas realizaciones de la invención dirigidas a sujetos humanos, una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de una o más partículas de polímero de la invención o de uno o más antígenos que comprenden una o más partículas de la invención es, por ejemplo, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 10 g por dosis. Otros intervalos de dosis diagnóstica o terapéuticamente eficaz incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 9 g, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 8 g, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 7 g, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 6 g, de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 5 g, de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 4 g, aproximadamente 80 mg a aproximadamente 3 g, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 2 g, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1,5 g, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 300 mg a aproximadamente 900 mg, aproximadamente 300 mg a aproximadamente 800, aproximadamente 300 mg a aproximadamente 700 mg o aproximadamente 300 mg a aproximadamente 600 mg por dosis.

- La invención también proporciona, en parte, composiciones, formulaciones y dispositivos de baja dosificación que comprenden una o más partículas de polímero de la invención. Por ejemplo, las composiciones, formulaciones y similares de baja dosis se administran en una cantidad suficiente para proporcionar, por ejemplo, dosificaciones de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 3,5 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 0,05-0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,05-0,1 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 0,05-0,1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,05-0,1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 0,05-0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, y/o cualquier otra dosis o intervalo de dosis dentro de los intervalos expuestos en el presente documento, de una o más partículas de polímero de la invención o de uno o más antígenos que comprenden una o más partículas de polímero de la invención.

- 45 Las dosis descritas en el presente documento pueden administrarse en una dosis individual o dosis múltiples o dosis divididas. Por ejemplo, las dosis pueden administrarse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces o más veces durante un régimen de tratamiento, como se conoce bien en la técnica inmunológica.

- La eficacia de la composición útil de acuerdo con la invención puede evaluarse tanto *in vitro* como *in vivo*. Véanse, por ejemplo, los ejemplos posteriores. En resumen, la composición puede someterse a ensayo *in vitro* o *in vivo* para evaluar su estabilidad para inducir una respuesta inmunitaria mediada por células. Para estudios *in vivo*, la composición puede alimentarse a o inyectarse en un animal (por ejemplo, un ratón) y a continuación se evalúan sus efectos en la provocación de una respuesta inmunitaria. Basándose en los resultados, se determina a continuación un intervalo de dosificación y una vía de administración apropiados.

- En algunas realizaciones de la invención, una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunológica, tal como, por ejemplo, una concentración de IFN-gamma en la sangre de aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 15 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml a aproximadamente 9 ng/ml, aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 8 ng/ml, aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 7 ng/ml o aproximadamente 3 ng/ml a aproximadamente 6 ng/ml.

- En algunas circunstancias, incluyendo infección posterior o durante infección prolongada, se observan concentraciones sanguíneas elevadas de IFN-gamma, y tales concentraciones elevadas deberían tenerse en cuenta para evaluar un valor basal frente al que se evalúe la provocación de una respuesta inmunológica eficaz mediante las partículas de polímero de la invención.

8. Usos a modo de ejemplo de partículas de polímero de la invención

Se ha descubierto que las partículas de polímero, por ejemplo, partículas de polímero de polihidroxialquilo, pueden mantenerse de forma estable como partículas en el exterior de la célula hospedadora que las produce, y que estas partículas pueden diseñarse para adecuarse a una diversidad de aplicaciones.

Las partículas de polímero funcionalizadas pueden comprender uno o más antígenos unidos a la superficie capaces de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células u otra respuesta inmunitaria, una o más sustancias unidas a dominios de unión de un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células u otra respuesta inmunitaria, o una combinación de los mismos.

En una realización, por ejemplo, se inmoviliza una sustancia en la superficie de la partícula durante la formación de la partícula, unida a un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células, o integrada en la partícula por carga, difusión o incorporación.

En el contexto del uso en el diagnóstico o tratamiento de tuberculosis, por ejemplo, algunas partículas de polímero a modo de ejemplo comprenden uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* unidos superficialmente, y opcionalmente una o más sustancias unidas a dominios de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, o una combinación de las mismas.

En una realización, puede inmovilizarse una sustancia en la superficie de la partícula durante la formación de la partícula, unida a, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, o integrada en la partícula por carga, difusión o incorporación. También se contempla específicamente la unión covalente a la superficie de la partícula de polímero, por ejemplo, por reticulación.

En una realización, la sustancia se selecciona entre la lista que comprende, por ejemplo, una proteína o fragmento de proteína, un péptido, un polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un dominio de unión de anticuerpo, un antígeno, un determinante antigénico, un epítipo, un inmunógeno o fragmento del mismo, o cualquier combinación de dos cualesquiera o más de los mismos.

En una realización, el ADN de un patógeno intracelular puede fragmentarse e insertarse en constructos de expresión que codifican polipéptidos de fusión que comprenden una polímero sintasa. De esta forma, pueden producirse partículas de polímero que presentan determinantes antigénicos de patógenos intracelulares y cribarse usando suero de pacientes infectados y partículas presentadoras de antígeno identificadas, aisladas y reproducidas usando sistemas de producción bacterianos escalables y bien conocidos.

En una realización, se inmovilizan múltiples antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células (u otra) en la superficie de las partículas de polímero.

En una realización, el ADN de una bacteria *M. tuberculosis* o *M. bovis*, por ejemplo, puede fragmentarse e insertarse en constructos de expresión que codifican polipéptidos de fusión que comprenden una polímero sintasa. De esta forma, pueden producirse partículas de polímero que presentan determinantes antigénicos de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, por ejemplo, y cribarse usando suero de pacientes infectados y partículas presentadoras de antígeno identificadas, aisladas y reproducidas usando sistemas de producción bacterianos escalables y bien conocidos.

En una realización, por ejemplo, se inmovilizan múltiples antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* u otros antígenos en la superficie de las partículas de polímero.

Un aspecto de la invención se refiere a la capacidad de las partículas de polímero de portar uno o más antígenos que provocan una respuesta inmunitaria. En una realización, las partículas de polímero comprenden al menos un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células u otra respuesta inmunitaria fusionado a la partícula de polímero. Las partículas de polímero presentan al menos un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células u otra respuesta inmunitaria en su superficie para estimular una respuesta inmunitaria óptima a los restos antigénicos.

En una realización, las partículas de polímero que portan uno o más antígenos provocan una respuesta inmunitaria. En una realización, las partículas de polímero comprenden al menos un antígeno de *M. tuberculosis*, por ejemplo, fusionado a la partícula de polímero. Las partículas de polímero presentan al menos un antígeno de *M. tuberculosis*, por ejemplo, en su superficie para estimular una respuesta inmunitaria óptima a los restos antigénicos.

En una realización, por ejemplo, más de un antígeno o una combinación de antígeno y adyuvantes u otro agente o molécula inmunomodulador, tal como un agente o molécula inmunoestimulador, están presentes en o sobre la partícula o presentes en una composición. Habitualmente, la presencia de la combinación de antígenos, adyuvantes u otros agentes o moléculas inmunomoduladores hará que se potencie adicionalmente la respuesta inmunitaria.

La presente divulgación también se refiere a un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto, en donde el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una partícula de polímero que comprende una proteína formadora de partícula, preferentemente una polímero sintasa, por ejemplo, fusionada a uno o más dominios de unión capaces de unirse a un antígeno seleccionado entre un antígeno ESAT6, CFP10, Rv3615c o Rv3020c. En esta realización, tras la administración al sujeto, el dominio o dominios de unión capaces de unirse a dichos antígenos se unen al antígeno endógeno, facilitando de ese modo una respuesta inmunitaria.

Por ejemplo, los antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células que están presentes en el sujeto antes de la administración de la partícula que comprende al menos un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis*, por ejemplo, pero son incapaces de provocar una respuesta inmunitaria eficaz en el sujeto, se unen a la partícula capaz de provocar una respuesta inmunitaria eficaz y es eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto infectado con tuberculosis, por ejemplo, o inmunizado previamente frente a tuberculosis, por ejemplo, en donde el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una partícula de polímero que comprende una proteína formadora de partícula fusionada a un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, por ejemplo.

En este aspecto, por ejemplo, tras la administración al sujeto, el dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* puede unirse a un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* endógeno. Se ha de entender que la unión de una partícula de polímero que comprende un dominio de unión a antígeno *M. tuberculosis* o *M. bovis* a un antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* endógeno, por ejemplo, es capaz de provocar o potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto.

Por ejemplo, el antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis* que está presente en el sujeto antes de la administración de la partícula que comprende al menos un dominio de unión a antígeno de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, pero es incapaz de provocar una respuesta inmunitaria eficaz en el sujeto, se une a la partícula capaz de provocar una respuesta inmunitaria eficaz o es eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto.

Se ha de entender que la presente divulgación proporciona partículas, composiciones y métodos que provocan una respuesta inmunitaria en los sujetos a los que se administran. Preferentemente, la magnitud de la respuesta inmunitaria provocada en respuesta a uno o más antígenos presentados al sujeto usando las partículas, composiciones y métodos de la invención es mayor que la provocada en respuesta al antígeno solo (es decir, en ausencia de una partícula o composición de la invención o presentado mediante un método distinto de los proporcionados en el presente documento). Los métodos para cuantificar la magnitud de una respuesta inmunitaria, y particularmente una respuesta inmunitaria mediada por células, se conocen bien en la técnica.

Los métodos contemplados particularmente para provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, en el diagnóstico de tuberculosis, comprenden ensayos cutáneos. Los formatos más habituales de ensayo para bovinos son el ensayo del pliegue caudal (CFT), el ensayo individual de tuberculina cervical intradérmica (SIT) y el ensayo comparativo individual de tuberculina cervical intradérmica (SICCT) (Monaghan *et al.* (1994) Vet. Microbiol, vol. 40 pág. 111-24).

Estos formatos de ensayo usan una tuberculina procedente de proteína purificada (PPD) preparada a partir de un cultivo de *M. bovis* (PPD-B) como antígeno de diagnóstico primario. Además, el ensayo SICCT intenta abordar la sensibilización ambiental mediante el uso de PPD procedente de *M. avium* (PPD-A). Los ensayos cutáneos referidos en el presente documento pueden ser cualquiera de los ensayos CFT, SIT o SICCT, descritos en Office International des Epizooties (OIE) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009 (ISBN-10:92-9044-718-4; http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2_04_07_BOVINE_TB.pdf, consultado el 8 de noviembre de 2013, en particular el capítulo 2.4.7. Los criterios de ensayo positivos se perfilan en el mismo, y el experto en la materia entenderá bien los mismos.

Por tanto, cuando las partículas de polímero y reactivos de diagnóstico de la invención provocan un resultado positivo cuando se administran en un ensayo cutáneo, este resultado se determina, por ejemplo, por detección de un aumento del grosor y/o induración de la piel en el sitio de administración (por ejemplo, inyección). Como se perfila en el manual, por ejemplo, son útiles calibres u otros dispositivos de medición. En ciertas realizaciones, el grosor de piel se determina antes de la administración/inyección y nuevamente una vez o más, por ejemplo, aproximadamente 24, 36, 48, 72, 96 o aproximadamente 120 horas después de la administración/inyección. Es habitual determinar el grosor de piel aproximadamente 72 horas después de la inyección, como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento.

Algunos métodos adicionales particularmente contemplados para diagnosticar tuberculosis comprenden ensayos de diagnóstico tales como ensayos basados en citoquinas o células, incluyendo, por ejemplo, ensayos de inmunidad mediada por células, en los que una muestra obtenida de un sujeto se pone en contacto con una partícula de polímero de la invención. Habitualmente, la muestra contendrá una población celular, incluyendo células inmunitarias tales como linfocitos T, capaz de mediar o modular una respuesta inmunitaria. Los ensayos particularmente contemplados incluyen ensayos de interferón-gamma, tales como ELISA de interferón-gamma. En ejemplos particulares, la respuesta a un ensayo, tal como un ELISA de interferón-gamma, es capaz de distinguir entre sujetos que padecen tuberculosis, y sujetos inmunizados frente a tuberculosis, por ejemplo con BCG.

9. Moduladores de una respuesta inmunitaria

En ciertas circunstancias, será deseable producir partículas de polímero que presenten una proteína de fusión que comprenda dos o más antígenos del grupo que comprende ESAT6, CFP10, Rv3615c, y Rv3020c. Alternativamente, una proteína de fusión que comprende al menos uno o más de estos antígenos con un adyuvante u otro modulador de una respuesta inmunitaria es deseable para provocar una respuesta inmunitaria.

En un ejemplo, una partícula de polímero de la invención comprende uno o más antígenos junto con uno o más receptores de tipo Toll, incluyendo uno o más receptores de tipo Toll capaces de unirse a uno o más del grupo de ligandos que comprende LPS, lipoproteínas, lipopéptidos, flagelina, ARN bicatenario, islas de CpG sin metilar, ADN o ARN bacteriano o viral. Del mismo modo, una composición de la invención puede comprender una población de partículas de polímero que comprenda uno o más antígenos de TB, y una población de partículas de polímero que comprenda una o más moléculas inmunomoduladoras, tales como uno o más receptores de tipo Toll.

La presencia de una o más moléculas inmunomoduladoras puede ser útil para provocar una respuesta inmunitaria específica humoral, o una respuesta inmunitaria específica mediada por células, o para provocar una respuesta inmunitaria que comprende una combinación de respuestas tanto humoral como mediada por células.

La invención consiste en lo expuesto anteriormente y también contempla construcciones de las que a continuación se dan sólo ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Construcción de plásmidos y producción de partículas de polímero de PHA

Este ejemplo describe la preparación de partículas de polímero de la invención, y su evaluación como reactivos de diagnóstico para tuberculosis.

Introducción

Tres antígenos específicos de TB, la diana antigénica secretora temprana de 6 kDa (ESAT6), la proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa (CFP10) y Rv3615c, se expresan mediante elementos del complejo patógeno de *M. tuberculosis* que incluye *M. bovis*, pero no expresa la mayoría de las micobacterias ambientales no patógenas y la cepa de la vacuna BCG (Millington, 2011; Waters *et al.*, 2004). Estas proteínas inmunodominantes se han evaluado previamente en ensayos de interferón- γ (IFN- γ) para el diagnóstico de TB en ganado (Buddle *et al.*, 1999). Recientemente, los ensayos cutáneos bovinos que usan una combinación de estas tres proteínas indicaron que tenían una alta sensibilidad para la detección de animales infectados con *M. bovis* mientras se diferenciaban de los vacunados con BCG (Whelan *et al.*, 2010; Casal *et al.*, 2012). Este ejemplo describe una investigación de la presentación funcional de estos tres antígenos en partículas de poliéster y su rendimiento en ensayos cutáneos bovinos de TB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento. Las cepas bacterianas usadas en este estudio se enumeran en la Tabla 1. La cepa de *E. coli* usada para clonación, XL1-Blue (Stratagene) transformada con los plásmidos de expresión, se cultivó en caldo Luria (Difco, Detroit, MI) suplementado con tetraciclina (12,5 $\mu\text{g/ml}$) y ampicilina (75 $\mu\text{g/ml}$). El medio para el crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) usado para la producción de partículas de poliéster contenía cloranfenicol (50 $\mu\text{g/ml}$) en lugar de tetraciclina.

Plásmidos, oligonucleótidos y generación de plásmidos para la producción de biopartículas que presentan antígenos micobacterianos. Los plásmidos y cebadores usados en este estudio se enumeran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Los procedimientos generales de clonación molecular se implementaron como se describe en otra parte (Sambrook *et al.*, 1989). Las secuencias de ADN de nuevos constructos de plásmido se verificaron por secuenciación de ADN. La biosíntesis de poliéster requiere, además del gen de poliéster sintasa (phaC), las enzimas PhaA y PhaB para síntesis de precursores, y estas enzimas se codificaron en el plásmido pMCS69 (Amara *et al.*, 2003).

TABLA 1. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepas o plásmidos	Características pertinentes	Referencias
Cepas de <i>E. coli</i>		
BL21 (DE3)	<i>F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal λ(DE3)</i>	Stratagene
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene

(continuación)

Cepas o plásmidos	Características pertinentes	Referencias
Nombre del plásmido		
pET-14b	Apr; promotor T7	Novagen
pET-14b phaC	Derivado de pET-14b que contiene fragmento de gen <i>phaC</i>	(Peters <i>et al.</i> , 2005)
pET-14b cfp10-phaC	Derivado de pET-14b que contiene fragmento <i>NdeI</i> gen <i>cfp10</i> fusionado al extremo 5' de <i>phaC</i>	El presente documento
pET-14b rv3615c-phaC	Derivado de pET-14b que contiene fragmento <i>NdeI</i> gen <i>rv3675c</i> fusionado al extremo 5' de <i>phaC</i>	El presente documento
pET-14b esat6-phaC	Derivado de pET-14b que contiene fragmento <i>NdeI</i> gen <i>esat6</i> fusionado al extremo 5' de <i>phaC</i>	El presente documento
pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC	Derivado de pET-14b que contiene fragmento <i>SpeI</i> genes <i>cfp10-conector-rv3615c</i> fusionado al extremo 5' de <i>phaC</i>	El presente documento
pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-esat6	Derivado de pET-14b que contiene fragmento <i>SpeI</i> genes <i>cfp10-conector-rv3615c</i> fusionado al extremo 5' de <i>phaC</i> y fragmento <i>XhoI/BamHI</i> gen <i>esat6</i> fusionado al extremo 3' de <i>phaC</i> mediante una secuencia conectora	El presente documento
PMCS69	Cmr; promotor T7, derivado de pBBR1MCS que contienen los genes <i>phaA</i> y <i>phaB</i> de <i>C. necator</i> co-lineales a promotor <i>lac</i>	(Amara <i>et al.</i> , 2003)
pUC57-esat6	Vector de clonación, origen ColE1, Apr, fragmento <i>XhoI/BamHI</i> gen <i>ESAT6</i>	El presente documento

Tetr, resistencia a tetraciclina
Apr, resistencia a ampicilina
Cmr, resistencia a Cloranfenicol

TABLA 2. Cebadores

Nombre del cebador	Sitio de restricción (subrayado)	Secuencia de 5' a 3'	SEQ ID NO:
CFP10_fwd	<i>NdeI</i>	AACATATGGCA GAAATGAAAAC GGATGCGGC	16
CFP10_rev	<i>NdeI</i>	TTCATATGGAA ACCCATTIGAG AGCTCAGAGCC	17
Rv3615c_fwd	<i>NdeI</i>	AACATATGACC GAAAACCTGAC GGTTCAGCCGG	18
rev	<i>NdeI</i>	TTCATATGGGT GAACAGGCCGT CGATTGCTTTA C	19
ESAT6_fwd	<i>NdeI</i>	AACATATGACG GAACAACAATG GAACTTGTCTG GC	20
ESAT6_rev	<i>NdeI</i>	TTCATATGTGC GAACATGCCCG TGACATTGCCT TC	21

Para presentar los genes de TB en las superficies de las partículas de poliéster, los genes que codifican las secuencias de aminoácidos de ESAT-6 (véase la Tabla 3, SEQ ID NO: 1), CFP-10 (véase la Tabla 3, SEQ ID NO: 2), y RV3615c (véase la Tabla 3, SEQ ID NO: 3) se sintetizaron mediante DNA2.0 (CA, EUA) usando los cebadores de PCR identificados en la Tabla 2, optimizados para el uso de codones de *E. coli*. Se insertó un sitio de restricción *NdeI* en los extremos tanto 5' como 3' de cada gen.

TABLA 3. Secuencia de aminoácidos de antígenos de TB

Antígeno	Secuencia de AA	SEQ ID NO:
ESAT-6	MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDGKQSLTKLAA AWGGSGSEAYQGVQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQ AMASTEGNVTGMFA	1
CFP-10	MAEMKTDAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQG QWRGAAGTAAQAAVVRFQEAANKQKQELDEISTNIRQAGV QYSRADEEQQALSSQMGE	2
RV3615c	MTENLTVQPERLGVLAHHDNAAVDASSGVEAAAGLGESV AITHGPYCSQFNDTLNVYLTAHNALGSSLHTAGVDLAKSLRI AAKIYSEADEAWRKAIDGLFT	3

Los respectivos fragmentos *NdeI* sintetizados que codifican CFP-10, ESAT-6 o Rv3615c se insertaron en el plásmido pHAS-Ag85A-ESAT-6 (Parlane *et al.*, 2009) que, después de hidrólisis con *NdeI*, dio como resultado los plásmidos pET-14b cfp10-phaC, pET-14b Rv3615c-phaC y pET-14b Esat-6-PhaC, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas con codones optimizados que codifican el polipéptido de fusión CFP10-PhaC, el polipéptido de fusión Rv3615c-PhaC y el polipéptido de fusión ESAT6-PhaC, se representan en el presente documento como SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, y SEQ ID NO: 14, respectivamente.

El constructo de plásmido, pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-esat6, que codifica los tres genes del antígeno de TB se prepararon como sigue a continuación. La secuencia nucleotídica con codones optimizados que codifica el polipéptido de fusión CFP10-conector-Rv3615c-PhaC-ESAT6 se presenta en el presente documento como SEQ ID NO: 15.

El fragmento *XhoI-BamHI* que codifica el gen *esat6* se subclonó en pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-Ma1E hidrolizado con *XhoI-BamHI* para generar el plásmido final, pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-esat6, que contenía los tres genes de antígeno de TB.

Una representación esquemática de los plásmidos usados para presentar los antígenos de TB en la superficie de las partículas de poliéster se muestra en la Figura 1. Se muestran los constructos de ADN que contienen un gen de TB, pET-14b cfp10-phaC (Figura 1A), pET-14b rv3615c-phaC (Figura 1B), y pET-14b esat6-phaC (Figura 1C), y tres genes de TB, pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-esat6 (Figura 1D). La secuencia de aminoácidos del polipéptido que comprende estos tres antígenos de TB codificado por pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-esat6 se presenta en la Tabla 4 posterior como SEQ ID NO: 10.

Producción y aislamiento de partículas de poliéster. Las partículas de poliéster que presentan proteínas micobacterianas o solo partículas de control se produjeron en *E. coli* BL21 (DE3) como se ha descrito anteriormente (Parlane *et al.*, 2009).

El resumen, se cultivaron cepas de *E. Coli* a 37 °C en LB y se indujeron con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM para inducir proteína y se cultivaron durante 48 horas más a 25 °C. La presencia de inclusiones de poliéster se observó por tinción de las células con el colorante lipófilo fluorescente Rojo Nilo y usando microscopía de fluorescencia (Spiekermann *et al.*, 1999). Se empleó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para evaluar la forma y tamaño de la inclusión de poliéster, así como el número por célula. Los gránulos de poliéster se aislaron como se ha descrito anteriormente (Peters *et al.*, 2008). Se añadieron inhibidores de proteasa (Roche, EUA) según necesidades. Para confirmar la funcionalidad de la enzima PhaC, se determinó cuantitativamente el contenido de poliéster de las células por cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS) (Bramd; *et al.* 1988).

Análisis de proteínas unidas a las partículas de poliéster. Las proteínas unidas a las partículas de poliéster se separaron mediante SDS-PAGE usando geles de poliácridamida al 8 % y tinción con azul de Coomassie. Las proteínas

de interés se escindieron de los geles y se sometieron a determinación de huella peptídica triptica usando desorción/ionización láser asistida por matriz con detección mediante espectrometría de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF/MS) (Jahns *et al.*, 2009).

- 5 **Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).** La actividad específica de las partículas que presentan los antígenos de TB se determinó por ELISA como se ha descrito anteriormente (Parlane *et al.*, 2009). En resumen, una placa de microvaloración de alta capacidad de unión (Greiner Bio-one) se revistió durante una noche a 4 °C con 100 µl de partículas de PHB purificadas que presentan proteínas de TB o partículas de control, diluidas en tampón de revestimiento de carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (Sigma-Aldrich) a concentraciones proteicas que varían de 100 µg/ml a 0,05 µg/ml en diluciones seriadas. Como controles positivos, las placas de microvaloración también se revistieron durante una noche a 4 °C con 100 µl de un antígeno individual libre o una mezcla de los tres antígenos de TB individuales, amablemente proporcionado por el Dr. H. M. 183 Vordermeier (AHVLA, RU), diluido en tampón de revestimiento de carbonato-bicarbonato, a concentraciones proteicas que varían de 1 µg/ml a 0,125 µg/ml. Las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween 20 (PBST) al 0,05 % (vol/vol) y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 3 % (p/vol) (BSA) durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBST y se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón frente a CFP-10 o ESAT-6 (ambos anticuerpos procedentes de Abeam, Cambridge, RU) o sueros policlonales de conejo producidos frente a Rv3615c recombinante (AgResearch, Hamilton, NZ) o suero preinmune de conejo durante 1 h a temperatura ambiente. El antisero de conejo frente a Rv3615c se produjo inmunizando un conejo con 100 µg de Rv3615c mezclados en adyuvante incompleto de Freund (Sigma) y revacunando el conejo dos veces a intervalos de 3 semanas. Después de lavar con PBST, las placas se incubaron durante 1 hora con conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa (HRP) o conjugado anti-conejo HRP. Después de lavado adicional, se añadió el sustrato o-fenilendiamina (OPD) (Abbott Diagnostics, IL, EUA) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 0,5 N, y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de microvaloración ELx808iu Ultra (BIO-TEK Instruments Inc., EUA) (Jahns *et al.*, 2008). Los resultados se expresaron como unidades de densidad óptica a 490 nm.

- Ensayo cutáneo de TB en ganado.** Se infectaron experimentalmente diez cabezas de ganado frisón cruzado de 15 meses de edad con una dosis de aproximadamente 5×10^3 unidades formadoras de colonias de *M. bovis* por vía intratraqueal como se ha descrito anteriormente (Buddle *et al.*, 1995). Estos animales se mantuvieron en pastos en una unidad de aislamiento que estaba completamente separada de los prados donde pastaban las 14 cabezas de ganado de control de edad y raza equivalentes. Todo el ganado provenía de rebaños sin TB ubicado en regiones de Nueva Zelanda sin TB. Antes de la inoculación de *M. bovis*, el ganado fue negativo a ensayo de interferón gamma (ensayo BOVIGAM™; Phonics, Suiza) para TB bovina y el ganado de control fue negativo en este ensayo durante todo el estudio usando la interpretación estándar que se ha descrito anteriormente (Buddle *et al.*, 2009). Después de 27 semanas de la infección por *M. bovis*, el ganado de control e infectado se sometió a un ensayo cutáneo cervical comparativo que comparaba las respuestas a las partículas de polímero de triple antígeno de TB y las partículas de polímero de control con las de PPD de *M. bovis* (PPD-B; 5.000 UI/inyección de 0,1 ml) y *M. avium* (PPD-A; 2.500 UI/inyección de 0,1 ml; AsureQuality, Upper Hutt, Nueva Zelanda). El inóculo de 0,1 ml del reactivo de partículas de poliéster de TB contenía 3,3 µg de proteína de fusión, que comprendía 0,9 µg de las proteínas micobacterianas y 2,4 µg de proteína PhaC, mezclados en PBS, mientras que las partículas de poliéster de control contenían 3,3 µg de proteína PhaC en PBS. Se midió el grosor de piel en el sitio de la inyección con calibradores inmediatamente antes de la inyección y 72 h después, y los resultados se expresaron como el cambio del grosor de piel (mm). Los animales infectados con *M. bovis* se sacrificaron y se les practicó autopsia 28 semanas después de la infección. Se identificaron las lesiones tuberculosas habituales encontradas en animales infectados naturalmente en los pulmones y/o ganglios linfáticos pulmonares de los animales y se cultivó *M. bovis* a partir de las lesiones de todos estos animales usando el método BACTEC y confirmación por AccuProbe. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité de ética animal de AgResearch Grasslands.

- Análisis estadístico.** Se usó el ensayo de Kruskal-Wallis para comparar las respuestas *in vitro* por ELISA a la actividad antigénica de las partículas y el análisis de la reactividad cruzada de los antisueros con antígenos heterólogos. Las respuestas del ensayo cutáneo a PPD-B y las partículas de triple antígeno de TB se compararon por ANOVA. La correlación entre las respuestas del ensayo cutáneo para PPB bovino y la partícula de triple antígeno en el ganado infectado experimentalmente se realizó usando el ensayo de correlación de rango de Spearman. Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete "agricolae" en R.3.0.1. y se indicó significación estadística cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

- Producción y caracterización de partículas de poliéster que presentan antígenos micobacterianos.** Se construyeron plásmidos que codifican PhaC y que contenían uno cualquiera o los tres genes *esat-6*, *cfp-10* o *Rv3615c* como se describe en Materiales y métodos. Las composiciones modulares de los diversos genes híbridos y proteínas de fusión codificadas se indican en la Figura 1. Se construyeron genes híbridos para codificar proteínas de fusión que median la producción intracelular de partículas de poliéster que presenten los antígenos de TB individuales o los tres antígenos de TB. Los respectivos plásmidos se introdujeron en células de *E. coli* que alojan el plásmido pMCS69 que media la provisión de precursores para las síntesis de poliésteres. Se cultivaron células de *E. coli* que albergan los diversos plásmidos para producir partículas de poliéster que presentan uno o tres antígenos de TB. La presencia de

partículas de poliéster intracelulares en las células de *E. coli* se indicó mediante microscopía de fluorescencia usando tinción con rojo Nilo (Figura 2). La microscopía electrónica de transmisión mostró la formación de partículas de poliéster mediada por las respectivas proteínas de fusión en el interior de *E. coli* recombinante (Figura 3). El análisis por GC-MS mostró que las células acumulaban el poliéster, polihidroxibutirato, contribuyendo en un 31,5 %, 10 %, 30 %, 14,3 %, y 40 % del peso seco celular cuando estaban presentes los genes que codifican PhaC, CFP10-PhaC, Rv3615c-PhaC, ESAT6-PhaC, y CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6, respectivamente.

Presentación de proteína de fusión de antígeno PhaC recombinante en partículas de poliéster. Para someter a ensayo si las proteínas de fusión recombinantes estaban inmovilizadas en partículas de poliéster o las proteínas eran susceptibles a la degradación proteolítica, se realizó SDS-PAGE para analizar el perfil proteico de las partículas de poliéster. Se observaron bandas proteicas dominantes que correspondían a proteínas con masas moleculares teóricas de 63 kDa para PhaC, 69 kDa para la fusión PhaC-ESAT-6, 73 kDa para CFP10-PhaC, 74 kDa para PhaC-Rv3615c y 90 kDa para CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6 (Figura 4). Además, estas cuatro proteínas de fusión (CFP10-PhaC (SEQ ID NO: 7), Rv3615c-PhaC (SEQ ID NO: 8), PhaC-ESAT6 (SEQ ID NO: 9), y CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6 (SEQ ID NO: 10)) se identificaron por determinación de huella peptídica triptica usando MALDI-TOF/MS (Tabla 4). El análisis por densitometría de SDS-PAGE mostró que PhaC suponía un 20 % de las proteínas totales en la fracción de PhaC; CFP10-PhaC, Rv3615c-PhaC, PhaC-ESAT6 y CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6 suponían aproximadamente un 26 % de las proteínas totales en su correspondiente fracción de partículas.

Tabla 4. Fragmentos peptídicos identificados de proteína de fusión de TB analizada por MALDI-TOF/MS

Proteína/secuencia proteica	Fragmentos peptídicos asignados a las diversas regiones proteicas
CFP10-PhaC (MW: 75,2 kDa)	
MAEMKTDAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQ GQWRGAAGTAAQAAVVRFQEAANKQKQELDEISTNIRQA GVQYSRADEEQQALSSQMGMFHMATGKGAAASTQEGKS QPFKVTPGFPDPATWLEWSRQWQGTEGNHAAASGIPGL DALAGVKIAPAQLGDIQQRYSKDFSAWQAMAEGKAEA TGPLHRRFAGDAWRTNLPYRFAAAFYLLNARALTELAD AVEADAKTRQRIRFAISQWVDAMSPANFLATNPEAQRLLI ESGGESLRAGVRNMEDLTRGKISQTDESAFEVGRNVAV TEGAVVFENEYFQLLQYKPLTDKVHARPLLMVPPCINKYY ILDLPESLVRHVVEQGHTVFLVSWRNPDSMAGSTWD DYIEHAAIRAIEVARDISGQDKINVLGFCVGGTIVSTALAV LAARGEHPAASVTLLTLLDFADTGILDVVFDEGHVQLRE ATLGGGAGAPCALLRGLLEANTFSFLRPNDLVWNYVVDN YLKGNTVPFPDLLFWNGDATNLPGPWYCWYLRHTYLN ELKVPGLTVCGVPVDLASIDVPTYIYGSREDHIVPWTA YASTALLANKLRFVLGASGHIAGVINPPAKNKRSHWTND ALPESPQQWLAGAIEHHGSWWPDWTAWLAGQAGAKRA APANYGNARYRAIEPAPGRYVKAKA [SEQ ID NO: 7]	CFP10: A2-R20, T27-R57, Q78-R85 PhaC: V122-R137, I164-R175, D179-R209, F216-R226, F247-R281, I296-R308, Y351-R400, I414-K514, L557-K599, F602-K619, S623-K663, A665-R674
RV3615C-PhaC (MW: 75,2 kDa)	

(continuación)

Proteína/secuencia proteica	Fragmentos peptídicos asignados a las diversas regiones proteicas
RV3615C-PhaC (MW: 75,2 kDa) MTENLTVQPERLGV LASHHDNA AVDASSGVEAAAGLGES VAITHGPYCSQFNDTLNVYLTAHNALGSSLHTAGVDLAKS LRIAAKIYSEADEAWRKAIDGLFTHMATGKGAAASTQEG KSQPFKVTGPFDPATWLEWSRQWQGTEGNHAAASGIP GLDALAGVKIAPAQLGDIQQRYMKDFSALWQAMAEGKA EATGPLHDDRFAAGDAWRTNLPYRFAAAFYLLNARALTEL ADAVEADAKTRQRIRFAISQWVDAMSPANFLATNPEAQR LLIESGGESLRAGVRNMEDLTRGKISQTDESAFEVGRNV AVTEGAVVFENEYFQLLQYKPLTDKVHARPLLMVPPCINK YYILDLQPESSLVRHVVEQGHTVFLVSWRNPDASMAGST WDDYIEHAAIRAIEVARDISGQDKINVLGFCVGGTIVSTAL AVLAARGEHPAASVTLLTLLDFADTGILDV FVDEGHVQL REATLGGGAGAPCALLRGLELANTFSFLRPNDLVWNYVV DNYLKGNTVPFDFLLFWNGDATNLPGPWYCWYLRHTYL QNELKVPGLTVCGVPVDLASIDVPTYIYGSREDHIVPWT AAYASTALLANKLRFVLGASGHIAGVINPPAKNKRSHWT NDALPESPQQWLAGAIEHHGSWWPDWTAWLAGQAGAK RAAPANYGNARYRAIEPAPGRYVKAKA [SEQ ID NO: 8]	RV3615C: T2-R11, 186-K96 PhaC: V125-R140, I167-R178, D182- R212, F219-R229, F250-R284, I299- R311, Y354-R403, I417-K517, L560- K602, F605-K622, S626-K666, A668- R677
ESAT6-PhaC (MW: 74,3 kDa) MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGKQSLTKLA AAWGGSGSEAYQGVQKWDATATELNNALQNLARTISE AGQAMASTEGNVTGMFAHMATGKGAAASTQEGKSQPFK VTPGPFDPATWLEWSRQWQGTEGNHAAASGIPGLDALA GVKIAPAQLGDIQQRYMKDFSALWQAMAEGKAEATGPL HDRRFAGDAWRTNLPYRFAAAFYLLNARALTELADAVEA DAKTRQRIRFAISQWVDAMSPANFLATNPEAQRLLIESGG ESLRAGVRNMEDLTRGKISQTDESAFEVGRNVAVTEGA VVFENEYFQLLQYKPLTDKVHARPLLMVPPCINKYYILDL QPESSLVRHVVEQGHTVFLVSWRNPDASMAGSTWDDYIE HAAIRAIEVARDISGQDKINVLGFCVGGTIVSTALAVLAAR GEHPAASVTLLTLLDFADTGILDV FVDEGHVQLREATLG GGAGAPCALLRGLELANTFSFLRPNDLVWNYVVDNYLKG NTPVPFDFLLFWNGDATNLPGPWYCWYLRHTYLLQNELKVP GKLTVCVPVDLASIDVPTYIYGSREDHIVPWTAAAYASTA LLANKLRFVLGASGHIAGVINPPAKNKRSHWTNDALPESP QQWLAGAIEHHGSWWPDWTAWLAGQAGAKRAAPANYG NARYRAIEPAPGRYVKAKA [SEQ ID NO: 9]	ESAT6: M1-K33, W58-R74 PhaC: V117-R132, I159-R170, D174- R204, F211-K235, F242-R276, I291- R303, Y346-R395, I409-K509, L552- K594, F597-K614, S618-K658, A660- R669
CFP10-RV3615C-PhaC-ESAT6 (MW: 98,1 kDa)	

(continuación)

Proteína/secuencia proteica	Fragmentos peptídicos asignados a las diversas regiones proteicas
CFP10-RV3615C-PhaC-ESAT6 (MW: 98,1 kDa)	
MAEMKTDAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQ GQWRGAAGTAAQAAVVRFQEAANKQKQELDEISTNIRQA GVQYSRADEEQQALSSQMFGPGGGGGPMTENLTVQPE RLGVLASHHDNAAVDASSGVEAAAGLGESVAITHGPYCS QFNDTLNVYLTAHNALGSSLHTAGVDLAKSLRIA AKIYSE ADEAWRK AIDGLFTTSATGKGAAASTQEGKSQPFKVTGP FDPATWLEWSRQWQGTEGNHAAAASGIPGLDALAGVKIA PAQLGDIQQR YM KDFSALWQAMAEGKAEATGPLHDDR AGDAWRTNLPYRFAAAFYLLNARALTELADAVEADAKT RQRIRFAISQWVDAMSPANFLATNPEAQRLIESGGESLRA GVRNM MEDLTRGKISQTDESAFEVGRNVAVTEGAVVFEN EYFQLLQYKPLTDKVHARPLLMVPPCINKYYILDLQPESSL	CFP10: A2-R20, T27-R57, Q78-R85 RV3615C: T108-R117, I192-K202 PhaC: V233-R248, I275-R286, D290- R320, F327-R337, F358-R392, I407- R419, Y462-R511, I525-K625, L668- K710, F713-K730, S734-K774, A776- R785 ESAT6: W877-R893
VRHVVEQGHTVFLVSWRNP DASMAGSTWDDYIEHAAIRA IEVARDISGQDKINVLGFCVGGTIVSTALAVLAARGEHPAA SVTLLTTLDFADTGILDV FVDEGHVQLREATLGGGAGAP CALLRGLELANTFSFLRPNDLVWNYVVDNYLKGNTPVF DLLFWNGDATNLPGPWYCWYLRHTYLQNELKVP GKLT CGVPVDLASIDVPTYIYGSREDHIVPWTAA YASTALLANK LRFVLGASGHIAGVINPPAKNKRSHWTNDALPESPQQWLA GAIEHHGSWWPDWTAWLAGQAGAKRAAPANYGNARYR AIEPAPGRYVKAKAHMVLA VAIDKRGGGGGLEMT EQQW NFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDEGKQSLTKLAAAWGGS GSEAYQGVQKWDATATELNALQNLARTISEAGQAMA STEGNVTGMFA [SEQ ID NO: 10]	

También se evaluó la degradación proteica. Como se muestra en la Figura 4, las muestras del panel izquierdo no se trataron con inhibidor de proteasas durante el aislamiento de las partículas. Las proteínas de fusión Rv3615c-PhaC y PhaC-ESAT6 fueron estables y no mostraron degradación (Carriles 3 y 4). Sin embargo, hubo un nivel aumentado de degradación proteica en las proteínas de fusión CFP10-PhaC y CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6 (Carriles 5 y 6). Las muestras del panel de la derecha se trataron con inhibidor de proteasas durante la extracción de las partículas. La degradación de estas dos proteínas de fusión recombinantes que contenían CFP10 se inhibió significativamente con inhibidor de proteasas (Carriles 9 y 10). Esto sugirió que las proteínas de fusión recombinantes que contenían CFP10 fueron sensibles a la digestión con proteasa durante el aislamiento y purificación de las partículas (Figura 4). En la Figura 5 se proporciona una vista esquemática de las partículas de poliéster que presentan triple antígeno.

Evaluación *in vitro* de reactividad de antígeno de TB.

Se evaluó el uso de partículas de poliéster que presentan uno o más antígenos de TB como reactivos de diagnóstico de TB. Se usó ELISA para someter a ensayo la accesibilidad e integridad estructural de los antígenos de TB presentados en la superficie de las partículas de poliéster *in vitro* (Figura 6).

En el ensayo de reactividad de los antígenos de TB inmovilizados (Figura 6A), el control negativo fue las partículas de poliéster que portan solo PhaC. Los controles positivos fueron antígenos individuales libres y una mezcla de los tres antígenos (CFP10, Rv3615c, y ESAT6). Las partículas que portan los diversos antígenos de TB se analizaron. Se observó una unión de anticuerpo muy baja en el control negativo, que indica que las partículas de poliéster que no presentan ningún antígeno de TB no presentan sitios de unión para los tres anticuerpos (anti-CFP10, anti-Rv3615c, y anti-ESAT6). Por el contrario, hubo un aumento drástico en la unión de anticuerpo en los controles positivos. En particular, la unión de anticuerpo del triple antígeno de TB inmovilizado fue significativamente mayor que la de los antígenos presentados individualmente; esto también se observó con el triple antígeno de TB soluble y los antígenos de TB individuales solubles (Figura 6A, $P < 0,05$).

Además, el experimento de control negativo que usa suero de conejo preinmune en lugar de los tres anticuerpos específicos mostró que todas las muestras tienen unión de anticuerpo muy baja al suelo de control negativo (Figura 6B). Además, el ensayo de reactividad cruzada mostró que la unión de anticuerpo de antígenos de TB fue específica

y la unión de anticuerpo de antígenos de TB fue significativamente mayor cuando se aplicó el correspondiente anticuerpo en comparación con la de los antígenos heterólogos (Figura 6C, $P < 0,05$).

Evaluación *in vitro* de reactividad de antígeno de TB

Para someter a ensayo la inmunogenicidad y especificidad de las partículas que presentan triple antígeno de TB *in vivo*, se inyectaron las partículas respectivas por vía intradérmica al ganado. Se administraron cuatro reactivos, partículas que presentan el triple antígeno de TB, partículas de control, PPD-B, y PPD-A para el ensayo cutáneo de TB (Figura 7). Todos los animales infectados experimentalmente respondieron positivamente en el ensayo cutáneo (> 1 mm de aumento de grosor en ensayo cutáneo) a PPD-B solo y, además, todas las respuestas a PPD-B fueron mayores que las de PPD-A.

Las respuestas a 0,9 µg/inyección de proteínas de fusión de antígeno de TB presentadas en partículas de polímero también fueron positivas para todos los animales y no hubo diferencias significativas en las respuestas entre PPD-B y partículas de poliéster de TB ($P < 0,05$). Dos animales produjeron una respuesta débil (2,5 mm de aumento del grosor de piel a las partículas de poliéster de control. Por el contrario, cuando se sometieron a ensayo estos reactivos de ensayo cutáneo en 14 cabezas de ganado de edad equivalente, sensibilizadas naturalmente a micobacterias ambientales, ninguna respondió positivamente a los reactivos de partículas de poliéster de TB, mientras que 11 respondieron positivamente a PPD-A y tres a PPD-B. Las respuestas de ensayo cutáneo a PPD-B y las partículas de triple antígeno se compararon en el ganado infectado experimentalmente con *M. bovis*. Aunque el ganado respondió a las dos preparaciones antigénicas diferentes, no hubo ninguna correlación entre las magnitudes de estas respuestas para animales individuales.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue producir proteínas de fusión que mediaran la formación de partículas de poliéster que presentan antígenos de TB seleccionados (CFP10, ESAT6, Rv3615c) adecuados para aplicaciones de ensayo cutáneo de TB. Los solicitantes anticipan que la presentación de antígenos de TB seleccionados en la superficie de partículas de poliéster inmunogénicas es importante para la sensibilidad y especificidad del ensayo cutáneo de TB.

Como se indica en la Figura 1, se construyeron diversos genes híbridos que codifican la enzima formadora de partícula de poliéster, PhaC, fusionados a uno solo y tres antígenos de TB. Los cuatro genes híbridos mediaron la producción de partículas de poliéster en *E. coli* recombinante como se evaluó mediante microscopía de fluorescencia (Figura 2), TEM (Figura 3) y GC-MS. Estos datos sugirieron que el dominio de PhaC permaneció activo en todas las proteínas de fusión, catalizando la síntesis del poliéster y mediando la formación de partículas. La identidad de las proteínas de fusión se obtuvo mediante análisis por SDS-PAGE combinado con análisis de huella peptídica triptica usando MALDI-TOF/MS (Jahns *et al.*, 2009) (Figuras 4 y 5, Tabla 3). Se describió que las proteínas de fusión unidas a la superficie de las partículas de poliéster que contenían el antígeno CFP10 eran susceptibles a la degradación de proteasa que podía evitarse mediante la adición de inhibidores de proteasas durante el aislamiento de las partículas (Figura 4).

La presentación superficial en partículas de poliéster del respectivo antígeno de TB fusionado a PhaC se investigó usando anticuerpos específicos anti-antígeno de TB en combinación con ELISA (Figura 6A). La evaluación de la reactividad cruzada de los anticuerpos específicos anti-antígeno de TB así como la evaluación de posibles uniones no específicas de anticuerpo usando sueros preinmunes sugirieron que los anticuerpos anti-antígeno de TB fueron altamente específicos y las partículas que presentan antígeno no se unieron no específicamente a los anticuerpos (Figura 6B, C).

Se descubrió que diversas partículas presentan los antígenos de TB respectivos. De forma interesante, las partículas que presentan triple antígeno de TB mostraron mayor reactividad con los anticuerpos específicos cuando se compararon con las respectivas partículas que presentan antígeno individual de TB. Esto no se debió a niveles variables de expresión, dado que se detectaron cantidades similares de proteínas de fusión por masa de partícula (Figura 4). Por tanto, los solicitantes creen, sin el deseo de quedar unidos a teoría alguna, que la diferente disposición de los antígenos en la proteína de fusión de antígeno triple podría haber contribuido a mejorar la accesibilidad del respectivo anticuerpo específico. La alta reactividad del reactivo que contiene los tres antígenos de TB inmovilizados tampoco está causada por reactividad cruzada de anticuerpos. Cada anticuerpo solo interactúa específicamente con el correspondiente antígeno de TB (Figura 6C).

La partícula de poliéster que contiene el antígeno triple de TB se evaluó como reactivo de ensayo cutáneo de TB debido a su alta reactividad con anticuerpos específicos. Además, los solicitantes creen, sino el deseo de quedar unidos a teoría alguna, que la fabricación de un solo tipo de partícula de poliéster de múltiples antígenos será una estrategia rentable preferente para producir varias partículas antigénicas individuales. También existe la demanda de un reactivo de diagnóstico específico que distinga individuos infectados por TB de individuos sensibilizados por cepas ambientales o vacunados con BCG.

Se usa un ensayo cutáneo cervical comparativo en numerosos países para el diagnóstico de TB bovina ya que tanto PPD-A como PPD-B contienen antígenos comunes a numerosas micobacterias ambientales y una respuesta más

fuerte frente a PPD-B en comparación con la de PPD-A es indicativa de infección con *M. bovis* (Monaghan *et al.*, 1994). Los antígenos de TB, CFP10, Rv5c, y ESAT6 (27) se encuentran en miembros del complejo patogénico de *M. tuberculosis* que incluye *M. bovis* y por tanto la respuestas a estos antígenos indicarían una respuesta más específica en comparación con la de PPD-B, que contiene una mezcla cruda de antígenos.

En este estudio de ensayo cutáneo de TB (Figura 7), los tres reactivos (antígenos de TB), PPD-A, PPD-B, y el reactivo de partícula de triple antígeno de TB, fueron capaces de identificar ganado infectado con TB con una alta sensibilidad (Figura 7A). Sin embargo, el reactivo de partícula que contiene el triple antígeno de TB fue más preciso en la identificación de ganado no infectado, expuesto naturalmente a micobacterias ambientales, mientras que PPD-A y PPD-B dieron resultados falsos positivos (Figura 7).

Basándose en estos resultados, los solicitantes creen que CFP10-Rv3615c-ESAT6 inmovilizado en la superficie de partícula de poliéster proporciona un reactivo de diagnóstico más sensible, específico y rentable cuando se compara con otros ensayos, incluyendo antígenos libres.

Los solicitantes creen además, nuevamente sin el deseo de quedar unidos a teoría alguna, que las partículas de poliéster que presentan triple antígeno de TB también tienen utilidad en el diagnóstico de TB humana, causada principalmente por *M. tuberculosis*. De hecho, CFP10, ESAT6, y Rv3615c de *M. tuberculosis* tienen una fuerte reactividad cruzada con las proteínas ortólogas de *M. bovis*, un agente causante de TB bovina (Millington *et al.*, 2011; Waters *et al.*, 2004), y estos agentes son inmunodominantes en infección por TB humana tanto activa como latente (Millington *et al.*, 2011; Sidders *et al.*, 2008).

Este reactivo de diagnóstico de TB de partículas de poliéster que comprende triple antígeno tiene alta especificidad y sensibilidad, permitiendo un cribado rápido y preciso de sujetos infectados con TB. Además, el ensayo cutáneo de TB basado en partículas de poliéster tiene el potencial de diferenciar entre sujetos infectados y vacunados con BCG.

Este ejemplo demuestra que se han preparado partículas de poliéster bacterianas para presentar simultáneamente tres antígenos específicos de TB y que estas partículas recombinantes muestran un rendimiento específico y sensible como reactivos de ensayo cutáneo de TB. Este ensayo cutáneo mejorado mostró menos resultados falsos positivos en sujetos cuando se compara con los creativos de ensayo cutáneo comerciales y que a su vez reduce una pérdida económica significativa para el usuario final.

Ejemplo 2 - Producción de partículas de polímero antigénicas tetravalentes

Este ejemplo describe la preparación de partículas de polímero tetravalentes de la invención que comprenden 4 antígenos de TB para uso como reactivos de diagnóstico para tuberculosis, incluyendo la construcción y expresión del plásmido, pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-conector-esat6-conector-rv3020c.

MATERIALES Y MÉTODOS

La construcción de pET-14b cfp10-conector-rv3615c-phaC-conector-esat6-conector-rv3020c se representa en la Figura 8. En resumen, el fragmento de ADN que codifica esat6-rv3020c se aisló de pUC57-esat6-rv3020c mediante una digestión de restricción con XhoI y BamHI, seguido de separación de fragmentos de ADN usando electroforesis en gel de agarosa y purificación en gel. El gen esat6-rv3020c (SEQ ID NO: 11) estaba ligado al vector linealizado pET-14b cfp10-rv3615c-phaC-conector, generado por digestión de restricción con XhoI y BamHI, usando ADN ligasa de T4 para generar el plásmido final, pET-14b cfp10-rv3615c-phaC-esat6-rv3020c.

Expresión in vivo

El plásmido pET-14b cfp10-rv3615c-phaC-esat6-rv3020c se expresó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Se realizó análisis por SDS-PAGE del lisado crudo, junto con muestras tomadas de diversas etapas en la purificación de la partícula de polímero como se ha descrito anteriormente (Peters *et al.*, 2008). Nuevamente, se usó análisis por MALDI-TOF para confirmar la presencia de cada uno de los diversos componentes proteicos en el polipéptido de fusión expresado.

RESULTADOS

La Figura 9 muestra el análisis por SDS-PAGE del lisado crudo, junto con muestras tomadas de diversas etapas en la purificación de las partículas de polímero. Los pesos moleculares observados coinciden bien con el peso molecular calculado.

Los resultados de determinación de huella peptídica triptica usando MALDI-TOF/MS se muestran en la siguiente Tabla 5. Como se muestra en la misma, se identificaron cada una de las cinco proteínas componentes que comprenden el polipéptido de fusión CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6-Rv3020c (SEQ ID NO: 22), que se subrayan.

Tabla 5. Fragmentos peptídicos identificados de una proteína de fusión recombinante que contiene cuatro antígenos de TB analizada por MALDI-TOF/MS

Proteína/secuencia proteica	Fragmentos peptídicos asignados a las diversas regiones proteicas
CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6-Rv3020c (MW: 109,4 kDa)	
<u>MAEMKTDAAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTA</u> <u>GSLOGQWRGAAGTAAQAAVVRFQEAANKQKQELDE</u> <u>ISTNIROAGVOYSRADEEOOOALSSOMGFGPGGGGG</u>	CFP10: T6-R20, T27-R57, A86-P102
<u>PMTENLTVQPERLGVLA SHHDNAAVDASSGVEAAAG</u> <u>LGESVAITHGPYCSQFNDTLNVYLTAHNALGSSLHTA</u> <u>GVDLAKSLRIA AKIYSEADEAWRK AIDGLFTTS</u>	Rv3615c: P108-R119, 1194-K204
<u>ATGKGAAASTQEGKSQPFKVTPGPFDPATWLEWSRQ</u> <u>WQGTEGN GHAAASGIPGLDALAGVKIAPAQLGDIQQ</u> <u>RYMKDFSALWQAMAEGKAEATGPLHDDRFA GD AWR</u> <u>TNLPYRFAAAFYLLNARALTELA DAVEADA KTRQ RIR</u> <u>FAISQWVDAMSPANFLATNPEAQRL LIESGGESLRAG</u> <u>VRNM MEDLTRGKISQTDES AFEVGRNVA VTEGAVVF</u> <u>ENEYFQL LQYKPLTDKVHARPLL MVPPCINKYYILD L</u> <u>QPESSLVRHVVEQGHTVFLVSWRNP DASMAGSTWD</u> <u>DYIEHAAIRAIEVAR DISGQDKINVLGFCVGGTIVSTAL</u> <u>AVLAARGEHPAASVTLLTLLDFADTGILDVFVDEGH</u> <u>VQLREATLGGGAGAPCALLRGLELANTFSFLRPNDLV</u> <u>WNYVVDNYLKGNTVPFDFLLFWNGDATNLPGPWYC</u> <u>WYLRHTYLQNELKVP GKLTVC GVPVDLASIDVPTIY</u> <u>GSREDHIVPWTAAAYASTALLANKLR FVLGASGHIAGV</u> <u>INPPAKNKRSHWTNDALPESPQQWLAGAIEHHG SWW</u> <u>PDWTAWLAGQAGAKRAAPANYGNARYRAIEPAPGR</u> <u>YVKAKAHMVLAV AIDKRGGGGGG</u>	PhaC: V233-R248, I275-R286, D290-K302, R313-R320, F327-R337, F358-R392, 1407-R419, Y462-R511, D518-K625, L668-K710, A776-R785, A801-R812
<u>LEMTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDEGKQS</u> <u>LTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKWDATATELNNALQ</u> <u>NLARTISEAGOAMASTE GNV TGMFAGGGGGG</u>	ESAT6: W877-R893
<u>MSLLDAHIPQLIASHTAFAAKAGLMRHTIGQAEQQA</u> <u>MSAQAFHQGESAAAFQGAHARFVAAA AKVNTLLDI</u> <u>AQANLGEAAGTYVAADAAAASSYTGF [SEQ ID NO:</u> <u>221</u>	Rv3020c: H946-R976

DISCUSIÓN

5 Este ejemplo estableció que las partículas de polímero que comprenden antígenos de TB multivalentes de la invención pudieron prepararse con éxito por expresión de un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido formador de partícula fusionado a cuatro antígenos de TB diferentes. Además, las partículas tetravalentes se purificaron para uso en la invención.

10

Ejemplo 3 - Evaluación de partículas de polímero de PHA tetravalentes como reactivos de diagnóstico

Este ejemplo describe la evaluación de partículas de polímero tetravalentes de la invención como reactivos de diagnóstico para tuberculosis. La estabilidad y eficacia de las partículas de polímero que comprenden antígenos de TB tetravalentes (TTPP) descritas en el Ejemplo 2 anterior se evaluaron en ensayos cutáneos de TB bovina.

15

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos usados en este estudio fueron los descritos en los Ejemplos 1 y 2 anteriores, con la adición

de lo siguiente.

Ensayos intradérmicos - diseño de estudio *in vivo*

- 5 Las composiciones de TTPP preparadas para evaluación intradérmica en los diversos estudios *in vivo* presentados en este Ejemplo se indican en las siguientes Tablas 6-10.

Tabla 6 - Composiciones para evaluación de respuesta a dosis/sensibilidad

Código de muestra	Formulación	dosis (µg de antígenos)	Comentarios
A1	PBS, Dextrano	3,00	dilución seriada 3 veces
A2	PBS, Dextrano	1,00	
A3	PBS, Dextrano	0,33	
A4	PBS, Dextrano	0,11	
A5	PBS, Dextrano	0,04	
A6	PBS, Dextrano	0,012	

10

Tabla 7 - Composiciones para evaluación de formulación

Código de muestra	Formulación	dosis (µg de antígenos)	Comentarios
C1	PBS, Dextrano	3,00	Alta
C2	PBS, Dextrano	0,11	Media
C3	PBS, Dextrano	0,012	Baja
C4	Etanol al 2 %	3,00	Alta
C5	Etanol al 2 %	0,11	Media
C6	Etanol al 2 %	0,012	Baja
C7	Tris 10 mM pH 8,5	3,00	Alta
C8	Tris 10 mM pH 8,5	0,11	Media
C9	Tris 10 mM pH 8,5	0,012	Baja

Tabla 8 - Composiciones para evaluación de estabilidad

Código de muestra	Formulación	dosis (µg de antígenos)	Temperatura de almacenamiento
B1	PBS, Dextrano	3	4 °C
B2	PBS, Dextrano	3	25 °C
B3	PBS, Dextrano	3	37 °C

Tabla 9 - Composiciones para evaluación de tamaño de partícula

Código de muestra	Formulación	dosis (µg de antígenos)	Tamaño
B4	Etanol al 2 %	3	Grande
B5	Etanol al 2 %	3	Medio
B6	Etanol al 2 %	3	Pequeño

15

Tabla 10 - Composiciones para evaluación de variabilidad de lote

Código de muestra	Formulación	dosis (µg de antígenos)	Lote de producción
D1	PBS, Dextrano	3	DS498
D2	PBS, Dextrano	3	DS504
D3	PBS, Dextrano	3	DS507
D4	PBS, Dextrano	3	DS560

(continuación)

Código de muestra	Formulación	dosis (μg de antígenos)	Lote de producción
D5	PBS, Dextrano	3	DS585
D6	PBS, Dextrano	3	DS625?

Administración intradérmica

Las composiciones de TTPP se administraron por vía intradérmica de acuerdo con el siguiente protocolo.

Se administraron inyecciones de 0,1 ml por vía intradérmica. Las jeringas se calibraron a 0,1 ml y la aguja de la jeringa tenía calibre 22-26 y 3-4 mm de longitud. Las jeringas se mantuvieron limpias y esterilizadas. Se evitó la contaminación de la jeringa con desinfectantes o alcohol, que puede interferir en el ensayo, y se tuvo cuidado de evitar la contaminación de los viales.

Sitio preferente de inyección:

Ganado: pliegue caudal para ensayo intradérmico individual y sitio cervical para ensayo cervical comparativo (CCT);

Venados: sitio cervical medio tanto para ensayo individual como para CCT. Cuando se usan los sitios cervicales, se requirió cuidado de recortar uniformemente el pelo cerca de la superficie de la piel (2 mm o menos de longitud media) antes de la inyección. El tamaño recomendado del área recortada fue de 10 x 10 cm para cada sitio de inyección.

Interpretación del ensayo:

El ensayo se leyó 72 horas después de la inyección.

Las reacciones del ensayo cutáneo se clasificaron de acuerdo con los requisitos de la Junta de Sanidad Animal de Nueva Zelanda y la Estrategia Nacional de Gestión de Plagas para TB Bovina.

RESULTADOS**Caracterización funcional *in vivo* de partículas de poliéster tetravalentes**

Respuesta a dosis. Las TTPP provocaron eficazmente una respuesta inmunitaria a dosis tan bajas como 0,11 μg , como se muestra en la siguiente Tabla 11 y en la Figura 10.

Tabla 11. Respuesta a dosis/sensibilidad a TTPP

Sujeto	Grosor de piel (mm)								
	Controles		Composiciones						
	Bovino (PPDB)	Aviar (PPDA)	BB	A1	A2	A3	A4	A5	C6
7258	11	5	8	4,5	8	5	7,5	0,5	1,5
7202	23,5	3	10,5	11	14	11,5	11,5	9,5	9,5
7203	15,5	3,5	10,5	9,5	7,5	8,5	8	5	3
7214	8,5	2,5	14,5	19	12	12	12	8,5	10,5
7225	21	5,5	11	14,5	13,5	15,5	12,5	7	10
7229	14	4,5	10	10	10	9	7,5	6	6
Mediana	14,75	4	10,5	10,5	11	10,25	9,75	6,5	7,75

Formulación. Las TTPP provocaron eficazmente una respuesta inmunitaria en cada una de las tres formulaciones (dextrano, etanol, Tris) sometida a ensayo, como se muestra en la siguiente Tabla 12 y en la Figura 11.

Tabla 12. Efecto de la formulación en la respuesta inmunológica a TTPP

Sujeto	Grosor de piel (mm)										
	Controles		Composiciones								
	Bovino (PPDB)	Aviar (PPDA)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
7223	21	8,5	18	9	6,5	13,5	11	6,5	13,5	12,5	6,5
7233	27,5	4	24	13	11,5	24,5	11,5	9	22	15,5	11
7201	22,5	5,5	15,5	7,5	6	16	9	5,5	10,5	7,5	6
7238	13	4,5	12,5	9	5	13	3,5	4	13,5	7,5	4
7224	25	3	12,5	13	6	17,5	9	2,5	14,5	5,5	2,5
7218	36	13,5	19,5	18,5	13	16,5	8,5	5	25	6,5	4
Mediana	23,75	5	16,75	11	6,25	16,25	9	5,25	14	7,5	5

Estabilidad/agregación. Las TTPP provocaron eficazmente una respuesta inmunitaria incluso después de almacenamiento de 6 meses a 4 °C, a 25 °C y a 37 °C (véanse la Tabla 13 y Figura 12). Además, la eficacia inmunológica no se vio perjudicada por agregación (80 um, 20 um, 16 um como se muestra en la siguiente Tabla 13 y en la Figura 12).

Tabla 13 - Evaluación de estabilidad/agregación de TTPP

Sujeto	Grosor de piel (mm)								
	Controles		Composiciones						
	Bovino (PPDB)	Aviar (PPDA)	BB	B1	B2	B3	80 um	20 um	16 um
7217	16,5	4,5	8	16	8	11,5	17,5	18	15,5
7205	21,5	5	9,5	16	13	13,5	17,5	5	3,5
7215	19,5	12	12	14	12	13,5	10,5	12,5	17
7208	19,5	7,5	11,5	7,5	7	12,5	8,5	12	14,5
7256	21,5	3,5	13,5	12	15,5	1,5	16	18,5	24
Mediana	19,5	5	11,5	14	12	12,5	16	12,5	15,5

- 10 *Tamaño de partícula.* La eficacia de las TTPP presentes en tamaños medios de partícula de ~16 um a 80 um en diferentes composiciones se evaluó en el presente documento, como se muestra en las Figuras 13A y 13B. No se observó ningún efecto significativo del tamaño de partícula en la sensibilidad o especificidad.

- 15 *Variabilidad de lote.* La eficacia inmunológica de TTPP fue muy consistente y mostró poca variabilidad de lote a lote, como se muestra en la siguiente Tabla 14 y en la Figura 14.

Tabla 14 - Variabilidad de lote de TTPP

Sujeto	Grosor de piel (mm)							
	Controles		Composiciones					
	Bovino (PPDB)	Aviar (PPDA)	D1	D2	D3	D4	D5	D6
7234	21	4,5	16,5	13,5	16,5	13,5	14,5	15,5
7244	23	7,5	15	14,5	13,5	14	17	22
7220	22	7,5	6,5	6	5,5	6	4	4,5
7240	25,5	5	22,5	18	22	19,5	19,5	21
7222	16,5	5	15	10,5	12	14,5	15	19
7263	26,5	7	20	17,5	19,5	22	21,5	20,5
Mediana	22,5	6	15,75	14	15	14,25	16	19,75

DISCUSIÓN

Este ejemplo estableció que las partículas de polímero que comprenden antígenos de TB tetravalentes de la invención provocaron eficazmente respuestas cutáneas diagnósticamente informativas en animales cuando estaban presentes en composiciones de diversas formulaciones, a dosis muy bajas, y que la eficacia no se vio afectada en gran medida por el tamaño o la agregación de las partículas, o el lote de producción.

Ejemplo 4 - Evaluación de partículas de polímero de PHA tetravalentes como reactivos de diagnóstico

Este ejemplo describe la evaluación adicional de TTPP de la invención como reactivos de diagnóstico para tuberculosis. La sensibilidad y selectividad de las TTPP de la invención se evaluó en ensayos bovinos de interferón gamma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos usados en este estudio fueron los descritos en el Ejemplo 3 anterior, con la adición de lo siguiente.

Se usó *E. coli* sin lipopolisacáridos (Clear Coli®, Lucigen) como hospedador de producción adicional para la preparación de TTPP.

Evaluación de reactividad antigénica de TB - Ensayos de IFN-γ.

Para someter a ensayo la sensibilidad y especificidad de las TTPP, se obtuvieron muestras de sangre de ganado infectado con TB y no infectado, y se sometieron a ensayo usando ELISA específico de IFN-γ en placas de múltiples pocillos y se midió la absorbancia a 450 nm.

Se sometieron a ensayo los siguientes reactivos: diversas diluciones de composiciones que comprenden TTPP expresadas en *E. coli* LPS+ y sin LPS (sin diluir, diluciones 1/4, 1/16, 1/64, y 1/256, que proporcionan 0,38 µg, 0,1 µg, 25 ng, 6 ng, y 1,5 ng de antígenos totales en el pocillo, respectivamente), partículas de control con solo PhaC (dilución 1/4, que proporciona la misma cantidad de proteína PhaC en el pocillo que las partículas de polímero tetravalentes sin diluir), péptido soluble ESAT6/CFP10 (4 µg de proteína en el pocillo), PPDB (20 µg de proteína en el pocillo), PPDA (20 µg de proteína en el pocillo), y control con solo tampón PBS.

Preparación de muestras de sangre y ensayo de IFN-γ

Los ensayos de IFN-γ usados en este ejemplo se realizaron usando consumibles estériles en condiciones asépticas, en muestras de sangre sin refrigerar, como sigue a continuación.

1. Mezclar la sangre suavemente por inversión 10 veces.
2. Añadir 1 ml de sangre reciente (< 6 h posterior a la recogida) en placas de 48 pocillos estériles.
3. Añadir 70 µl de partículas de antígenos de TB tetravalentes (~6 ng de antígenos totales por ml o, si se usa una dilución 4 veces, ~1,5 ng/ml), o controles (PBS, dH₂O, PPDA, PPDB, etc.).
4. Incubar a 37 °C durante 20 horas en aire humidificado con CO₂ al 5 %.
5. Centrifugar y recoger el plasma.
6. Medir los niveles de IFN-γ usando un kit de ELISA sándwich (Bovigam (Phonics AG)).

RESULTADOS

Como puede observarse en la siguiente Tabla 15 y en la Figura 15, se observaron respuestas considerables a IFN-γ en las muestras de sangre de animales infectados que recibieron solo 1,5 ng de antígenos totales cuando estaban presentes en las TTPP de la invención. Esta respuesta fue altamente selectiva, dado que se observaron respuestas negativas con las TTPP para todas, excepto las mayores concentraciones, las muestras de sangre de ganado no infectado, como se muestra en la Tabla 15 y la Figura 16. Se obtuvieron resultados similares independientemente de si las TTPP de la invención se expresaron en hospedadores de producción LPS+ o LPS-.

Tabla 15 - Partículas que comprenden antígenos de TB tetraivalentes - ensayos de IFN- γ

Controles		Absorbancia (450 nm)				
Grupo	Animal	PBS	PPDA	PPDB	ESAT6/CFP10	PhaC (1/4)
infectado	7202	0,007	0,357	0,668	0,454	0,404
	7203	0,004	0,295	0,660	0,428	0,080
	7205	0,019	1,155	2,620	2,034	1,183
	7208	0,029	1,169	3,099	2,465	0,251
	7214	0,009	3,385	2,788	2,086	0,601
	7215	0,017	1,593	0,895	0,249	0,110
	7217	0,005	0,641	1,949	1,465	0,300
	7225	0,015	0,573	1,739	1,738	1,061
	7229	0,185	1,859	1,468	1,419	0,997
	7256	0,837	2,628	3,930	3,957	3,129
	7258	0,631	3,218	3,773	3,554	0,774
no infectado	1 891	0,016	1,012	0,220	0,065	0,283
	2 227	0,010	0,242	0,031	0,016	0,161
	3 424	0,005	0,092	0,031	0,009	0,230
	4 422	0,011	0,119	0,041	0,007	0,145
	5 156	0,003	0,700	0,159	0,073	0,775
	6115	0,006	0,024	0,015	0,010	0,063
	7 904	0,009	0,050	0,023	0,008	0,055
	8 909	0,006	0,052	0,035	0,013	0,083
	9 425	0,006	0,007	0,007	0,005	0,030
	10 291	0,005	0,021	0,009	0,004	0,025

(continuación)

Partículas tetraivalentes		Absorbancia (450 nm)									
Grupo	Animal	LPS+1	LPS+ 1/4	LPS+ 1/16	LPS+ 1/64	LPS+ 1/256	LPS-1	LPS-1/4	LPS-1/16	LPS-1/64	LPS-1/256
Infectado	7202	1,620	1,546	1,173	0,705	0,424	1,990	1,917	1,415	1,112	0,491
	7203	1,110	1,134	0,987	0,568	0,441	1,068	0,961	1,022	0,897	0,558
	7205	3,349	3,361	2,979	2,406	1,592	3,398	3,148	2,749	2,968	1,585
	7208	3,365	3,742	3,359	2,873	1,740	3,675	3,784	3,675	3,601	3,011
	7214	3,958	3,793	3,851	3,314	2,911	3,650	3,617	3,055	3,234	2,753
	7215	0,259	0,306	0,312	0,268	0,137	1,474	0,468	0,365	0,337	0,241
	7217	3,053	3,579	2,986	1,664	1,086	3,805	3,710	2,441	3,957	2,138
	7225	2,582	2,790	2,538	1,959	1,353	3,122	2,729	2,092	2,426	1,689
	7229	1,288	1,763	2,038	1,364	0,814	1,029	0,778	1,298	1,908	1,647
	7256	3,457	3,659	3,709	3,560	2,956	3,874	3,808	3,846	3,890	3,818
	7258	2,884	2,890	3,313	2,800	2,451	3,655	3,648	3,609	3,720	3,619
no infectado	1 891	0,191	0,224	0,140	0,090	0,044	0,450	0,209	0,225	0,183	0,085
	2 227	0,121	0,117	0,051	0,029	0,023	0,206	0,135	0,087	0,081	0,043
	3 424	0,127	0,130	0,084	0,034	0,011	0,929	0,515	0,254	0,251	0,099
	4 422	0,072	0,048	0,027	0,017	0,013	0,047	0,032	0,022	0,010	0,003
	5 156	0,638	0,609	0,386	0,139	0,071	1,063	0,512	0,275	0,228	0,092
	6 115	0,053	0,122	0,124	0,052	0,011	0,140	0,064	0,072	0,099	0,054
	7 904	0,035	0,029	0,022	0,015	0,019	0,096	0,040	0,020	0,017	0,014
	8 909	0,066	0,052	0,035	0,018	0,011	0,092	0,050	0,026	0,012	0,012
	9 425	0,019	0,021	0,009	0,006	0,005	0,027	-0,003	0,010	0,007	0,006
	10 291	0,017	0,022	0,014	0,005	0,004	0,049	0,018	0,009	0,006	0,003

DISCUSIÓN

Este ejemplo estableció que las TTPP de la invención fueron altamente sensibles en ensayos de sangre de IFN- γ , provocando respuestas diagnósticamente informativas en muestras de animales infectados cuando estaban presentes en concentraciones extremadamente bajas (6 ng y 1,5 ng de antígeno total), y altamente específicas con ninguna o pocas respuestas en muestras de animales no infectados.

Las partículas tetravalentes de la invención fueron diagnósticamente informativas para órdenes de concentración de magnitud inferiores que los reactivos de control, tales como PPDA y PPDB.

Ejemplo 5 - Evaluación de partículas de polímero de PHA tetravalentes - prueba de sensibilización

Este ejemplo describe un estudio que somete a ensayo la sensibilización a las TTPP de la invención.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de sensibilización de cobayas después de inyección con TTPP (DS498) de acuerdo con el método de la Farmacopea EU. Se inyectaron a un grupo de ensayo de animales "inmunizados" por vía intradérmica partículas de polímero tetravalentes que proporcionan 3 μ g de antígeno total (0,1 ml) en el día cero, el día 5 y el día 10. A continuación, se inyectaron al grupo de ensayo "inmunizado" y a un grupo de control por vía intradérmica partículas de polímero tetravalentes que proporcionan 3 μ g de antígeno total (0,1 ml) en los días 25 a 31. Se observaron todos los animales para determinación de eritema e induración 24 horas después de la inyección.

RESULTADOS

No se observó ninguna diferencia entre animales de control e "inmunizados", mostrando que la "inmunización" con partículas de polímero tetravalentes (3 μ g de antígeno total) y posterior ensayo cutáneo no sensibilizaron a las cobayas. Esto significa que los animales no mostraron reacciones inmunitarias cuando se les inyectaron las partículas de polímero tetravalentes más de una vez.

Se observó hinchazón en los sitios de inyección; sin embargo, la ausencia de sensibilización muestra que las partículas de polímero tetravalentes de la invención no producen una respuesta inmunitaria de memoria que interferiría con un régimen de ensayo repetido.

Ejemplo 6 - Evaluación de partículas de polímero de PHA tetravalentes - prueba de campo

Este ejemplo describe la evaluación de partículas de polímero tetravalentes de la invención como reactivos de diagnóstico para tuberculosis. La especificidad de las TTPP descritas en el Ejemplo 2 anterior se evaluó en pruebas de campo a gran escala en cabezas de ganado y venado usando ensayos cutáneos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos usados en este estudio fueron los descritos en los Ejemplos 1 y 2 anteriores, con la adición de lo siguiente.

Prueba de campo

Se administraron a 4628 cabezas de ganado y 4265 cabezas de venado TTPP y un reactivo de ensayo cutáneo de TB disponible comercialmente por administración intradérmica, como sigue a continuación.

Administración intradérmica

Se administró el ensayo cutáneo de TB disponible en el mercado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las composiciones de TTPP se administraron por vía intradérmica de acuerdo con el siguiente protocolo.

Se administraron inyecciones de 0,1 ml (3 μ g de antígeno total) por vía intradérmica. Las jeringas se calibraron a 0,1 ml y la aguja de la jeringa tenía calibre 22-26 y 3-4 mm de longitud. Las jeringas se mantuvieron limpias y esterilizadas. Se evitó la contaminación de la jeringa con desinfectantes o alcohol, que puede interferir en el ensayo, y se tuvo cuidado de evitar la contaminación de los viales.

Sitio preferente de inyección:

Ganado: pliegue caudal para ensayo intradérmico individual y sitio cervical para ensayo cervical comparativo (CCT);

Venados: sitio cervical medio tanto para ensayo individual como para CCT. Cuando se usan los sitios cervicales, se requirió cuidado de recortar uniformemente el pelo cerca de la superficie de la piel (2 mm o menos de longitud

media) antes de la inyección. El tamaño recomendado del área recortada fue de 10 x 10 cm para cada sitio de inyección.

Interpretación del ensayo:

Se midió el grosor de piel 72 horas después de la inyección.

Las reacciones del ensayo cutáneo se clasificaron de acuerdo con los requisitos de la Junta de Sanidad Animal de Nueva Zelanda y la Estrategia Nacional de Gestión de Plagas para TB Bovina.

Se verificaron las reacciones positivas por ensayo de IFN- γ , cultivo, y ensayos de PCR.

RESULTADOS

Venados. Se asignó a los 4265 animales un valor ID de 1 a 4265. Se identificaron 63 animales como positivos para TB usando el ensayo cutáneo de TB disponible comercialmente ("Observe"), mientras que se identificaron 18 animales como positivos para TB usando las TTPP de la invención.

- Observe: resultado de Observe con valor 1 (n = 63) y 0 (n = 4202)
- TTPP: resultado de TTPP con valor 1 (n = 18) y 0 (n = 4247)

Tabla 16 -Ensayo t emparejado y CI: b_TB, Observe - Venados

	N	Media	SD	SE Medio
TTPP	4265	0,00422	0,06483	0,00099
Observe	4265	0,01477	0,12065	0,00185
Diferencia	4265	-0,01055	0,10668	0,00163

CI del 95 % para diferencia media: (-0,01375, -0,00735)

Ensayo t de diferencia media = 0 (frente a $\neq$ 0): Valor T = -6,46

Valor P = 0,000

Poder estadístico post hoc del ensayo t emparejado

Someter a ensayo diferencia emparejada media = 0 (frente a $\neq$ 0)

Calcular poder estadístico para diferencia emparejada media = diferencia

α = 0,05 Desviación estándar supuesta de diferencias emparejadas = 0,107

La diferencia de 0,01 para el tamaño de muestra de 4265 da un poder estadístico para el ensayo anterior de 0,999983.

Ganado. Se asignó a los 4628 animales un valor ID de 1 a 4628. Se identificaron 76 animales como positivos para TB usando el ensayo "Observe", mientras que se identificaron 3 animales como positivos para TB usando las TTPP de la invención.

- Observe: resultado de Observe con valor 1 (n = 76) y 0 (n = 4552)
- TTPP: resultado de TTPP con valor 1 (n = 3) y 0 (n = 4625)

Tabla 17 -Ensayo t emparejado y CI: b_TB, Observe - Ganado

	N	Media	SD	SE Medio
TTPP	4628	0,00065	0,02545	0,00037
Observe	4628	0,01642	0,12710	0,00187
Diferencia	4628	-0,01577	0,12803	0,00188

CI del 95 % para diferencia media: (-0,01946, -0,01208)

Ensayo t de diferencia media = 0 (frente a $\neq$ 0): Valor T = -8,38

Valor P = 0,000

Poder estadístico post hoc del ensayo t emparejado

Someter a ensayo diferencia emparejada media = 0 (frente a $\neq$ 0)

Calcular poder estadístico para diferencia emparejada media = diferencia

α = 0,05 Desviación estándar supuesta de diferencias emparejadas = 0,128

La diferencia de 0,016 para el tamaño de muestra de 4628 da un poder estadístico para el ensayo anterior de 1,0.

DISCUSIÓN

Los resultados altamente significativos estadísticamente presentados en este ejemplo establecieron que los ensayos de diagnóstico que usan TTPP de la invención fueron altamente específicos, provocando información diagnóstica precisa y pudieron discernir falsos positivos identificados usando métodos convencionales en la técnica.

Además, los ensayos presentados en los Ejemplos 3-6 establecieron que TTPP de la invención fueron diagnósticamente informativas incluso en cantidades que proporcionaron dosis totales muy bajas de antígenos de TB, mostrando que las TTPP de la invención son altamente sensibles, además de ser altamente selectivas.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

Los aspectos de la invención descritos en el presente documento, incluyendo métodos, partículas de polímero y proteínas de fusión, tienen utilidad en el diagnóstico, terapia y prevención de tuberculosis.

Los expertos en la materia entenderán que la descripción anterior se proporciona únicamente con fines ilustrativos y que la invención no se limita a la misma.

Publicaciones

Amara AA, Rehm BHA. 2003. Replacement of the catalytic nucleophile 533 cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas* 534 *aeruginosa*-mediated synthesis of a new polyester: identification of catalytic residues. 535 *Biochem. J.* 374:413-421.

Anderson, P. "Tuberculosis vaccines - an update" *Nature* (2007) 5: 484-487.

Barnard *et al.* "High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification" *Protein Expr Puri* (2004) 38: 264-71.

Barnes y Cave "Current concepts: molecular epidemiology of tuberculosis" *New England Journal of Medicine* (2003) 349: 1149-1156.

Beach, D. y Nurse. P. "High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*" *Nature* 290: 140-142 1981.

Belisle, J.T. *et al.* "Tuberculosis and the Tubercle Bacillus" ASM Press, Washington D.C. (2005).

Bowie, J.U. *et al.* "Deciphering the message in protein sequences: tolerance to amino acid substitutions" *Science* (1990) 247: 1306-1310.

Brockelbank J.A. *et al.* "Recombinant *Escherichia coli* Strain Produces a ZZ Domain Displaying Biopolyester Granules Suitable for Immunoglobulin G Purification" *Applied and Environmental Microbiology* (2006) 72: 7394-7397.

Brunschwig, E y Darzins, A. "A two-component T7 system for the overexpression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*" *Gene* (1992) 111: 35-41.

Buddle BM, Keen D, Thomson A, Jowett G, McCarthy AR, Heslop J, Delisle GW, Stanford JL, Aldwell FE. 1995. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae* *Res. Vet. Sci.* 59:10-16.

Buddle BM, Livingstone PG, Lisle GWd. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal* 57:173-180.

Buddle BM, Parlane NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody K, Andersen P. 1999. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6:1-5.

Casal C, Bezos J, Diez-Guerrier A, Alvarez J, Romero B, de Juan L, 449 Rodriguez-Campos S, Vordermeier M, Whelan A, Hewinson RG, Mateos A, 450 Dominguez L, Aranaz A. 2012. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, 451 CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon-gamma assay for 452 diagnosis of bovine tuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 105:149-

Case *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1979) 76: 5259-5263.

Chang *et al.*, *Nature*, 275: 615 (1978).

DeBoer *et al.*, "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp lac promoters" *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1983) 80: 21-25.

Fleer, R. *et al.*, "Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces yeasts*" *Bio/Technology* 9: 968-975.

Friebs y Reardon "Parameters Influencing the Productivity of Recombinant *E. coli* Cultivations". *Advances in Biochemical Engineering Technology Vol. 48 Springer Verlag* (1991).

Goeddel, D.V. *et al.* "Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone" (1979) *Nature* 281: 544-548.

Goeddel, D.V. "Synthesis of human fibroblast interferon by *E. coli*" *Nucleic Acids Research* (1980) 8: 4057-4074.

Hess, B. *et al.* "Cooperation of glycolytic enzymes" *Advances in Enzyme Regulation* (1968) 7: 149-167.

Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)].

Holland, M.J. y Holland, J.P. "Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase" *Biochemistry* (1978) 17: 4900-4907.

- Huang, X. "On global sequence alignment" *Computer Application in the Biosciences* (1994) 10: 227-235.
- Jahns AC, Rehm BHA 2009. Tolerance of the *Ralstonia eutropha* Class I polyhydroxyalkanoate synthase for transitional fusions to its C terminus reveals a new mode of functional display. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5461-5466.
- 5 Kelly, J.M. y Hynes, M.J. "Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* 22 gene of *Aspergillus nidulans*" *EMBO Journal* (1985) 4:475-479.
- Kingsman, A.J. *et al.*, "Replication in *Saccharomyces cerevisiae* of plasmid pBR313 carrying DNA from the yeast *trpI* region" *Gene* (1979) 7:141-152.
- 10 Louvencourt *et al.* "Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA" *Journal of Bacteriology* (1983)154: 737-742.
- Madison, L. L. *et al.*, "Metabolic Engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1999) 63: 21-53.
- Mather.J.P. "Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines" *Biology of Reproduction* (1980) 23: 243-251.
- 15 Mather, J.P. *et al.* "Culture of Testicular Cells in Hormone-Supplemented Serum-Free Medium" *Annals of the N.Y. Academy of Science* (1982) 383:44-68.
- Millington KA, Fortune SM, Low J, Garces A, Hingley-Wilson SM, Wickremasinghe M, Kon OM, Lalvani A. 2011. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:5730-5735.
- 20 Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. 1994. The tuberculin test *Veterinary Microbiology* 40:111-124.
- Mustafa, AS. "Biotechnology in the development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis-Current Pharmaceutical Biotechnology (2001) 2: 157-173.
- 25 Parlane NA, Wedlock DN, Buddle BM, Rehm BHA. 2009. Bacterial polyester inclusions engineered to display vaccine candidate antigens for use as a novel class of safe and efficient vaccine delivery agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7739-7744.
- Peters, V. and Rehm, B.H.A "In vivo enzyme immobilization by use of engineered polyhydroxyalkanoate synthase" *Applied and Environmental Microbiology* (2006) 72: 1777-83.
- 30 Peters V, Rehm BHA. 2008. Protein engineering of streptavidin for in vivo assembly of streptavidin beads. *Journal of Biotechnology* 134:266-274.
- Rehm, B.H.A. "Polyester synthesis; natural catalysts for plastics" *Biochemical Journal* (2003) 376: 15-33.
- Rehm, B.H.A. "Biopolyester particles produced by microbes o using polyestersynthases: self assembly and potential applications" *Microbial Biotechnology: biological self-assembly systems and biopolymer-based nanostructures* Horizon Bioscience (2006).
- 35 Sambrook, *et al.* "Molecular Cloning; a Laboratory Manual" (2nd ed) Cold Spring Harbor Press (1987) Sambrook J. Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EUA.
- Sidders B, Pirson C, Hogarth PJ, Hewinson RG, Stoker NG, Vordermeier HM, Ewer K. 2008. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infectin and Immunity* 76:3932-3939.
- 40 Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, Baumeister D, Steinbuchel A. 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch. Microbiol.* 171:73-80.
- 45 Sreekrishna K *et al.* "High level expression of heterologous proteins in methylotropic yeast *Pichia pastoris*" *Journal of Basic Microbiology* (1988) 28: 265-278.
- Stinchcomb, D. T. *et al.* "Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator" *Nature* (1979) 282: 39-43
- Tilburn, J. *et al.* "Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*" *Gene* (1983) 26: 205-221.
- 50 Tschemper, G y Carbon, J. "Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene" *Gene* (1980) 10:157-166.
- Urlaub, G. y Chasin, L.A "Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity-*Proceedings of the National Academy of Science USA* (1980) 77:4216-4220.
- Van den Berg, G. *et al.* "Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of proclimycin" *Bio/Technology* (1990) 8: 135-139.
- 55 Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:571-578.
- Waters WR, Nonnecke BJ, Palmer MV, Robbe-Austermann S, Bannantine JP, Stabel JR, Whipple DL, Payeur JB, Estes DM, Pitzer JE, Minion FC. 2004. Use of recombinant ESAT-6 : CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp *avium* and *M. avium* subsp *paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11:729-735.
- 60 Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Breadon EL, McNairJ, Hewinson GR, 445 Vordermeier MH. 2010. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *Journal of Clinical Microbiology* 48:3176-3181.
- 65 Yelton, M.M. *et al.* "Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid" *Proceedings of the National Academy of Science USA* (1984) 81: 1470-1474

Todas las características desveladas en la presente memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. De ese modo, a menos que se indique expresamente de otro modo, cada característica desvelada es solo un ejemplo de una serie genética de características equivalentes o similares. El experto en la materia entenderá fácilmente que pueden realizarse sustituciones y modificaciones variantes de la invención desvelada en el presente documento sin apartarse del alcance y ánimo de la invención. La invención descrita ilustrativamente en el presente documento puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o limitación que no se desvele específicamente en el presente documento como esencial. De ese modo, por ejemplo, en cada caso en el presente documento, en realizaciones o ejemplos no limitantes de la presente invención, los términos "comprender", "incluir", "contener", etc., se han de leer ampliamente y sin limitación. Los métodos y procesos descritos ilustrativamente en el presente documento pueden ponerse en práctica adecuadamente en diferentes órdenes de etapas, y no se restringen necesariamente a los órdenes de etapas indicados en el presente documento o en las reivindicaciones.

Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay ningún intento en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de características mostradas y descritas o partes de las mismas, sino que se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. De ese modo, se ha de entender que, aunque la presente invención se ha desvelado específicamente mediante diversas realizaciones no limitantes y/o realizaciones no limitantes preferentes y características opcionales, todas y cada una de las modificaciones y variaciones de los conceptos desvelados en el presente documento a las que puedan recurrir los expertos en la materia se consideran dentro del alcance de la invención definida mediante las reivindicaciones adjuntas.

La invención se ha descrito amplia y generalmente en el presente documento. Cada una de las especies y agrupaciones subgenéricas más restringidas que entren dentro de la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que retire cualquier materia objeto del género, independientemente de si el material escindido se enumera específicamente en el presente documento.

También se ha de entender que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo, la expresión "X y/o Y" significa "X" o "Y" o tanto "X" como "Y", y las letras "s" o "es" después de un nombre indican formas tanto en plural como en singular de ese nombre. Además, cuando se describen características aspectos de la invención en términos de grupos de Markush, se entiende, y los expertos en la materia reconocerán, que la invención incluye y también se describe de ese modo en términos de cualquier miembro individual y cualquier subgrupo de miembros del grupo de Markush, y los solicitantes se reservan el derecho a revisar la solicitud o reivindicaciones para referirse específicamente a cualquier miembro individual o a cualquier subgrupo de miembros del grupo de Markush.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Buddle, Bryce Wedlock, Neil Rehm, Bernd

<120> PARTÍCULAS DE POLÍMERO Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 694801 JBM

<150> NZ 620682

<151> 04-02-2014

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 95

<212> PRT

<213> *Mycobacterium bovis*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Antígeno ESAT6

<400> 1

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 100
<212> PRT
5 <213> *Mycobacterium bovis*

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <223> Antígeno CFP10

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Gln Met Gly Phe
100

<210> 3
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium bovis*
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Antígeno Rv3615c
 10
 <400> 3

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

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

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

 Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala
 50 55 60

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

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

 Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr
 100

 <210> 4
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium bovis*
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Antígeno Rv3020c
 20
 <400> 4

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

<210> 5
<211> 94
5 <212> PRT
<213> *Mycobacterium bovis*

<220>
10 <221> MISC_FEATURE
<223> Antígeno Rv2346c

<400> 5

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 Gly Leu Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val
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
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> 6
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> polipéptido de fusión sintético

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Fusión ESAT6-Rv3020c

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ala Ser His Thr Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His
115 120 125

Thr Ile Gly Gln Ala Glu Gln Gln Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His
130 135 140

Gln Gly Glu Ser Ala Ala Ala Phe Gln Gly Ala His Ala Arg Phe Val
145 150 155 160

Ala Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Ile Ala Gln Ala Asn
165 170 175

Leu Gly Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala
180 185 190

Ser Ser Tyr Thr Gly Phe
195

<210> 7
<211> 690
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido de fusión sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Fusión CFP10-PhaC

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Gln Met Gly Phe His Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr
 100 105 110

Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp
 115 120 125

Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly
 130 135 140

Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala
 145 150 155 160

Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr
 165 170 175

Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala
 180 185 190

Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp
 195 200 205

Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn
 210 215 220

Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys
 225 230 235 240

Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met
 245 250 255

Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu
 260 265 270

Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met
 275 280 285

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

Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu
 305 310 315 320

Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val
 325 330 335

His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr
 340 345 350

Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu
 355 360 365
 Gln Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser
 370 375 380
 Met Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg
 385 390 395 400
 Ala Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val
 405 410 415
 Leu Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val
 420 425 430
 Leu Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr
 435 440 445
 Thr Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp
 450 455 460
 Glu Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly
 465 470 475 480
 Ala Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser
 485 490 495
 Phe Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr
 500 505 510
 Leu Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly
 515 520 525
 Asp Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His
 530 535 540
 Thr Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys
 545 550 555 560
 Gly Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr
 565 570 575
 Gly Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser
 580 585 590
 Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly
 595 600 605

His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His
610 615 620

Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly
625 630 635 640

Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu
645 650 655

Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn
660 665 670

Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala
675 680 685

Lys Ala
690

<210> 8
<211> 693
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido de fusión sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Fusión RV3615C-PhaC

<400> 8

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

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

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

Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala
50 55 60

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

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

Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr His Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala
100 105 110

Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly
115 120 125

Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly
130 135 140

Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp
145 150 155 160

Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln
165 170 175

Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu
180 185 190

Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly
195 200 205

Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr
210 215 220

Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala
225 230 235 240

Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val
245 250 255

Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln
260 265 270

Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg
275 280 285

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

Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val
305 310 315 320

Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr
325 330 335

Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn

340					345					350					
Lys	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Asp	Leu	Gln	Pro	Glu	Ser	Ser	Leu	Val	Arg	His
		355					360					365			
Val	Val	Glu	Gln	Gly	His	Thr	Val	Phe	Leu	Val	Ser	Trp	Arg	Asn	Pro
	370					375					380				
Asp	Ala	Ser	Met	Ala	Gly	Ser	Thr	Trp	Asp	Asp	Tyr	Ile	Glu	His	Ala
385					390					395					400
Ala	Ile	Arg	Ala	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	Asp	Ile	Ser	Gly	Gln	Asp	Lys
				405					410					415	
Ile	Asn	Val	Leu	Gly	Phe	Cys	Val	Gly	Gly	Thr	Ile	Val	Ser	Thr	Ala
			420					425					430		
Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Glu	His	Pro	Ala	Ala	Ser	Val	Thr
		435					440					445			
Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Asp	Phe	Ala	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asp	Val
	450					455					460				
Phe	Val	Asp	Glu	Gly	His	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu	Gly	Gly
465					470					475					480
Gly	Ala	Gly	Ala	Pro	Cys	Ala	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Glu	Leu	Ala	Asn
				485					490					495	
Thr	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	Pro	Asn	Asp	Leu	Val	Trp	Asn	Tyr	Val	Val
			500					505					510		
Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Phe
		515					520					525			
Trp	Asn	Gly	Asp	Ala	Thr	Asn	Leu	Pro	Gly	Pro	Trp	Tyr	Cys	Trp	Tyr
	530					535					540				
Leu	Arg	His	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn	Glu	Leu	Lys	Val	Pro	Gly	Lys	Leu
545					550					555					560
Thr	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Val	Asp	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Val	Pro	Thr
				565					570					575	
Tyr	Ile	Tyr	Gly	Ser	Arg	Glu	Asp	His	Ile	Val	Pro	Trp	Thr	Ala	Ala
			580					585					590		

Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly
595 600 605

Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys
610 615 620

Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp
625 630 635 640

Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr
645 650 655

Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn
660 665 670

Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr
675 680 685

Val Lys Ala Lys Ala
690

<210> 9
<211> 685
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido de fusión sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Fusión ESAT6-PhaC

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Met Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln Glu Gly Lys Ser
100 105 110

Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro Ala Thr Trp Leu
115 120 125

Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn Gly His Ala Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly Val Lys Ile Ala
145 150 155 160

Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met Lys Asp Phe Ser
165 170 175

Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu Ala Thr Gly Pro
180 185 190

Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg Thr Asn Leu Pro
195 200 205

Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala Arg Ala Leu Thr
210 215 220

Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr Arg Gln Arg Ile
225 230 235 240

Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser Pro Ala Asn Phe
245 250 255

Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Gly
260 265 270

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

Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Val Gly Arg Asn
290 295 300

Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn Glu Tyr Phe Gln
305 310 315 320

Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His Ala Arg Pro Leu
325 330 335

Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Leu Asp Leu Gln
 340 345 350
 Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln Gly His Thr Val
 355 360 365
 Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met Ala Gly Ser Thr
 370 375 380
 Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala Ile Glu Val Ala
 385 390 395 400
 Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu Gly Phe Cys Val
 405 410 415
 Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu Ala Ala Arg Gly
 420 425 430
 Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Asp Phe
 435 440 445
 Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu Gly His Val Gln
 450 455 460
 Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro Cys Ala Leu
 465 470 475 480
 Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe Leu Arg Pro Asn
 485 490 495
 Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Thr
 500 505 510
 Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp Ala Thr Asn Leu
 515 520 525
 Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr Tyr Leu Gln Asn
 530 535 540
 Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly Val Pro Val Asp
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Asp
 565 570 575
 His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ala
 580 585 590

Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His Ile Ala Gly Val
595 600 605

Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp Thr Asn Asp Ala
610 615 620

Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala Ile Glu His His
625 630 635 640

Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala Gly Gln Ala Gly
645 650 655

Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala Arg Tyr Arg Ala
660 665 670

Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys Ala
675 680 685

<210> 10

<211> 914

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Fusión CFP10-RV3615C-PhaC-ESAT6

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Gln Met Gly Phe Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Pro Met Thr Glu Asn
 100 105 110
 Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala Ser His His Asp
 115 120 125
 Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala Ala Ala Gly Leu
 130 135 140
 Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys Ser Gln Phe Asn
 145 150 155 160
 Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala Leu Gly Ser Ser
 165 170 175
 Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu Arg Ile Ala Ala
 180 185 190
 Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys Ala Ile Asp Gly
 195 200 205
 Leu Phe Thr Thr Ser Ala Thr Gly Lys Gly Ala Ala Ala Ser Thr Gln
 210 215 220
 Glu Gly Lys Ser Gln Pro Phe Lys Val Thr Pro Gly Pro Phe Asp Pro
 225 230 235 240
 Ala Thr Trp Leu Glu Trp Ser Arg Gln Trp Gln Gly Thr Glu Gly Asn
 245 250 255
 Gly His Ala Ala Ala Ser Gly Ile Pro Gly Leu Asp Ala Leu Ala Gly
 260 265 270
 Val Lys Ile Ala Pro Ala Gln Leu Gly Asp Ile Gln Gln Arg Tyr Met
 275 280 285
 Lys Asp Phe Ser Ala Leu Trp Gln Ala Met Ala Glu Gly Lys Ala Glu
 290 295 300
 Ala Thr Gly Pro Leu His Asp Arg Arg Phe Ala Gly Asp Ala Trp Arg
 305 310 315 320
 Thr Asn Leu Pro Tyr Arg Phe Ala Ala Ala Phe Tyr Leu Leu Asn Ala
 325 330 335
 Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr

340	345	350
Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser		
355	360	365
Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile		
370	375	380
Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu		
385	390	395
400		
Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu		
405	410	415
Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn		
420	425	430
Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His		
435	440	445
Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile		
450	455	460
Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln		
465	470	475
480		
Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met		
485	490	495
Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala		
500	505	510
Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu		
515	520	525
Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu		
530	535	540
Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr		
545	550	555
560		
Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu		
565	570	575
Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala		
580	585	590

Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe
 595 600 605
 Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu
 610 615 620
 Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp
 625 630 635 640
 Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr
 645 650 655
 Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly
 660 665 670
 Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly
 675 680 685
 Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr
 690 695 700
 Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His
 705 710 715 720
 Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp
 725 730 735
 Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala
 740 745 750
 Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala
 755 760 765
 Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala
 770 775 780
 Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys
 785 790 795 800
 Ala His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly
 805 810 815
 Gly Leu Glu Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala
 820 825 830
 Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu
 835 840 845

Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly
850 855 860

Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr
865 870 875 880

Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser
885 890 895

Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met
900 905 910

Phe Ala

<210> 11
<211> 606
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia sintética que codifica el polipéptido de fusión ESAT6-Rv3020c

<400> 11

```
ctcgagatga cggaacaaca atggaacttt gctggcatcg aagccgccgc atctgctatt      60
caaggcaatg tgacctctat ccactcgtcg ctggatgaag gcaaacagag tctgaccaa      120
ctggcagcag catggggcgg tagcggctct gaagcctatc aagggtgtgca gcaaaaatgg      180
gacgctaccg cgacggaact gaacaatgcc ctgcagaacc tggcacgtac gatttctgaa      240
gcaggtcaag ctatggcaag cacggaaggc aatgtcacgg gcatgttcgc aggcggcggc      300
ggcggcatga gcctgctgga tgcgcatatt ccgcagctga ttgcgagcca taccgcgttt      360
gcggcgaaag cgggcctgat gcgtcatacc attggccagg cggaacagca ggcgatgagc      420
gcgcaggcgt ttcatcaggc cgaagcgcgc gcggcggttc agggcgcgca tgcgcgtttt      480
gtggcggcgg cggcgaaagt gaacaccctg ctggatattg cgcaggcgaa cctgggcgaa      540
gcggcgggca cctatgtggc ggccgatgcg gcggcgcgca gcagctatac cggcttttaa      600
ggatcc                                           606
```

<210> 12
<211> 2073
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética que codifica el polipéptido de fusión CFP10-PhaC

<400> 12

```
atggcagaaa tgaaaacgga tgcggcgacc ctggcacaag aagcgggcaa ctttgaacgt      60
```

attagcggcg acctgaaaac ccaaatcgat cagggttgaaa gcaccgcggg ttctctgcaa 120
 ggccagtggc gtggtgcggc cggtacggca gctcaagcgg ccgtgggttcg ctttcaggaa 180
 gcagctaaca aacaaaaaca ggaactggat gaaatttcaa ccaatatccg tcaagccggc 240
 gtgcagtatt cgcgcgcaga cgaagaacag caacaggctc tgagctctca aatgggtttc 300
 catatggcga ccggcacaag cgccgcagct tccacgcagg aaggcaagtc ccaaccattc 360
 aaggtcacgc cggggccatt cgatccagcc acatggctgg aatggtcctg ccagtggcag 420
 ggcactgaag gcaacggcca cgcggccgcg tccggcattc cgggcctgga tgcgctggca 480
 ggcgtcaaga tcgcgcggc gcagctgggt gatatccagc agcgtacat gaaggacttc 540
 tcagcgtgtt ggcaggccat ggccgagggc aaggccgagg ccaccgggtcc gctgcacgac 600
 cggcgtttcg ccggcgacgc atggcgacc aacctcccat atcgcttcgc tgcgcgttc 660
 tactgtctca atgcgcgcgc cttgaccgag ctggccgatg ccgtcgaggc cgatgccaa 720
 acccgccagc gcatccgctt cgcgatctcg caatgggtcg atgcgatgtc gccgcgaac 780
 ttctttgcca ccaatccga ggccgcagcg ctgctgatcg agtcgggcgg cgaatcgctg 840
 cgtgccggcg tgcgcaacat gatggaagac ctgacacgog gcaagatctc gcagaccgac 900
 gagagcgcgt ttgaggtcgg ccgcaatgtc gcggtgaccg aaggcgccgt ggtcttcgag 960
 aacgagtact tccagctgtt gcagtacaag ccgctgaccg acaaggtgca cgcgcgcccg 1020
 ctgctgatgg tgcgcgcgtg catcaacaag tactacatcc tggacctgca gccggagagc 1080
 tcgctggtgc gccatgtggt ggagcagggc catacgggtg ttctggtgtc gtggcgcaat 1140
 ccggacgcca gcatggccgg cagcacctgg gacgactaca tcgagcacgc ggccatccgc 1200
 gccatcgaag tcgcgcgcga catcagcggc caggacaaga tcaacgtgct cggcttctgc 1260
 gtgggcggca ccattgtctc gaccgcgctg gcggtgctgg ccgcgcgcgg cgagcacccg 1320
 gccgccagcg tcacgtgct gaccacgctg ctggactttg ccgacacggg catcctcgac 1380
 gtctttgtcg acgagggcca tgtgcagttg cgcgagggcca cgctgggcgg cggcgccggc 1440
 gcgccgtgcg cgctgctgcg cggccttgag ctggccaata ccttctcggt cttgcgcgccg 1500
 aacgacctgg tgtggaacta cgtggtcgac aactacctga agggcaacac gccggtgccg 1560
 ttcgacctgc tgttctggaa cggcgacgcc accaacctgc cggggccgtg gtactgctgg 1620
 tactgcgcc acacctacct gcagaacgag ctcaaggtag cgggcaagct gaccgtgtgc 1680
 ggcgtgccgg tggacctggc cagcatcgac gtgccgacct atatctacgg ctgcgcgaa 1740
 gaccatatcg tgccgtggac cgcggcctat gcctcgaccg cgctgctggc gaacaagctg 1800
 cgcttcgtgc tgggtgcgtc gggccatata gccggtgtga tcaaccggcc ggccaagaac 1860
 aagcgcagcc actggactaa cgatgcgctg ccggagtcgc cgcagcaatg gctggccggc 1920

ES 2 891 973 T3

```

gccatcgagc atcacggcag ctggtggccg gactggaccg catggctggc cgggcaggcc 1980
ggcgcgaaac gcgccgcgcc cgccaactat ggcaatgcgc gctatcgccg aatcgaaccc 2040
gcgcctgggc gatacgtcaa agccaaggca tga 2073

```

```

5 <210> 13
  <211> 2085
  <212> ADN
  <213> Artificial

10 <220>
  <223> Secuencia sintética que codifica el polipéptido de fusión Rv3615c-PhaC

  <400> 13

```

atgatgaccg	aaaacctgac	ggttcagccg	gaacgtctgg	gtgtcctggc	aagtcacac	60
gataatgcag	cagtcgacgc	cagttccggc	gtggaagcag	ctgcaggtct	gggtgaaagt	120
gtggcgatta	cccatggtcc	gtattgctcc	cagtttaacg	ataccctgaa	tgtttacctg	180
acggcccata	acgcactggg	ttcatcgctg	cacacggctg	gtgtcgacct	ggcaaaatct	240
ctgcgcacgc	cgcacaaaat	ctattcagaa	gcagacgaag	cgtggcgtaa	agcaatcgac	300
ggcctgttca	cccatatggc	gaccggcaaa	ggcgcggcag	cttcacgcga	ggaaggcaag	360
tcccaaccat	tcaaggtcac	gccggggcca	ttcgatccag	ccacatggct	ggaatggctc	420
cgcacgtggc	agggcactga	aggcaacggc	cacgcggccg	cgtccggcat	tccgggcctg	480
gatgcgctgg	caggcgtcaa	gatcgcgccg	gcgcagctgg	gtgatatcca	gcagcgctac	540
atgaaggact	tctcagcgct	gtggcaggcc	atggccgagg	gcaaggccga	ggccaccggt	600
ccgctgcacg	accggcgctt	cgcggcgac	gcctggcgca	ccaacctccc	atatcgcttc	660
gctgcgcgct	tctacctgct	caatgcgcgc	gccttgaccg	agctggccga	tgccgtcgag	720
gccgatgcc	agaccgcga	gcgcacccgc	ttcgcgatct	cgcaatgggt	cgatgcgatg	780
tgcggcgcca	acttccttgc	caccaatccc	gaggcgcgag	gcctgctgat	cgagtcgggc	840
ggcgaatcgc	tgcggtgccg	cgtgcgcaac	atgatggaag	acctgacacg	cggcaagatc	900
tgcgagaccg	acgagagcgc	gtttgaggtc	ggccgcaatg	tgcgggtgac	cgaaggcgcc	960
gtggtcttcg	agaacgagta	cttcagctg	ttgcagtaca	agccgctgac	cgacaagggtg	1020
cacgcgcgcc	cgctgctgat	ggtgccgcgc	tgcatcaaca	agtactacat	cctggacctg	1080
cagccggaga	gctcgctggt	gcgccatgtg	gtggagcagg	gacatacggc	gtttctggtg	1140
tcgtagcgca	atccggacgc	cagcatggcc	ggcagcacct	gggacgacta	catcgagcac	1200
gcggccatcc	gcgccatcga	agtcgcgcgc	gacatcagcg	gccaggacaa	gatcaacgtg	1260
ctcggtttct	gcgtgggcgg	caccattgtc	tcgaccgcgc	tggcggtgct	ggccgcgcgc	1320
ggcgagcacc	cggccgccag	cgtcacgctg	ctgaccacgc	tgctggactt	tgccgacacg	1380
ggcatcctcg	acgtctttgt	cgacgagggc	catgtgcagt	tgcgcgaggc	cacgctgggc	1440

ggcggcgccg gcgcgccgtg cgcgctgctg cgcggccttg agctggccaa taccttctcg 1500
 ttcttgccgc cgaacgacct ggtgtggaac tacgtggtcg acaactacct gaagggaac 1560
 acgcgggtgc cgttcgacct gctgttcttg aacggcgacg ccaccaacct gccggggccg 1620
 tggtaactgct ggtacctgcg ccacacctac ctgcagaacg agctcaaggt accgggcaag 1680
 ctgaccgtgt gcggcggtgcc ggtggacctg gccagcatcg acgtgccgac ctatatctac 1740
 ggctcgcgcg aagaccatat cgtgccgtgg accgcggcct atgcctcgac cgcgctgctg 1800
 gcgaacaagc tgcgcttctg gctgggtgcg tcgggccata tcgccgggtg gatcaaccgc 1860
 ccggccaaga acaagcgag ccactggact aacgatgcgc tgccggagtc gccgcagcaa 1920
 tggctggccg gcgccatcga gcatcacggc agctggtggc cggactggac cgcgtggctg 1980
 gccgggcagg ccggcgcgaa acgcgccgcg cccgccaaact atggcaatgc gcgctatcg 2040
 gcaatcgaac ccgcgcctgg gcgatacgtc aaagccaagg catga 2085

<210> 14
 <211> 2058
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética que codifica el polipéptido de fusión ESAT6-PhaC

<400> 14

atgacggaac aacaatggaa ctttgctggc atcgaagccg ccgcatctgc tattcaaggc 60
 aatgtgacct ctatccactc gctgctggat gaaggcaaac agagtctgac caaactggca 120
 gcagcatggg gcggtagcgg ctctgaagcc tatcaagggtg tgcaagcaaaa atgggacgct 180
 accgcgacgg aactgaacaa tgccctgcag aacctggcac gtacgatttc tgaagcaggt 240
 caagctatgg caagcacgga aggcaatgtc acgggcatgt tcgcacatat ggcgaccggc 300
 aaaggcgcg cagcttccac gcaggaaggc aagtcccaac cattcaagggt cacgcggggg 360
 ccattcgatc cagccacatg gctggaatgg tcccgccagt ggcagggcac tgaaggcaac 420
 ggccacgcgg ccgcgtccgg cattccgggc ctggatgcgc tggcaggcgt caagatcgcg 480
 ccggcgcgac tgggtgatat ccagcagcgc tacatgaagg acttctcagc gctgtggcag 540
 gccatggccg agggcaaggc cgaggccacc ggtccgctgc acgaccggcg cttcgccggc 600
 gacgcatggc gcaccaacct cccatatcgc ttcgctgccg cgttctacct gctcaatgcg 660
 cgcgccttga ccgagctggc cgatgccgtc gaggccgatg ccaagaccgc ccagcgcac 720
 cgcttcgcga tctcgcaatg ggtcgatgcg atgtcgccc ccaacttcct tgccaccaat 780
 cccgaggcgc agcgctgct gatcgagtcg ggccgcgaat cgctgcgtgc cggcgtgcgc 840
 aacatgatgg aagacctgac acgcggcaag atctcgcaga ccgacgagag cgcgtttgag 900

gtcggccgca atgtcgcggt gaccgaaggc gccgtggtct tcgagaacga gtacttccag 960
ctgttgcaagt acaagccgct gaccgacaag gtgcacgcgc gcccgctgct gatgggtgccg 1020
ccgtgcatca acaagtacta catcctggac ctgcagcccg agagctcgct ggtgcgccat 1080
gtggtggagc agggacatac ggtgtttctg gtgtcgtggc gcaatccgga cgccagcatg 1140
gccggcagca cctgggacga ctacatcgag caccgcggcca tccgcgccat cgaagtcgcg 1200
cgcgacatca gccggccagga caagatcaac gtgctcggtt tctgcgtggg cggcaccatt 1260
gtctcgaccg cgctggcggt gctggccgcg cgcggcgagc acccggccgc cagcgtcacg 1320
ctgctgacca cgctgctgga ctttgccgac acgggcatcc tcgacgtctt tgtcgacgag 1380
ggccatgtgc agttgcgga ggccaogctg ggccggcgcg ccggcgcgcc gtgcgcgctg 1440
ctgcgcggcc ttgagctggc caataccttc tegtctctgc gccgaacga cctggtgtgg 1500
aactacgtgg tcgacaacta cctgaagggc aacacgcggg tgccgttcga cctgctgttc 1560
tggaacggcg accccaccaa cctgccgggg ccgtggtact gctggtacct gcgccacacc 1620
tacctgcaga acgagctcaa ggtaccgggc aagctgaccg tgtgcggcgt gccggtggac 1680
ctggccagca tcgacgtgcc gacctatata tacggctcgc gcgaagacca tatcgtgccg 1740
tggaacggcg cctatgcctc gaccgcgctg ctggcgaaaca agctgcgctt cgtgctgggt 1800
gcgtcggggc atatacgccg tgtgatcaac ccgccggcca agaacaagcg cagccactgg 1860
actaacgatg cgctgccgga gtccgcgcag caatggctgg ccggcgccat cgagcatcac 1920
ggcagctggt ggccggactg gaccgcattg ctggccgggc aggccggcg gaaacgcgcc 1980
gcgcccgcca actatggcaa tgccgcgtat cgcgcaatcg aaccgcgcc tgggcgatac 2040
gtcaaagcca aggcattga 2058

<210> 15
<211> 2745
<212> **ADN**
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética que codifica el polipéptido de fusión CFP10-Rv3615c-PhaC-ESAT6

<400> 15
atggcagaaa tgaaaacgga tgcggcgacc ctggcacaag aagcgggcaa ctttgaacgt 60
attagcggcg acctgaaaac ccaaatacat caggttgaaa gcaccgcggg ttctctgcaa 120
ggccagtggc gtggtgcggc cggtaaggca gctcaagcgg ccgtggttcg ctttcaggaa 180
gcagctaaca acaaaaaaca ggaactggat gaaatttcaa ccaatatccg tcaagccggc 240
gtgcagtatt cgcgcgcaga cgaagaacag caacaggctc tgagctctca aatgggtttc 300
gggcccgggc gtggcggtgg ccgatgacc gaaaacctga cggttcagcc ggaacgtctg 360

ggtgtcctgg	caagtcacatca	cgataatgca	gcagtcgacg	ccagttccgg	tgtggaagca	420
gctgcaggtc	tgggtgaaag	tgtggcgatt	acccatggtc	cgtattgctc	ccagtttaac	480
gataccctga	atgtttacct	gacggcccat	aacgcactgg	gttcacgcgt	gcacacggct	540
ggtgtcgacc	tggcaaaatc	tctgcgcac	gccgcaaaaa	tctattcaga	agcagacgaa	600
gcgtggcgta	aagcaatcga	cggcctgttc	accactagt	cgaccggcaa	aggcgcggca	660
gcttcacgc	aggaaggcaa	gtcccaacca	ttcaaggctc	cgccggggcc	attcgatcca	720
gccacatggc	tggaatggtc	ccgccagtgg	cagggcactg	aaggcaacgg	ccacgcggcc	780
gcgtccggca	ttccgggcct	ggatgcgctg	gcaggcgctc	agatcgcgcc	ggcgcagctg	840
ggtgatatcc	agcagcgcta	catgaaggac	ttctcagcgc	tgtggcaggc	catggccgag	900
ggcaaggccg	aggccaccgg	tccgctgcac	gaccggcgct	tcgccggcga	cgcatggcgc	960
accaacctcc	catatcgctt	cgctgccgcg	ttctacctgc	tcaatgcgcg	cgcttgacc	1020
gagctggccg	atgccgtcga	ggccgatgcc	aagaccgcc	agcgcatccg	cttcgcgatc	1080
tcgcaatggg	tcgatgcgat	gtcgcccgcc	aacttccttg	ccaccaatcc	cgaggcgag	1140
cgctgctga	tcgagtcggg	cggcgaatcg	ctgcgtgccg	gcgtgcgcaa	catgatggaa	1200
gacctgacac	gcggcaagat	ctcgagacc	gacgagagcg	cgtttgaggt	cgcccgcaat	1260
gtcgcggtga	ccgaaggcgc	cgtggtcttc	gagaacgagt	acttcagct	gttgagctac	1320
aagccgctga	ccgacaaggt	gcacgcgcgc	ccgctgctga	tggtgccgcc	gtgcatcaac	1380
aagtactaca	tcctggacct	gcagccggag	agctcgctgg	tcgcccatgt	ggtggagcag	1440
ggacatacgg	tgtttctggt	gtcgtggcgc	aatccggacg	ccagcatggc	cggcagcacc	1500
tgggacgact	acatcgagca	cgcgcccatc	cgcgccatcg	aagtcgcgcg	cgacatcagc	1560
ggccaggaca	agatcaacgt	gctcggttc	tcggtgggcg	gcaccattgt	ctcgaccgcg	1620
ctggcggtgc	tggccgcgcg	cgcgagcac	ccggccgccca	gcgtcacgct	gctgaccacg	1680
ctgctggact	ttgccgacac	gggcatactc	gacgtctttg	tcgacgagg	ccatgtgcag	1740
ttgcgcgagg	ccacgctggg	cggcggcgcc	ggcgcgccgt	gcgcgctgct	gcgcggcctt	1800
gagctggcca	ataccttctc	gttcttgccg	ccgaacgacc	tgggtgtgaa	ctacgtggtc	1860
gacaactacc	tgaagggcaa	cacgccggtg	ccgttcgacc	tgctgttctg	gaacggcgac	1920
gccaccaacc	tgccggggcc	gtggtactgc	tggtacctgc	gccacaccta	cctgcagaac	1980
gagctcaagg	taccgggcaa	gctgaccgtg	tcgggcgtgc	cggtggacct	ggccagcatc	2040
gacgtgccga	cctatatcta	cggtcgcgc	gaagaccata	tcgtgccgtg	gaccgcggcc	2100
tatgcctcga	ccgcgctgct	ggcgaacaag	ctgcgcttcg	tgctgggtgc	gtcgggccat	2160
atcgccggtg	tgatcaaccc	gccggccaag	aacaagcgca	gccactggac	taacgatgcg	2220
ctgccggagt	cgccgcagca	atggctggcc	ggcgccatcg	agcatcacgg	cagctggtgg	2280

ES 2 891 973 T3

ccggactgga ccgcatggct ggccgggag gccggcgga aacgcgcgc gcccgccaac 2340
 tatggcaatg cgcgctatcg cgcaatcgaa cccgcgcctg ggcgatacgt caaagccaag 2400
 gcacatatgg tgctggcggg ggcgattgat aaacgcggag gcggtggagg cctcgagatg 2460
 acggaacaac aatggaactt tgctggcatc gaagccgccg catctgctat tcaaggcaat 2520
 gtgacctcta tccactcgct gctggatgaa ggcaaacaga gtctgaccaa actggcagca 2580
 gcatggggcg gtagcggctc tgaagcctat caaggtgtgc agcaaaaatg ggacgctacc 2640
 gcgacggaac tgaacaatgc cctgcagaac ctggcacgta cgatttctga agcaggtcaa 2700
 gctatggcaa gcacggaagg caatgtcacg ggcattgtcg cataa 2745

5 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 16

aacatatggc agaaatgaaa acggatgcgg c 31

15 <210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 17

25 ttcatatgga aaccatttg agagctcaga gcc 33

30 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

35 <400> 18

aacatatgac cgaaaacctg acggttcagc cgg 33

40 <210> 19
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 19

ttcatatggg tgaacaggcc gtcattgct ttac 34

<210> 20
 <211> 35
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 10 <400> 20

 aacatatgac ggaacaacaa tggaacttg ctggc 35

 <210> 21
 <211> 35
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 21

 ttcatatgtg cgaacatgcc cgtgacattg ccttc 35
 25
 <210> 22
 <211> 1016
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> polipéptido de fusión sintético

 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <223> Fusión CFP10-RV3615c-PhaC-ESAT6-Rv3020c

 <400> 22

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

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

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

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

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

Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser

85							90					95				
Gln	Met	Gly	Phe 100	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Met	Thr 110	Glu	Asn	
Leu	Thr	Val 115	Gln	Pro	Glu	Arg	Leu 120	Gly	Val	Leu	Ala	Ser 125	His	His	Asp	
Asn	Ala 130	Ala	Val	Asp	Ala	Ser 135	Ser	Gly	Val	Glu	Ala 140	Ala	Ala	Gly	Leu	
Gly 145	Glu	Ser	Val	Ala	Ile 150	Thr	His	Gly	Pro	Tyr 155	Cys	Ser	Gln	Phe	Asn 160	
Asp	Thr	Leu	Asn 165	Val	Tyr	Leu	Thr	Ala 170	His	Asn	Ala	Leu	Gly	Ser 175	Ser	
Leu	His	Thr	Ala 180	Gly	Val	Asp	Leu	Ala 185	Lys	Ser	Leu	Arg	Ile 190	Ala	Ala	
Lys	Ile	Tyr 195	Ser	Glu	Ala	Asp	Glu 200	Ala	Trp	Arg	Lys	Ala 205	Ile	Asp	Gly	
Leu	Phe 210	Thr	Thr	Ser	Ala	Thr 215	Gly	Lys	Gly	Ala	Ala 220	Ala	Ser	Thr	Gln	
Glu 225	Gly	Lys	Ser	Gln	Pro 230	Phe	Lys	Val	Thr	Pro 235	Gly	Pro	Phe	Asp	Pro 240	
Ala	Thr	Trp	Leu	Glu 245	Trp	Ser	Arg	Gln	Trp 250	Gln	Gly	Thr	Glu	Gly 255	Asn	
Gly	His	Ala	Ala 260	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro 265	Gly	Leu	Asp	Ala	Leu	Ala	Gly	
Val	Lys 275	Ile	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu 280	Gly	Asp	Ile	Gln	Gln 285	Arg	Tyr	Met	
Lys	Asp 290	Phe	Ser	Ala	Leu	Trp 295	Gln	Ala	Met	Ala	Glu 300	Gly	Lys	Ala	Glu	
Ala 305	Thr	Gly	Pro	Leu	His 310	Asp	Arg	Arg	Phe	Ala 315	Gly	Asp	Ala	Trp	Arg 320	
Thr	Asn	Leu	Pro	Tyr 325	Arg	Phe	Ala	Ala 330	Ala	Phe	Tyr	Leu	Leu	Asn 335	Ala	

Arg Ala Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Asp Ala Lys Thr
 340 345 350
 Arg Gln Arg Ile Arg Phe Ala Ile Ser Gln Trp Val Asp Ala Met Ser
 355 360 365
 Pro Ala Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Ala Gln Arg Leu Leu Ile
 370 375 380
 Glu Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Ala Gly Val Arg Asn Met Met Glu
 385 390 395 400
 Asp Leu Thr Arg Gly Lys Ile Ser Gln Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu
 405 410 415
 Val Gly Arg Asn Val Ala Val Thr Glu Gly Ala Val Val Phe Glu Asn
 420 425 430
 Glu Tyr Phe Gln Leu Leu Gln Tyr Lys Pro Leu Thr Asp Lys Val His
 435 440 445
 Ala Arg Pro Leu Leu Met Val Pro Pro Cys Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile
 450 455 460
 Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Ser Leu Val Arg His Val Val Glu Gln
 465 470 475 480
 Gly His Thr Val Phe Leu Val Ser Trp Arg Asn Pro Asp Ala Ser Met
 485 490 495
 Ala Gly Ser Thr Trp Asp Asp Tyr Ile Glu His Ala Ala Ile Arg Ala
 500 505 510
 Ile Glu Val Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gln Asp Lys Ile Asn Val Leu
 515 520 525
 Gly Phe Cys Val Gly Gly Thr Ile Val Ser Thr Ala Leu Ala Val Leu
 530 535 540
 Ala Ala Arg Gly Glu His Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu Leu Thr Thr
 545 550 555 560
 Leu Leu Asp Phe Ala Asp Thr Gly Ile Leu Asp Val Phe Val Asp Glu
 565 570 575
 Gly His Val Gln Leu Arg Glu Ala Thr Leu Gly Gly Gly Ala Gly Ala
 580 585 590

Pro Cys Ala Leu Leu Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Thr Phe Ser Phe
 595 600 605
 Leu Arg Pro Asn Asp Leu Val Trp Asn Tyr Val Val Asp Asn Tyr Leu
 610 615 620
 Lys Gly Asn Thr Pro Val Pro Phe Asp Leu Leu Phe Trp Asn Gly Asp
 625 630 635 640
 Ala Thr Asn Leu Pro Gly Pro Trp Tyr Cys Trp Tyr Leu Arg His Thr
 645 650 655
 Tyr Leu Gln Asn Glu Leu Lys Val Pro Gly Lys Leu Thr Val Cys Gly
 660 665 670
 Val Pro Val Asp Leu Ala Ser Ile Asp Val Pro Thr Tyr Ile Tyr Gly
 675 680 685
 Ser Arg Glu Asp His Ile Val Pro Trp Thr Ala Ala Tyr Ala Ser Thr
 690 695 700
 Ala Leu Leu Ala Asn Lys Leu Arg Phe Val Leu Gly Ala Ser Gly His
 705 710 715 720
 Ile Ala Gly Val Ile Asn Pro Pro Ala Lys Asn Lys Arg Ser His Trp
 725 730 735
 Thr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ser Pro Gln Gln Trp Leu Ala Gly Ala
 740 745 750
 Ile Glu His His Gly Ser Trp Trp Pro Asp Trp Thr Ala Trp Leu Ala
 755 760 765
 Gly Gln Ala Gly Ala Lys Arg Ala Ala Pro Ala Asn Tyr Gly Asn Ala
 770 775 780
 Arg Tyr Arg Ala Ile Glu Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Val Lys Ala Lys
 785 790 795 800
 Ala His Met Val Leu Ala Val Ala Ile Asp Lys Arg Gly Gly Gly Gly
 805 810 815
 Gly Leu Glu Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala
 820 825 830
 Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu
 835 840 845

ES 2 891 973 T3

Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly
850 855 860

Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr
865 870 875 880

Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser
885 890 895

Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met
900 905 910

Phe Ala Gly Gly Gly Gly Gly Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro
915 920 925

Gln Leu Ile Ala Ser His Thr Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met
930 935 940

Arg His Thr Ile Gly Gln Ala Glu Gln Gln Ala Met Ser Ala Gln Ala
945 950 955 960

Phe His Gln Gly Glu Ser Ala Ala Ala Phe Gln Gly Ala His Ala Arg
965 970 975

Phe Val Ala Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Ile Ala Gln
980 985 990

Ala Asn Leu Gly Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala
995 1000 1005

Ala Ala Ser Ser Tyr Thr Gly Phe
1010 1015

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de polímero que comprende uno o más polipéptidos de fusión, en donde uno o más de los polipéptidos de fusión comprenden

(A) una proteína formadora de partícula y dos o más del grupo que comprende

- a. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6,
- b. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10,
- c. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, y
- d. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, o

(B) una proteína formadora de partícula y tres o más del grupo que comprende

- a. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
- b. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10,
- c. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c,
- d. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, y
- e. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c, o

(C) una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, y un antígeno Rv3615c, o

(D) una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, y un antígeno Rv3615c, en donde dicho polipéptido de fusión tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 10, o

(E) una proteína formadora de partícula y

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6; y
- ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10; y
- iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c, y
- iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c, o

(F) una proteína formadora de partícula, un antígeno ESAT6, un antígeno CFP10, un antígeno Rv3615c, y un antígeno Rv3020c.

2. La partícula de polímero de la reivindicación 1, en donde la partícula de polímero comprende al menos un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula y dos o más del grupo que comprende

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
 - ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
 - iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
 - iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
 - v. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c;
- y al menos un polipéptido de fusión que comprende una proteína formadora de partícula y uno o más del grupo que comprende
- vi. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
 - vii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
 - viii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
 - ix. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
 - x. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c.

3. La partícula de polímero de la reivindicación 2, en donde el polipéptido de fusión que comprende uno o más antígenos de los grupos (vi) a (x) es diferente del polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos de los grupos (i) a (v).

4. La partícula de polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde cuando está presente el antígeno ESAT6 comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y cuando está presente el antígeno CFP10 comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y cuando está presente el antígeno Rv3615c comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y cuando está presente el antígeno Rv3020c comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y cuando está presente el antígeno Rv2346c comprende 10 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

5. La partícula de polímero de la reivindicación 4, en donde cuando está presente el antígeno ESAT6 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y cuando está presente el antígeno CFP10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y cuando está presente el antígeno Rv3615c comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y cuando está presente el antígeno Rv3020c comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 4, y cuando está presente el antígeno Rv2346c comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

6. Una composición que comprende una o más partículas de polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un vehículo.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6 en donde la composición comprende dos o más poblaciones de partículas de polímero, en donde una población de partículas de polímero comprende uno o más polipéptidos de fusión que comprenden una proteína formadora de partícula y dos o más del grupo que comprende

- i. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
 - ii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
 - iii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
 - iv. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
 - v. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c;
- y una población de partículas de polímero comprende uno o más polipéptidos de fusión que comprenden una proteína formadora de partícula y uno o más del grupo que comprende
- vi. un antígeno ESAT6 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno ESAT6;
 - vii. un antígeno CFP10 o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno CFP10;
 - viii. un antígeno Rv3615c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3615c;
 - ix. un antígeno Rv3020c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv3020c; y
 - x. un antígeno Rv2346c o un dominio de unión capaz de unirse a un antígeno Rv2346c;

en donde uno o más de los polipéptidos de fusión presentes en una población de partículas de polímero son diferentes de uno o más de los polipéptidos de fusión presentes en otra población de partículas de polímero.

8. Un reactivo de diagnóstico que comprende una o más partículas de polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, preferentemente para administración tópica.

9. El reactivo de diagnóstico de la reivindicación 8, en donde el reactivo de diagnóstico

- (A) se formula para proporcionar menos de 10 microgramos de antígeno total por dosis,
- (B) comprende menos de 5 µg de antígeno total por dosis,
- (C) se formula para proporcionar menos de 5 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis,
- (D) se formula para proporcionar menos de 1 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis,
- (E) se formula para proporcionar menos de 5 µg de cada antígeno presente por dosis,
- (F) comprende menos de 5 µg de cada antígeno presente por dosis,
- (G) comprende menos de 1 µg de cada antígeno presente por dosis,
- (H) comprende menos de 0,5 µg de uno o más de los antígenos presentes por dosis,
- (I) comprende menos de 0,5 µg de cada antígeno presente por dosis,
- (J) comprende menos de 50 ng de cada antígeno presente por dosis,
- (K) se formula para proporcionar menos de 50 ng de antígeno total por dosis, o
- (L) se formula para proporcionar menos de 10 ng de antígeno total por dosis.

10. Al menos una partícula de polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, una composición de la reivindicación 6 o 7, o un reactivo de la reivindicación 8 o 9, para uso en un método para diagnosticar tuberculosis en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de la al menos una partícula de polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la composición de la reivindicación 6 o 7, o el reactivo de la reivindicación 8 o 9, y detectar una respuesta inmunitaria en el sujeto, en donde la presencia de una respuesta inmunitaria es indicativa de tuberculosis.

11. La al menos una partícula de polímero, la composición, o el reactivo para el uso de la reivindicación 10, en donde la administración es tópica, preferentemente mediante punción cutánea.

12. Un método para detectar *M. tuberculosis* o *M. bovis* en una muestra de un sujeto, comprendiendo el método proporcionar una muestra de un sujeto, poner en contacto la muestra con al menos una partícula de polímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, una composición de la reivindicación 6 o 7, o un reactivo de la reivindicación 8 o 9, y detectar una respuesta indicativa de la presencia de uno o más antígenos de *M. tuberculosis* en la muestra, en donde una respuesta indicativa de la presencia de uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* es indicativa de *M. tuberculosis* o *M. bovis* en el sujeto.

13. El método de la reivindicación 12, en donde la respuesta indicativa de la presencia de uno o más antígenos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* es

- (A) una detección de la presencia de un anticuerpo frente a *M. tuberculosis* o *M. bovis* en dicha muestra, o

(B) una detección de la presencia de una célula inmunitaria sensible a *M. tuberculosis* o *M. bovis* en dicha muestra.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde la detección es mediante inmunoensayo, mediante ELISA, radioinmunoensayo, o transferencia de Western, mediante ensayo de citoquinas, o es de interferón-gamma.

5 15. El método de la reivindicación 13, en donde la presencia de una célula inmunitaria sensible a *Mycobacterium tuberculosis* o *M. bovis* se detecta mediante un ensayo de proliferación celular, un ensayo de clasificación celular incluyendo FACS, o un ensayo de hibridación *in situ*.

10

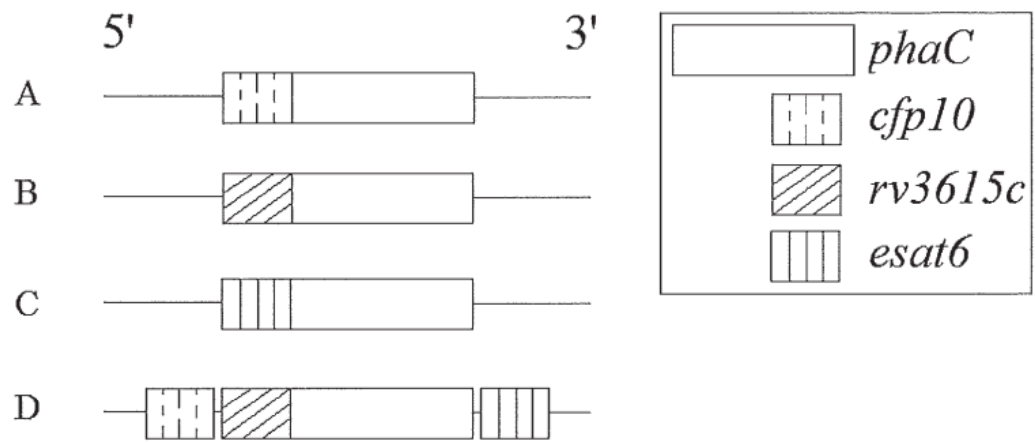


FIGURA 1

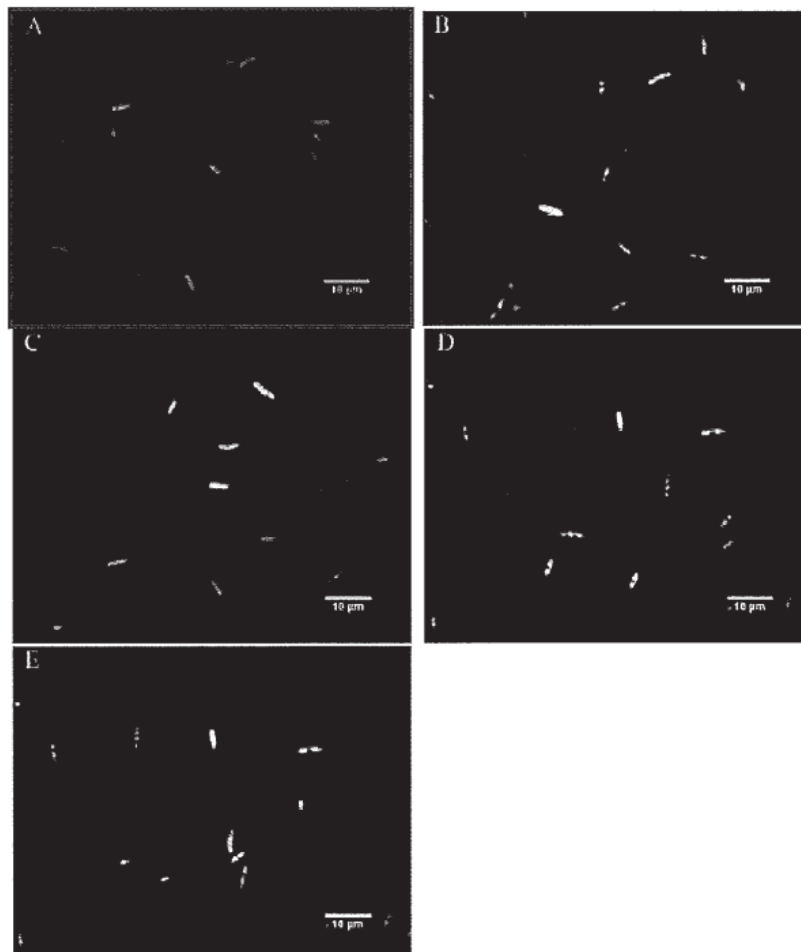


FIGURA 2

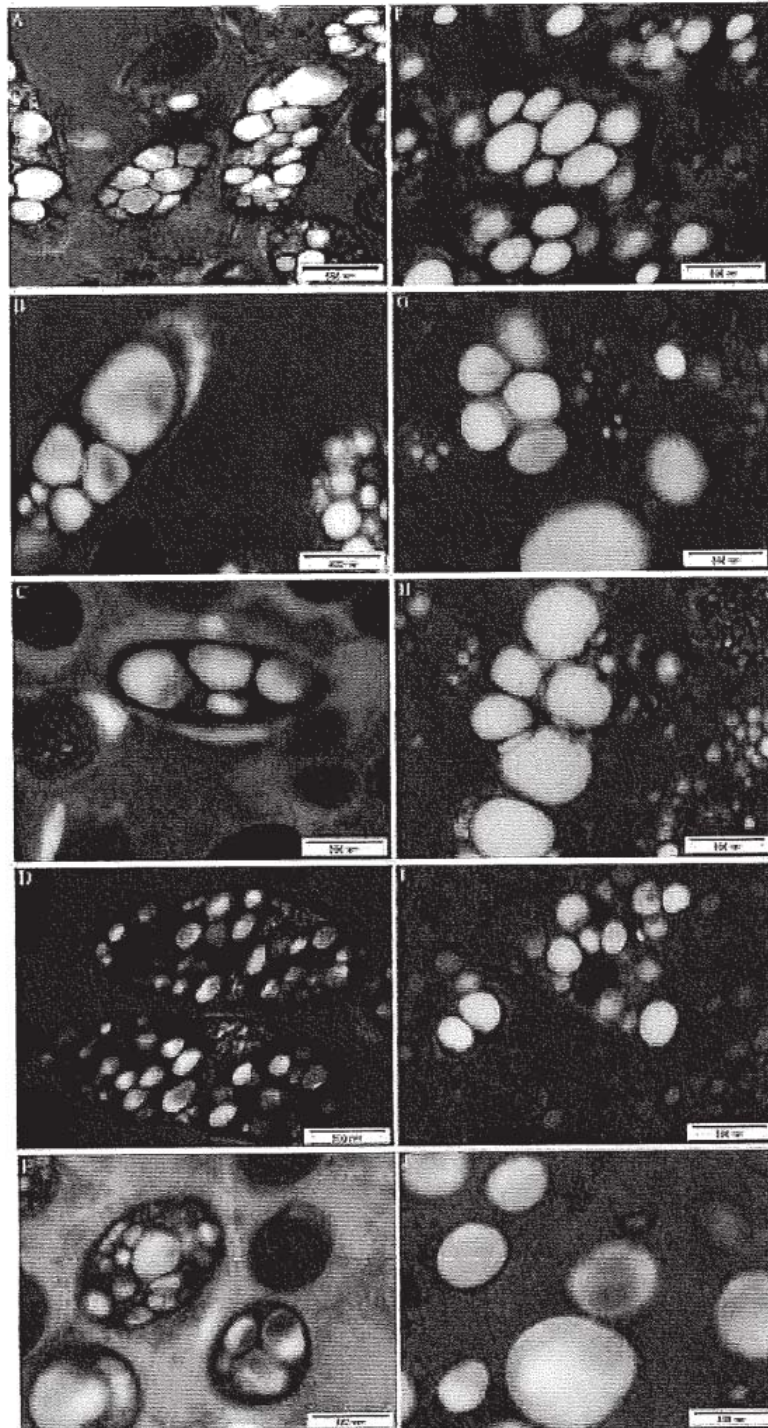


FIGURA 3

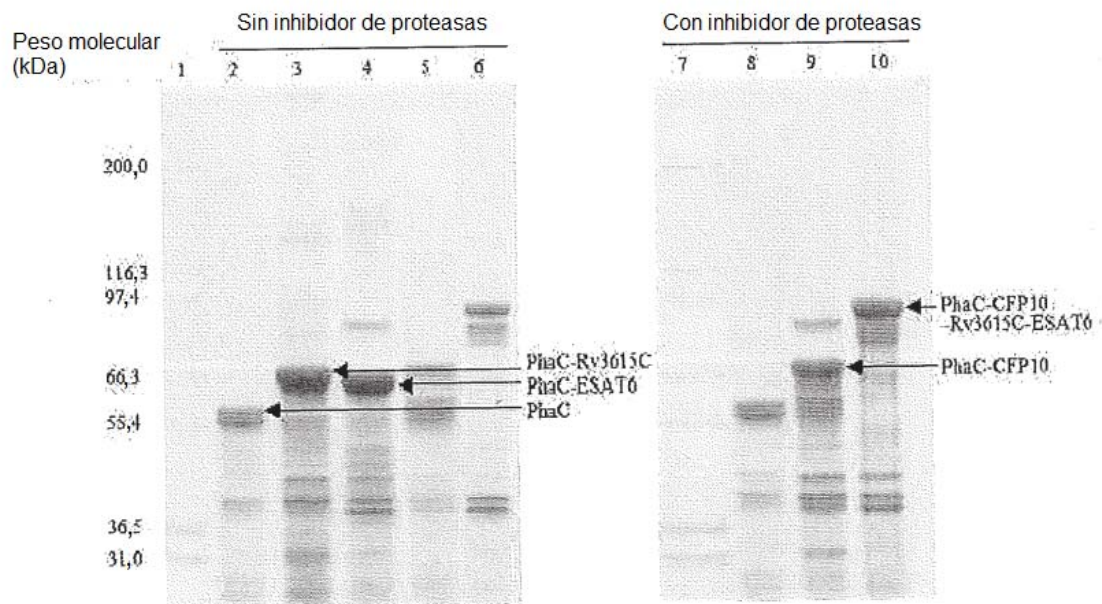


FIGURA 4

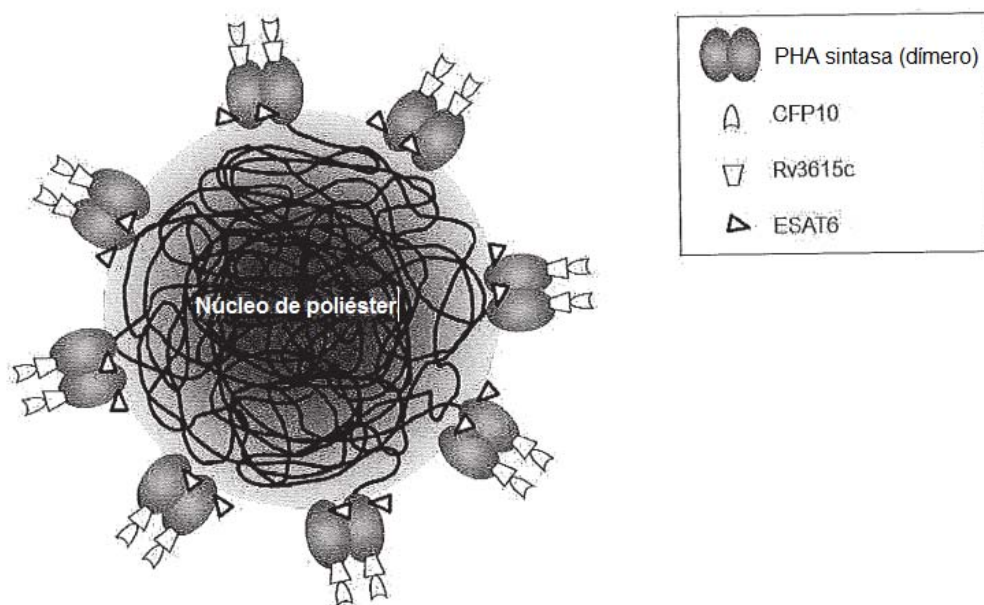


FIGURA 5

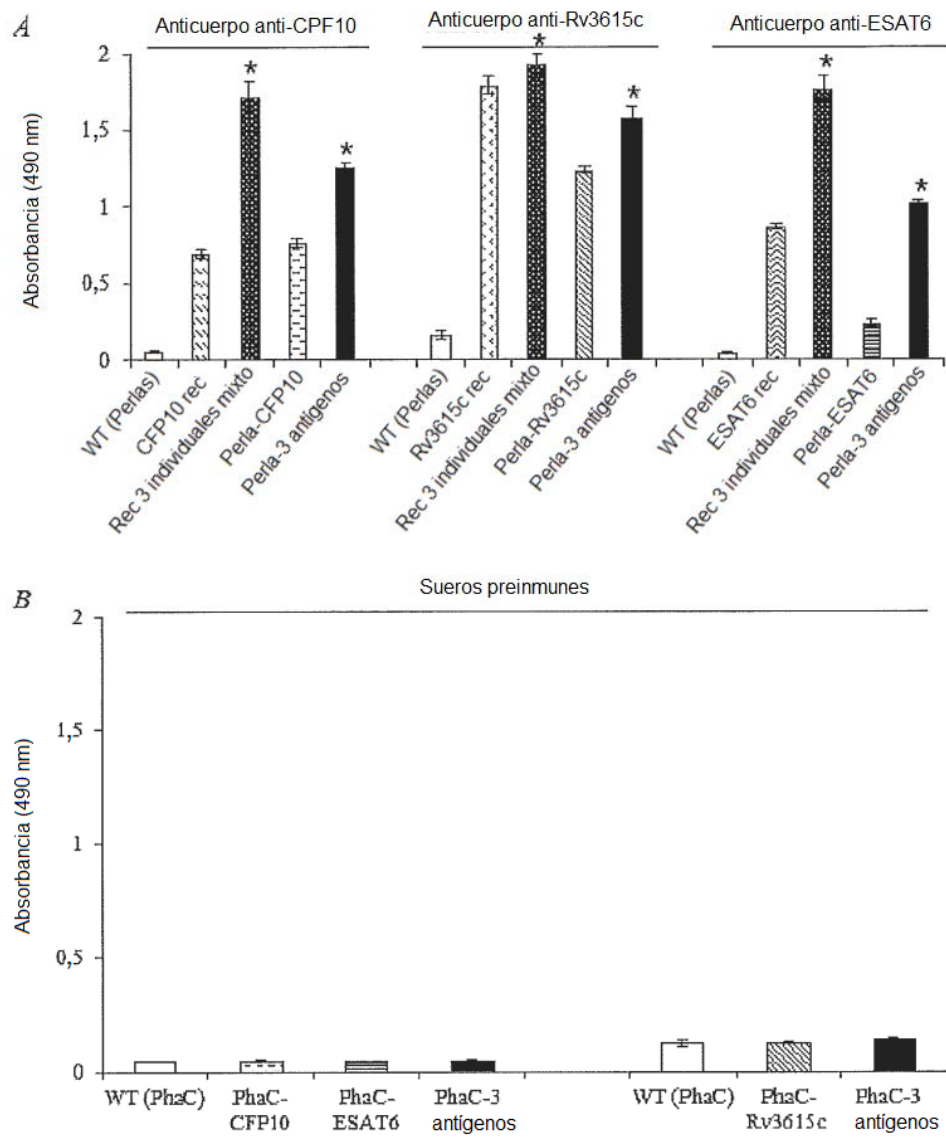


FIGURA 6

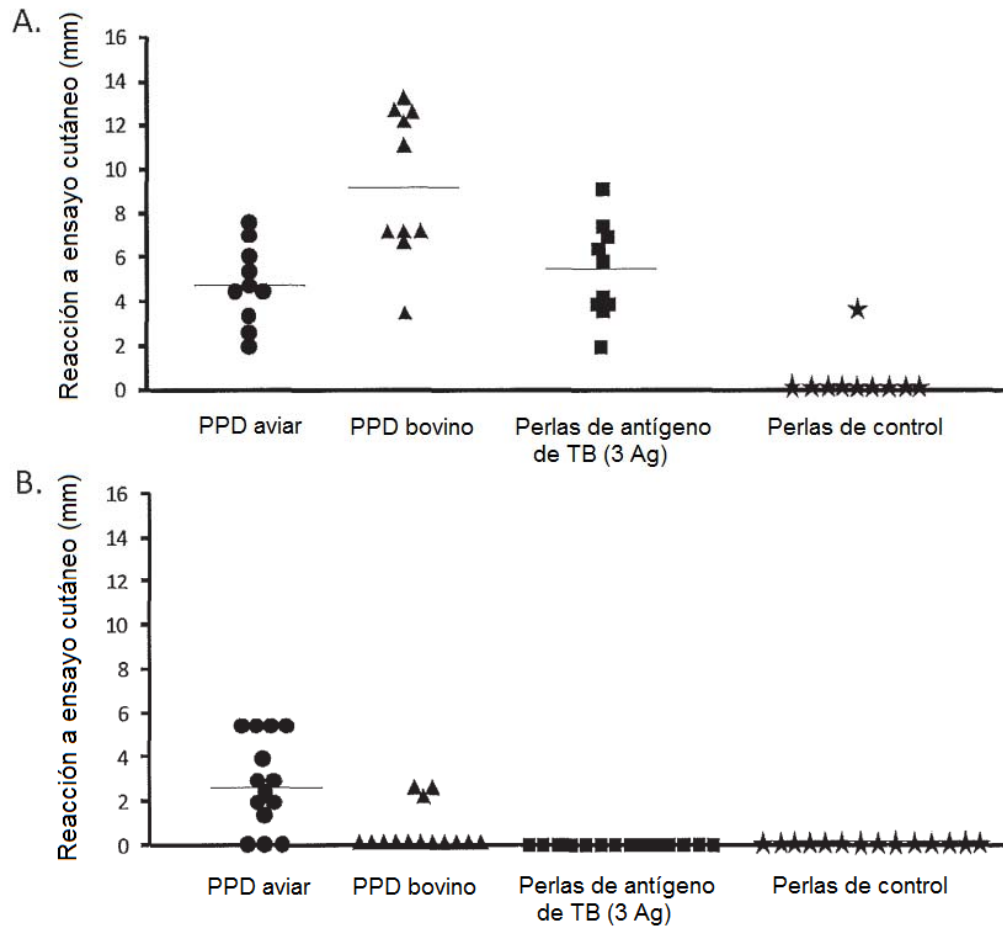


FIGURA 7

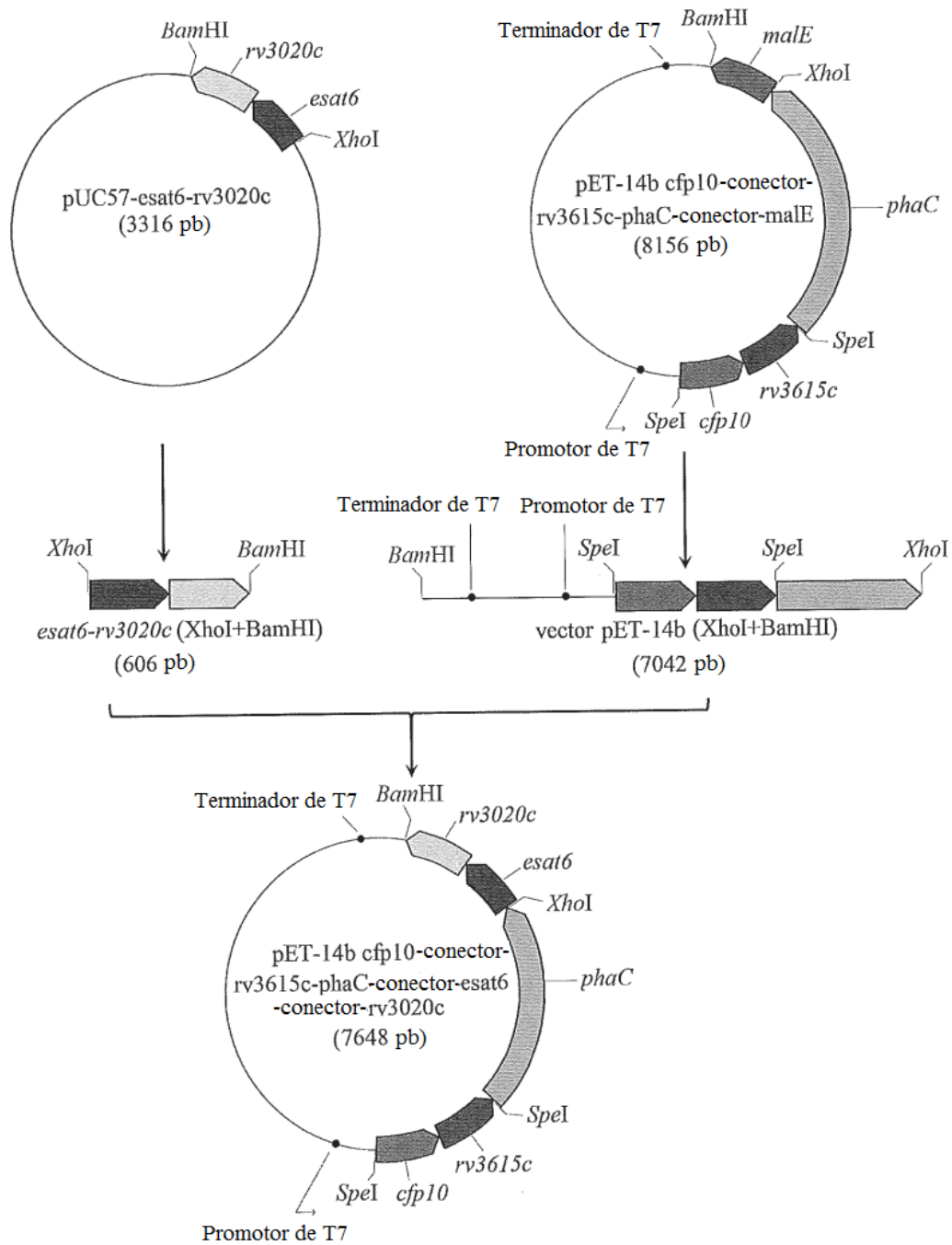


FIGURA 8

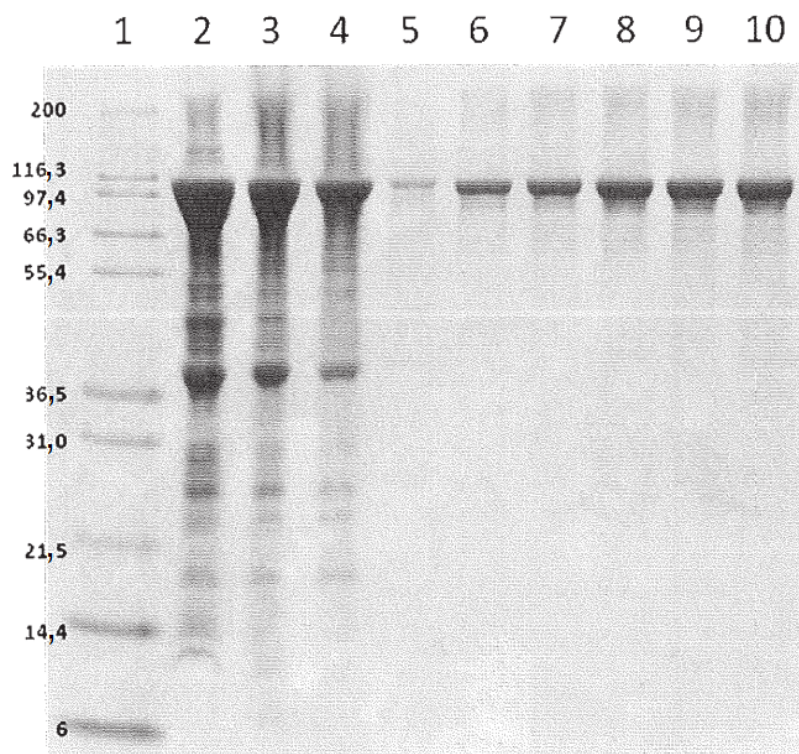


FIGURA 9

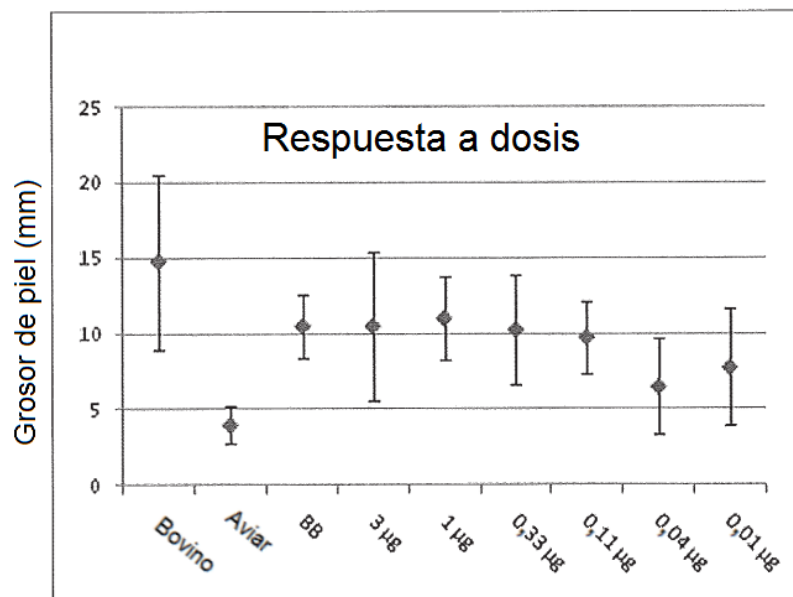


FIGURA 10

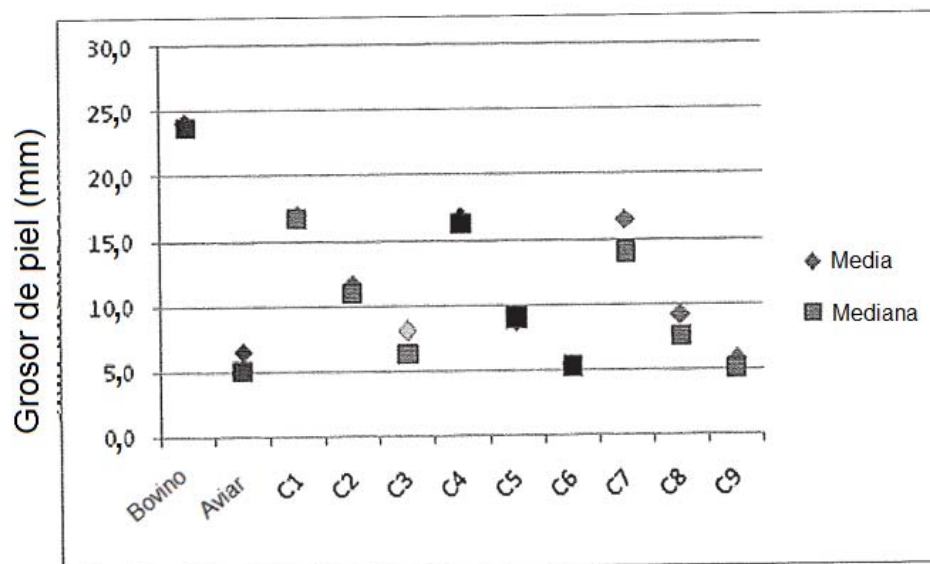


FIGURA 11

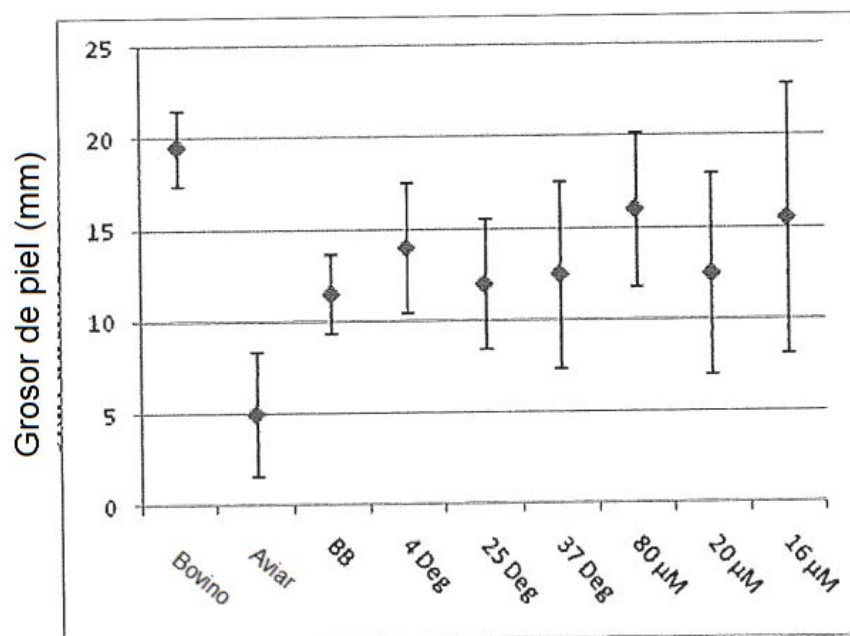


FIGURA 12

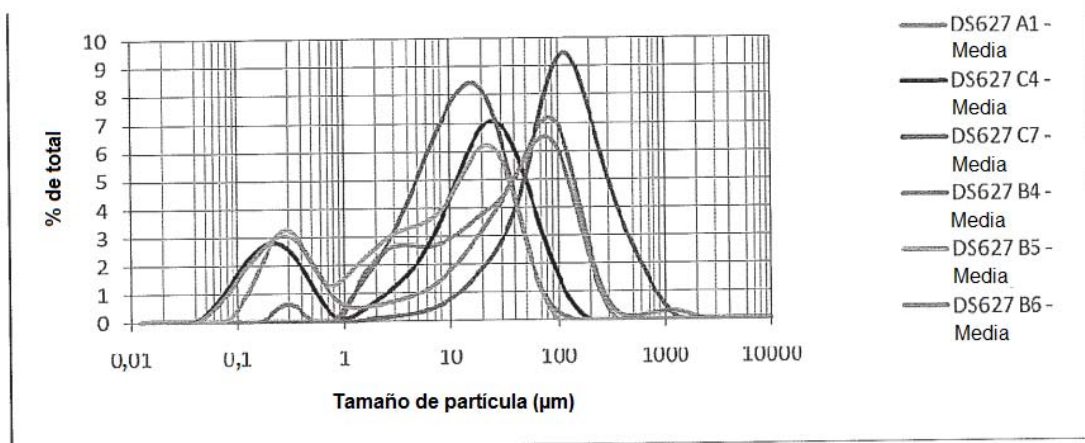


FIGURA 13A

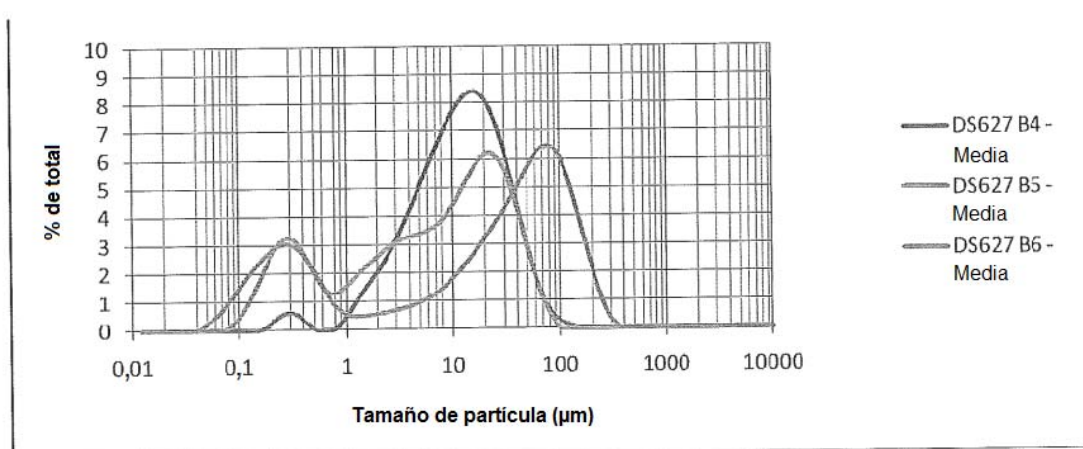


FIGURA 13B

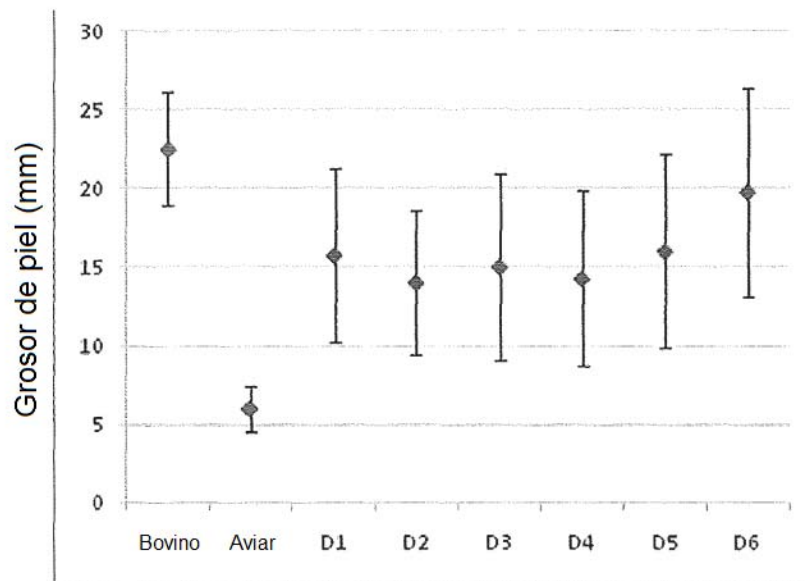
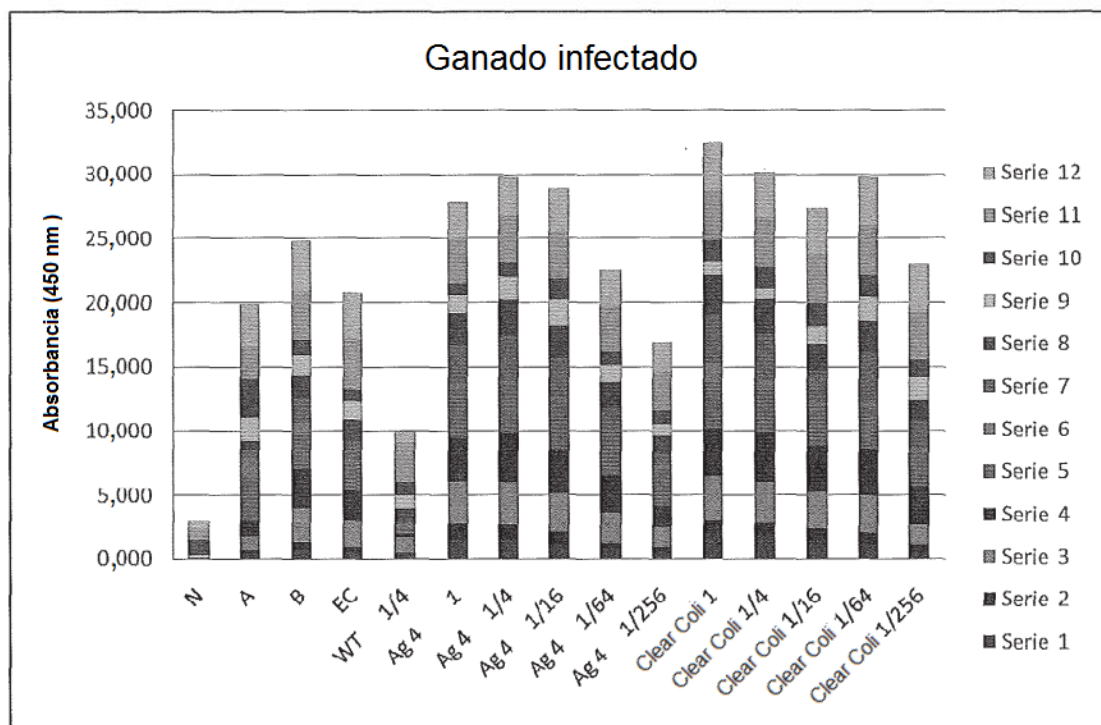


FIGURA 14



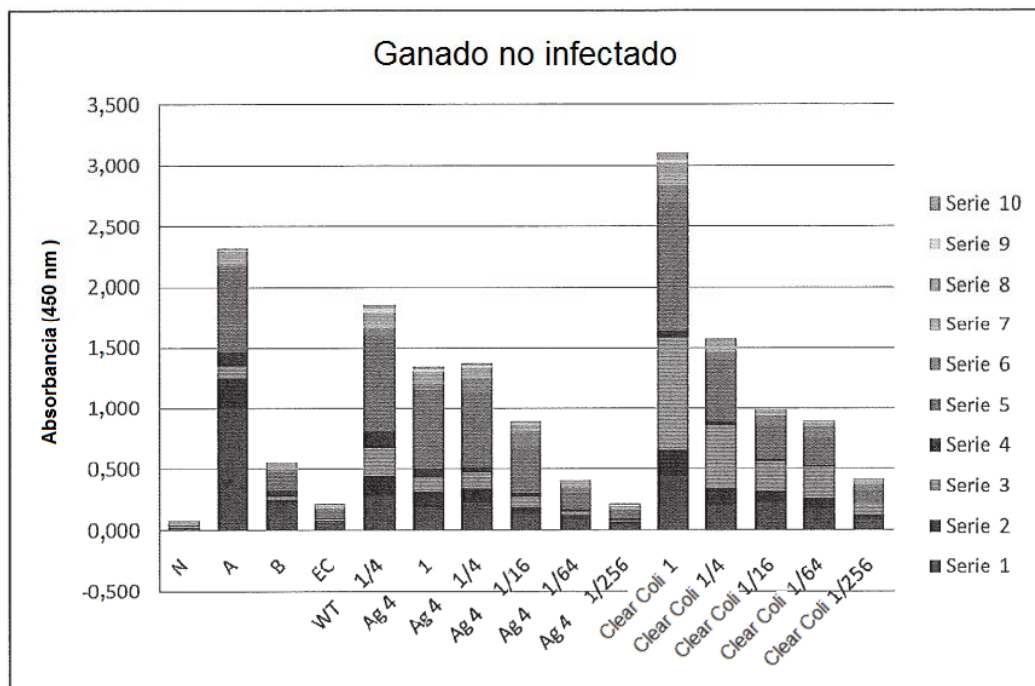


FIGURA 16