



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 291 810**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/31** (2006.01)

**A61K 39/04** (2006.01)

**C07K 14/35** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07K 16/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04076605 .7**

86 Fecha de presentación : **01.04.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1449922**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54 Título: **Fragmentos de ácido nucleico y fragmentos de polipéptidos derivados de *M. tuberculosis*.**

30 Prioridad: **02.04.1997 DK 376/97**  
**18.04.1997 US 44624 P**  
**10.11.1997 DK 1277/97**  
**05.01.1998 US 70488 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2008**

73 Titular/es: **Statens Serum Institut**  
**Artillerivej 5**  
**2300 Copenhagen S, DK**

72 Inventor/es: **Andersen, Peter;**  
**Florio, Walter;**  
**Oettinger, Thomas;**  
**Rasmussen, Peter Birk;**  
**Rosenkrands, Ida;**  
**Skjöt, Rikke Louise Vinther y**  
**Weldingh, Karin**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

**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

Fragmentos de ácido nucleico y fragmentos de polipéptidos derivados de *M. tuberculosis*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una serie de fragmentos de polipéptidos novedosos, inmunológicamente activos derivados del antígeno CFP7 de la *Mycobacterium tuberculosis*, vacunas y otras composiciones inmunológicas que contienen los fragmentos como componentes inmunogénicos, y procedimientos de producción y uso de los polipéptidos. La invención se refiere también a fragmentos novedosos de ácidos nucleicos derivados del antígeno CFP7 de la *M. tuberculosis* los cuales son útiles en la preparación de los fragmentos de polipéptidos de la invención o en la diagnosis de la invención con *M. tuberculosis*.

15 **Antecedentes de la invención**

La tuberculosis humana (de ahora en adelante designada "TB") causada por *M. tuberculosis* es un problema de salud global grave responsable de aproximadamente 3 millones de muertos anualmente, de acuerdo con la OMS. La incidencia mundial de nuevos casos de TB había estado cayendo progresivamente durante la última década pero en años recientes esta tendencia ha cambiado marcadamente debido al advenimiento del SIDA y a la aparición de cepas multifarmacorresistentes de *M. tuberculosis*.

La única vacuna disponible actualmente para uso clínico es BCG, una vacuna cuya eficacia permanece como una materia de controversia. La BCG generalmente induce un nivel alto de resistencia adquirida en modelos animales de TB, pero varios ensayos en humanos en países en desarrollo han fallado en demostrar protección significativa. Notablemente, BCG no está aprobada por la FDA para usar en los Estados Unidos.

Esto hace al desarrollo de una vacuna nueva y mejorada contra TB una materia urgente a la cual se ha dado una prioridad muy alta por la OMS. Se han hecho muchos intentos para definir sustancias micobacterianas protectoras, y de 1950 a 1970 varios investigadores comunicaron una resistencia incrementada después de vacunación experimental. Sin embargo, la demostración de una respuesta inmune de largo plazo específica con la potencia de BCG no se ha logrado aún mediante la administración de proteínas solubles o fragmentos de pared celular, aunque se están haciendo progresos actualmente que dependen de polipéptidos derivados de filtrado de cultivos de corto plazo, compárese con la discusión más adelante.

La inmunidad a *M. tuberculosis* se caracteriza por tres características básicas: i) los bacilos vivos inducen eficientemente una respuesta inmune protectora en contraste con preparaciones matadas, ii) los linfocitos T específicamente sensibilizados median esta protección; iii) la molécula mediadora más importante parece ser interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

El filtrado de cultivo de corto plazo (ST-CF) es una mezcla compleja de proteínas liberada de *M. tuberculosis* durante los primeros pocos días de crecimiento en un medio líquido (Andersen y col., 1991). Se ha sugerido que los filtrados de cultivo mantienen antígenos protectores reconocidos por el huésped en la primera fase de la infección por TB (Andersen y col., 1991, Orme y col, 1993). Los datos recientes de valores laboratorios han demostrado que vacunas de subunidades experimentales basadas en antígenos de filtrado de cultivo pueden proporcionar niveles altos de resistencia adquirida a TB (Pal y Horwitz, 1992; Roberts y col., 1995; Andersen, 1994; Lindblad y col., 1997). Los filtrados en cultivo son, sin embargo, mezclas de proteínas complejas y hasta ahora ha estado disponible información muy limitada sobre las moléculas responsables de esta respuesta inmune protectora. A este respecto, sólo dos antígenos de filtrado de cultivo se han descrito como implicados en inmunidad protectora, el antígeno de masa baja ESAT-6 (Andersen y col, 1995 y documento EP-A-0 706 571) y la molécula de 31 kDa Ag85B (documento EP-0 432 203).

Hay por lo tanto una necesidad para la identificación de antígenos adicionales implicados en la inducción de inmunidad protectora contra TB con el fin de producir eventualmente una vacuna de subunidad efectiva.

El documento WO 97709428 (Corixa Corp.) 13 de marzo de 1997 y el documento WO 97/09429 (Corixa Corp.) 13 de marzo de 1997 describen ambas secuencias de ácidos nucleicos y sus polipéptidos correspondientes, entre ellos ESAT6, derivados de *Mycobacterium tuberculosis* y su uso para inmunización y diagnóstico de infección con *M. tuberculosis*. Los polipéptidos de la presente invención tienen una identidad de secuencia general de 29,2% con el polipéptido ESAT6. La identidad más alta, a saber 71,4% se encontró en un solapamiento de 7 aminoácidos.

60 **Objeto de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar antígenos novedosos los cuales son efectivos como componentes en una vacuna de subunidades contra TB o los cuales son útiles como componentes en composiciones diagnósticas para la detección de infección con micobacterias, especialmente micobacterias asociadas a virulencia. Los antígenos novedosos pueden ser también importantes objetivos de fármacos.

## Sumario de la invención

La presente invención se basa entre otras cosas en la identificación y caracterización de un número de antígenos de filtrado de cultivo previamente no caracterizados de *M. tuberculosis*. En modelos animales de TB, las células T que median inmunidad se centraron predominantemente en antígenos en las regiones de 6-12 y de 17-30 KDa de STCF. En la presente invención se ha identificado un antígeno en la región de peso molecular bajo (CFP7).

Se ha determinado el gen que codifica para el antígeno, se ha investigado la distribución del antígeno en diversas cepas micobacterianas y se ha caracterizado la actividad biológica del producto. El antígeno tiene potencial para propósitos de vacuna así como para propósitos diagnósticos, dado que el antígeno se segrega por micobacterias metabolizantes.

La siguiente tabla lista el antígeno de la invención por el nombre usado en el presente documento así como mediante referencia a SEQ ID N<sup>os</sup>. de secuencia de aminoácidos completa y de secuencia de ADN que codifica el antígeno:

Antígeno	SEQ ID N <sup>o</sup> . de secuencia N- terminal:	SEQ ID N <sup>o</sup> . de secuencia de nucleótidos:	SEQ ID N <sup>o</sup> . de secuencia de aminoácidos
CFP7		1	2

Se conoce bien en la técnica que los epitopos de las células T son responsables de la provocación de inmunidad adquirida contra TB, mientras que los epitopos de las células B están sin influencia significativa alguna en inmunidad adquirida y reconocimiento adquirido de micobacterias *in vivo*. Dado que tales epitopos de células T son lineales y se conocen por tener una longitud mínima de 6 residuos de aminoácidos, la presente invención está especialmente implicada con la identificación y utilización de tales epitopos de células T.

Así, en su aspecto más amplio la invención se refiere a un fragmento de polipéptido sustancialmente puro el cual

- comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID N<sup>o</sup>.: 2,
- comprende una subsecuencia de aminoácidos del fragmento de polipéptido definido en a) el cual tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácido, siendo dicha subsecuencia inmunológicamente equivalente al polipéptido definido en a) con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune protectora contra infecciones con micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis o con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune significativa diagnósticamente que indica sensibilización previa o sensibilización en curso con antígenos derivados de micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis, o
- comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia con el polipéptido definido en a) o la subsecuencia definida en b) de al menos el 80% y que al mismo tiempo es inmunológicamente equivalente al polipéptido definido en a) con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune protectora contra infecciones con micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis o con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune significativa diagnósticamente que indica sensibilización previa o sensibilización en curso con antígenos derivados de micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis,

dicha preparación contiene como máximo un 5% en peso de otro material polipeptídico con el cual el fragmento de polipéptido está asociado de forma nativa, con la condición de que, cuando está constituido por la secuencia de aminoácidos 1-96 de SEQ. ID N<sup>o</sup>.: 2, el fragmento de polipéptido esté libre de cualquier otro antígeno de bacterias que pertenezca al complejo de tuberculosis.

Otras partes de la invención se refieren a los fragmentos que codifican un polipéptido con la definición anterior así como a los fragmentos de ADN útiles para determinar la presencia de ADN que codifica tales polipéptidos.

## Descripción detallada de la invención

En la presente memoria descriptiva y las presentes reivindicaciones, el término "fragmento de polipéptido" indica tanto péptidos cortos con una longitud de al menos dos residuos de aminoácidos y como máximo 10 residuos de aminoácidos, oligopéptidos (11-1000 residuos de aminoácidos), y péptidos más largos (la interpretación usual de "polipéptido", es decir más de 100 residuos de aminoácido en longitud) así como proteínas (la entidad funcional que comprende al menos un péptido, oligopéptido, o polipéptido el cual puede estar modificado químicamente glucosilándose, lipidizándose, o comprendiendo grupos prostéticos). La definición de polipéptidos comprende también formas nativas de péptidos/proteínas en micobacterias así como proteínas o péptidos recombinantes en cualquier tipo de vectores de expresión que transforman cualquier clase de huésped, y también péptidos sintetizados químicamente.

## ES 2 291 810 T3

En el presente contexto el término “fragmento de polipéptido sustancialmente puro” significa una preparación polipeptídica la cual contiene como máximo el 5% en peso de material polipeptídico distinto con el cual está asociado de forma nativa (se prefieren porcentajes más bajos de material polipeptídico distinto, por ejemplo como máximo el 4%, como máximo el 3%, como máximo el 2%, como máximo el 1%, y como máximo el 0,5%). Se prefiere que el polipéptido sustancialmente puro esté al menos puro al 96%, es decir que el polipéptido constituya al menos el 96% en peso del material polipeptídico total presente en la preparación, y se prefieren porcentajes más altos, tales como al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, al menos el 99,25%, al menos el 99,5%, y al menos el 99,75%. Se prefiere especialmente que el fragmento de polipéptido esté en “forma esencialmente pura”, es decir que el fragmento de polipéptido esté esencialmente libre de cualquier otro antígeno con el cual esté asociado de forma nativa, es decir libre de cualquier otro antígeno de bacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis. Esto puede llevarse a cabo preparando el fragmento de polipéptido por medio de procedimientos recombinantes en una célula huésped no micobacteriana como se describirá en detalle más adelante, o sintetizando el fragmento de polipéptido mediante los procedimientos bien conocidos de síntesis de péptidos en fase sólida o líquida, por ejemplo mediante el procedimiento descrito por Merrifield o variaciones del mismo.

El término “subsecuencia” cuando se usa en conexión con un polipéptido de la invención que tiene SEQ ID N°.: 2 indica cualquier tramo continuo de al menos 12 residuos de aminoácidos tomados del polipéptido derivado de *M. tuberculosis* en SEQ ID N°.: 2 y que es equivalente inmunológico a esto con respecto a la capacidad de conferir resistencia incrementada a infecciones con bacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis. Así, está incluido también un polipéptido de fuentes diferentes, tal como otras bacterias o incluso de células eucariotas.

Cuando se hace referencia a un polipéptido “inmunológicamente equivalente” se quiere decir en el presente documento que el polipéptido, cuando se formula en un agente de vacuna o en un agente diagnóstico (es decir conjuntamente con un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un coadyuvante),

I) conferirá, tras administración (bien solo o bien como un constituyente inmunológicamente activo conjuntamente con otros antígenos), una resistencia específica incrementada adquirida en un ratón y/o en un conejillo de Indias y/o en un primate tal como un ser humano contra infecciones con bacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis la cual es al menos el 20% de la resistencia incrementada adquirida conferida por BCG de *Mycobacterium bovis* y también al menos el 20% de la resistencia incrementada adquirida conferida por el polipéptido parental que comprende SEQ ID N°.: 2 (teniendo dicho polipéptido parental sustancialmente la misma localización y patrón relativos en un gel 2DE preparado como el gel 2DE en figura 6, compárese con los ejemplos), valorándose la resistencia adquirida incrementada mediante la reducción observada en cuentas micobacterianas a partir de homogenados aislados de bazo, pulmón u otro órgano aislados del ratón o conejillo de Indias que recibe una infección para ponerle a prueba con una cepa virulenta de *M. tuberculosis* o, en un primate tal como un ser humano, valorándose determinando la protección contra el desarrollo de tuberculosis clínica en un grupo vacunado frente a aquella observada en un grupo control que recibe un placebo de BCG (preferiblemente la resistencia incrementada es más alta y corresponde al menos al 50% de la respuesta inmune protectora provocada por BCG de *M. bovis*, tal como al menos el 60%, o incluso más preferido a al menos el 80% de la respuesta inmune protectora provocada por BCG de *M. bovis*, tal como al menos el 90%; en algunos casos se espera que la resistencia incrementada suplante aquella conferida por BCG de *M. bovis*, y así se prefiere que la resistencia sea al menos del 100%, tal como al menos el 110% de dicha resistencia incrementada); y/o

II) provocará una respuesta inmune diagnósticamente significativa en un mamífero indicando sensibilización previa o en curso con antígenos derivados de micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis; esta respuesta inmune diagnósticamente significativa puede estar en forma de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado la cual puede por ejemplo determinarse mediante una prueba cutánea, o puede estar en forma de liberación de IFN- $\gamma$  determinada por ejemplo mediante un ensayo de IFN- $\gamma$  como se describe en detalle más adelante. Una respuesta diagnósticamente significativa en un montaje de prueba cutánea será una reacción la cual ocasionará una reacción cutánea la cual es al menos de 5 mm de diámetro y la cual es al menos el 65% (preferiblemente al menos el 75% tal como al menos el 85%) de la reacción cutánea (valorada como el diámetro de reacción cutánea) provocada por el polipéptido parental que comprende SEQ ID N°.:2.

La capacidad del fragmento de polipéptido para conferir inmunidad incrementada puede así valorarse midiendo en un animal experimental, por ejemplo un ratón o un conejillo de Indias, la reducción en cuentas micobacterianas de homogenados del bazo, pulmón u otro órgano aislados del animal experimental el cual ha recibido una infección para ponerle a prueba con una cepa virulenta de micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis después de haberse inmunizado previamente con el polipéptido, según se compara con las cuentas micobacterianas en un grupo control de animales experimentales infectados con la misma cepa virulenta, animales experimentales los cuales no han sido inmunizados previamente contra tuberculosis. La comparación de las cuentas micobacterianas se puede también llevar a cabo con cuentas micobacterianas de un grupo de animales experimentales que reciben una infección para ponerles a prueba con la misma cepa virulenta después de haber sido inmunizados con *Mycobacterium bovis*.

Las cuentas micobacterianas en homogenados a partir de los animales experimentales inmunizados con un fragmento de polipéptido de acuerdo con la presente invención deben ser 5 veces las cuentas como máximo en los ratones o conejillos de Indias inmunizados con BCG de *Mycobacterium bovis*, tal como 3 veces las cuentas como máximo, y preferiblemente 2 veces las cuentas como máximo.

Una valoración más relevante de la capacidad del fragmento de polipéptido de la invención para conferir resistencia incrementada es comparar la incidencia de la tuberculosis clínica en dos grupos de individuos (por ejemplo seres humanos y otros primates) donde un grupo recibe una vacuna como se describe en el presente documento la cual contiene un antígeno de la invención y el otro grupo recibe bien un placebo o bien otra vacuna de TB conocida (por ejemplo BCG). En un montaje tal, el antígeno de la invención ocasionaría una inmunidad protectora la cual es significativamente más alta que la proporcionada por la administración del placebo (como se determina mediante procedimientos estadísticos conocidos por el trabajador experto).

El “complejo de tuberculosis” tiene su significado usual, por ejemplo el complejo de micobacterias que causa TB las cuales son *Mycobacterium tuberculosis*, BCG de *Mycobacterium bovis*, y *Mycobacterium africanum*.

En el presente contexto, el término “micobacterias metabolizadoras” significa micobacterias vivas que se multiplican logarítmicamente y liberan polipéptidos dentro del medio de cultivo en el que ellas se cultivan.

El término “identidad de secuencia” indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos de igual longitud: la identidad de secuencia se puede calcular como  $(N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}})^{100}/N_{\text{ref}}$ , en la que

$N_{\text{dif}}$  es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y en la que  $N_{\text{ref}}$  es el número de residuos en una de las secuencias. Así, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia del 75%, con la secuencia AATCAATC ( $N_{\text{dif}} = 2$  y  $N_{\text{ref}} = 8$ ).

La identidad de secuencia se usa aquí para ilustrar el grado de identidad entre la secuencia de aminoácidos de un polipéptido dado y la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 2. La secuencia de aminoácidos para compararse con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°: 2 se puede deducir a partir de una secuencia de ADN, obtenida por ejemplo mediante hibridación, como se define anteriormente, o se puede obtener mediante procedimientos de secuenciación de aminoácidos convencionales. La identidad de secuencia se determina preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido maduro, es decir sin tomar ninguna secuencia líder en consideración.

Como parece a partir de la siguiente discusión, los polipéptidos los cuales no son idénticos a los polipéptidos que tienen SEQ ID N°: 2 están abarcados por la presente invención. La invención permite variaciones menores las cuales no tendrán un efecto adverso en inmunogenicidad comparadas con las secuencias parentales y las cuales darán propiedades de unión novedosas interesantes y útiles o funciones biológicas e inmunogenicidades novedosas interesantes y útiles, etc.

Cada fragmento de polipéptido puede caracterizarse así mediante secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos específicas. Se entenderá que tales secuencias incluyen análogos y variantes producidas mediante procedimientos recombinantes en los que tales secuencias de ácidos nucleicos y polipeptídicas se han modificado mediante sustitución, inserción, adición o delección de uno o más nucleótidos en dichas secuencias de ácidos nucleicos para causar la sustitución, inserción, adición o delección de uno o más residuos aminoácidos en el polipéptido recombinante. Cuando el término ADN se usa en lo siguiente, se entenderá que para la serie de propósitos donde el ADN puede sustituirse con ARN, el término ADN debería interpretarse para incluir realizaciones con ARN las cuales pueden ser patentes para el hombre experto en la técnica. Para los propósitos de hibridación, APN puede usarse en vez de ADN, ya que APN ha mostrado presentar un perfil de hibridación muy dinámica (APN se describe en Nielsen, P. E. y col., 1991, Science 254: 1497-1500).

En tales inmunodiagnósticos y preparación de vacunas, es a menudo posible y práctico preparar antígenos a partir de segmentos de una proteína o polipéptido inmunogénico conocido. Ciertas regiones epitópicas se pueden usar para producir respuestas similares a aquellas producidas por el polipéptido antigénico completo. Las regiones antigénicas e inmunogénicas potenciales se pueden identificar mediante cualquiera de una serie de aproximaciones, por ejemplo, los análisis de antigenicidad de Jameson-Wolf o Kyte-Doolittle o los análisis de hidrofobicidad de Hoop y Woods (1981) (véase, por ejemplo, Jameson y Wolf, 1988; Kyte y Doolittle, 1982; o Patente de los Estados Unidos N°: 4.444.101). Los análisis de hidrofobicidad asignan valores de hidrofobicidad promedio a cada resto de aminoácido a partir de éstos valores se pueden calcular hidrofobicidades promedio y se pueden determinar las regiones de hidrofobicidad más grande. Usando uno o más de estos procedimientos, las regiones de antigenicidad predecida pueden derivarse de la secuencia de aminoácidos asignada a los polipéptidos de la invención.

Alternativamente, con el fin de identificar los epitopos de células T relevantes los cuales son reconocidos durante una respuesta inmune, es también posible usar un procedimiento de “fuerza bruta”: dado que los epitopos de células T son lineales, los mutantes de delección del polipéptido que tienen SEQ ID N°: 2 revelarán, si se construyen sistemáticamente, qué regiones de los polipéptidos son esenciales en reconocimiento inmune, por ejemplo, sometiendo estos mutantes de delección al ensayo de IFN- $\gamma$  descrito anteriormente. Otro procedimiento utiliza oligómeros sobrelapantes (preferiblemente sintéticos que tienen una longitud de 20 residuos de aminoácidos) derivados del polipéptido que tiene SEQ ID N°: 2. Algunos de estos darán una respuesta positiva en el ensayo de INF- $\gamma$  mientras que otros no los harán.

En una realización preferida de la invención, el fragmento de polipéptido comprende un epitopo para una célula T-auxiliar.

Aunque la longitud mínima de un epitopo de células T ha mostrado ser de al menos 6 aminoácidos, es normal que tales epitopos estén constituidos de de tramos más largos de aminoácidos. Así se prefiere que el fragmento de polipéptido de la invención tenga una longitud de residuos de aminoácidos.

En otra realización preferida, el fragmento de polipéptido de la invención está libre de cualquier secuencia señal, esto es especialmente interesante cuando el fragmento de polipéptido se produce sintéticamente pero incluso cuando los fragmentos de polipéptidos se producen recombinantemente es normalmente aceptable que no se exporten por las células huésped al periplasma o al espacio extracelular; los fragmentos de polipéptidos se pueden recuperar mediante procedimientos tradicionales (compárese con la discusión más adelante) a partir del citoplasma tras la disrupción de las células huésped, compárese por ejemplo con la discusión en el documento WO 94/18227 donde se describe un procedimiento de repliegamiento general aplicable.

Un ensayo adecuado para la utilidad potencial de un fragmento de polipéptido dado derivado de SEQ ID N°.: 2 es para valorar la capacidad del fragmento de polipéptido para llevar a cabo la liberación de IFN- $\gamma$  a partir de linfocitos T de memoria cebados. Los fragmentos de polipéptidos los cuales tienen esta capacidad están de acuerdo con la invención especialmente con las realizaciones interesantes de la invención: se contempla que los fragmentos de polipéptidos los cuales estimulan la respuesta inmune de linfocitos en poco tiempo después de la aparición de la infección son importantes en el control de las micobacterias causando la infección antes de que las micobacterias hayan tenido éxito en multiplicarse al número de bacterias que debería haber resultado en infección fulminante.

Así, una realización importante de la invención es un fragmento polipéptídico definido anteriormente el cual:

- 1) induce una liberación de IFN- $\gamma$  a partir de linfocitos T de memoria cebados retirados de un ratón dentro de 2 semanas después de infección primaria o dentro de 4 días después de que el ratón haya sido puesto a prueba con infección de nuevo con micobacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis, la inducción se llevó a cabo mediante la adición del polipéptido a una suspensión que comprende aproximadamente 200.000 células del bazo por ml, la adición del polipéptido da como resultado una concentración de 1-4  $\mu$ g del polipéptido por ml de suspensión, siendo la liberación de IFN- $\gamma$  valorable mediante determinación de IFN- $\gamma$  en sobrenadante recogido dos días después de la adición del polipéptido a la suspensión, y/o
- 2) induce una liberación de IFN- $\gamma$  de al menos 300 pg/ml por encima del nivel precedente anterior de aproximadamente 1.000.000 PBMC (células mononucleares periféricas de la sangre) humanas por ml aisladas de pacientes de TB en la primera fase de infección, o de donantes vacunados con BCG sanos, o a partir de sanos puestos en contacto con pacientes de TB, la inducción se lleva a cabo mediante la adición del polipéptido a una suspensión que comprende las aproximadamente 1.000.000 PBMC por ml, la adición del polipéptido dio como resultado una concentración de 1-4  $\mu$ g por ml de suspensión, siendo valorable la liberación del IFN- $\gamma$  mediante determinación del IFN- $\gamma$  en sobrenadante recogido 2 días después de la adición del polipéptido a la suspensión; y/o
- 3) induce una liberación de IFN- $\gamma$  a partir de PBMC bovinas derivadas de animales previamente sensibilizados con micobacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis, siendo dicha liberación al menos dos veces la liberación observada a partir de PBMC bovinas derivadas de animales no previamente sensibilizados con micobacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis.

La liberación de IFN- $\gamma$  a partir de PBMC bovinas puede por ejemplo medirse como el índice de densidad óptica (DO) sobre antecedentes en un ELISA de citoquina estándar y debería ser así al menos dos, pero se prefieren números más altos tales como al menos 3, 5, 8, y 10.

Los fragmentos de polipéptidos de la invención comprenden preferiblemente una secuencia de aminoácidos de al menos 12 residuos de aminoácidos en longitud los cuales tienen una identidad de secuencia más alta de al menos el 80 por ciento con SEQ ID N°.: 2. Un porcentaje mínimo de identidad de secuencia es al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, y al menos el 99,5%.

Como se menciona anteriormente, será normalmente interesante omitir las secuencias líderes de los fragmentos de polipéptidos de la invención. Sin embargo, produciendo polipéptidos de condensación, se pueden lograr características superiores a las de los fragmentos de polipéptidos de la invención. Por ejemplo, los compañeros de condensación los cuales facilitan exportación del polipéptido cuando se produce recombinantemente, los compañeros de condensación los cuales facilitan la purificación del polipéptido, y los compañeros de condensación los cuales potencian la inmunogenicidad del fragmento de polipéptido de la invención son todas posibilidades interesantes. Por lo tanto, la invención también se refiere a un polipéptido de condensación que comprende al menos un fragmento de polipéptido definido anteriormente y al menos un compañero de condensación. El compañero de condensación puede, con el fin de potenciar inmunogenicidad, por ejemplo seleccionarse del grupo constituido por otro fragmento de polipéptido como se define anteriormente (tal como para permitir expresión múltiple de epitopos relevantes), y un polipéptido distinto derivado de una bacteria perteneciente al complejo de tuberculosis, tal como ESAT-6, MPB64, MPT64, y MPB59 o al menos un epitopo de célula T de uno de estos antígenos. Otros polipéptidos potenciadores de inmunogenicidad los cuales podrían servir como compañeros de condensación son epitopos de células T (por ejemplo derivados de los polipéptidos ESAT-6, MPB64, MPT64, o MPB59) u otros epitopos inmunogénicos que potencian la inmunogenicidad

del producto del gen objetivo, por ejemplo linfoquinas tales como INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-12. Con el fin de facilitar expresión y/o purificación el compañero de condensación puede por ejemplo ser una proteína fimbrial de bacterias, por ejemplo, los componentes vellosos pilina y papA; proteína A; el péptido ZZ (fusiones ZZ se comercializan por Pharmacia en Suecia); la proteína de unión a maltosa; glutathion S-transferasa;  $\beta$ -galactosidasa; o polihistidina.

Otros compañeros de condensación interesantes son polipéptidos los cuales se lipilizan y de este modo llevan a cabo que el polipéptido inmunogénico se presente en una manera adecuada al sistema inmune. Este efecto se conoce por ejemplo a partir de vacunas basadas en el polipéptido OSpA de *Borrelia burgdorferi*, en el que el ancla de membrana lipidizada en el polipéptido confiere un efecto autocoadyuvante a polipéptido (el cual está lipidizado de forma nativa) cuando se aísla a partir de células que lo producen. En contraste, el polipéptido de OspA es relativamente silente inmunológicamente cuando se prepara sin el ancla de lipidización.

Otra parte de la invención se refiere a un fragmento de ácido nucleico en forma aislada el cual comprende una secuencia de ácidos nucleicos la cual codifica un polipéptido o polipéptido de condensación como se define anteriormente, o comprende una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a ella.

Se prefiere que el fragmento de ácido nucleico sea un fragmento de ADN.

Un fragmento tal puede prepararse fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento mediante medios químicos, mediante aplicación de tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tales como la tecnología de PCR de la Patente de los Estados Unidos 4.603.102, o introduciendo secuencias seleccionadas dentro de vectores recombinantes para producción recombinante.

Se conoce bien que el mismo aminoácido puede codificarse mediante diversos codones, estando el uso del codón relacionado, entre otras cosas, con la preferencia de los organismos en cuestión que expresan la secuencia de nucleótidos. Así, al menos un nucleótido o codón de un fragmento de ácido nucleico de la invención se puede intercambiar por otros los cuales, cuando se expresan, dan como resultado un polipéptido idéntico o sustancialmente idéntico al polipéptido codificado por el fragmento de ácido nucleico en cuestión. La invención permite así variaciones en la secuencia tales como sustitución, inserción (incluyendo intrones), adición, delección y reordenamiento de uno o más nucleótidos, variaciones las cuales no tienen ningún efecto sustancial en el polipéptido codificado por el fragmento de ácido nucleico o una subsecuencia del mismo. El término "sustitución" se desea para significar el reemplazamiento de uno o más nucleótidos en la secuencia total de nucleótidos con uno o más nucleótidos diferentes, "adición" se entiende para significar la adición de uno o más nucleótidos en cada extremo de la secuencia total de nucleótidos, "inserción" se desea para significar la introducción de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia total de nucleótidos, "delección" se desea para indicar que uno o más nucleótidos se han borrado de la secuencia total de nucleótidos bien en el extremo de la secuencia o bien en cualquier punto adecuado dentro de ella, y "reordenación" se desea para significar que uno o dos residuos de nucleótidos se han intercambiado unos con otros.

La secuencia de nucleótidos a modificarse puede ser de origen de ADNc o de origen genómico como se discute anteriormente, pero puede ser también de origen sintético. Además, la secuencia puede ser de origen de ADNc y genómico mezclado, de origen de ADNc y sintético mezclado o de origen genómico y sintético como se discute anteriormente. La secuencia puede haber sido modificada, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida a sitio, para dar como resultado el fragmento de ácido nucleico deseado que codifica el polipéptido deseado. La siguiente discusión centrada en modificaciones de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido debería entenderse para comprender también tales posibilidades, así como la posibilidad de construir el ácido nucleico mediante ligazón de dos o más fragmentos de ADN para obtener el fragmento de ácido nucleico deseado, y combinaciones de los principios anteriormente mencionados.

La secuencia de nucleótidos se puede modificar usando cualquier técnica adecuada la cual dé como resultado la producción de un fragmento de ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención.

La modificación de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención sería una la cual no perjudique la función inmunológica del polipéptido resultante.

Un procedimiento preferido de preparar variantes de los antígenos descritos en el presente documento es mutagénesis dirigida a sitio. Esta técnica es útil en la preparación de péptidos individuales, o proteínas o péptidos equivalentes biológicamente funcionales, derivados de las secuencias de antígenos, a través de mutaciones específicas del ácido nucleico subyacente. La técnica proporciona adicionalmente una capacidad lista para preparar y variantes de secuencia de prueba, por ejemplo, incorporar una o más de las consideraciones siguientes, introduciendo uno o más cambios de secuencia de nucleótidos dentro del ácido nucleico. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias de nucleótidos específicas las cuales codifican la secuencia de nucleótidos de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño suficiente y complejidad de secuencia suficiente para formar un dúplex estable en ambos lados del empalme de delección que se atraviesa. Típicamente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 5 a 10 residuos en ambos lados del empalme de la secuencia que se está alterando.

En general, la técnica de mutagénesis específica de sitio se conoce bien en la técnica como se ejemplifica mediante publicaciones (Adelman y col, 1983). Como se apreciará, la técnica emplea típicamente un vector fágico el cual existe

## ES 2 291 810 T3

tanto en forma de cadena simple como en forma de cadena doble. Los vectores típicos útiles en mutagénesis dirigida de sitio incluyen vectores tales como el fago M13 (Messing y col., 1981). Estos fagos están comercialmente disponibles y su uso se conoce bien generalmente por aquellos expertos en la técnica.

En general, la mutagénesis dirigida a sitio de acuerdo con lo adjunto se lleva a cabo obteniendo primero un vector de cadena simple el cual incluye dentro de su secuencia una secuencia de ácido nucleico la cual codifica los polipéptidos de la invención. Se prepara un cebador oligonucleotídico que lleva la secuencia mutada deseada, generalmente sintéticamente, por ejemplo mediante el procedimiento de Crea y col. (1978). Este cebador se fusiona después con el vector de cadena simple, y se somete a enzimas polimerizadores del ADN tales como fragmento Klenow de polimerasa I de *E. coli*, con el fin de completar la síntesis de la cadena que lleva la mutación. Así, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia original no mutada y la segunda cadena lleva la mutación deseada. Este vector heterodúplex se usa después para transformar células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan clones los cuales incluyen vectores recombinantes que llevan la disposición de secuencia mutada.

Se proporciona la preparación de variantes de secuencia de los fragmentos de ácidos nucleicos seleccionados de la invención usando mutagénesis dirigida de sitio como un medio de producir especies potencialmente útiles de los genes y no significa limitarse ya que hay otras maneras en las cuales se pueden obtener las variantes de secuencia de los fragmentos de ácidos nucleicos de la invención. Por ejemplo, vectores recombinantes que codifican los genes deseados se pueden tratar con agentes mutágenos para obtener variantes de secuencia (véase, por ejemplo, un procedimiento descrito por Eichenlaub, 1979) para la mutagénesis de ADN plasmídico usando hidroxilamina.

La invención se refiere también a un vector de expresión replicable el cual comprende un fragmento de ácido nucleico anteriormente definido, especialmente un vector el cual comprende un fragmento de ácido nucleico que codifica un fragmento de polipéptido de la invención.

El vector puede ser cualquier vector el cual pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección de vector dependerá a menudo de la célula huésped dentro de la cual está introduciéndose. Así, el vector puede ser un vector que se replica autónomamente es decir un vector el cual existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica; ejemplos de un vector tal son un plásmido, fago, cósmido, minicromosoma o virus. Alternativamente, el vector puede ser uno el cual, cuando se introduce dentro de una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica conjuntamente con el/los cromosoma(s) dentro de los cuales está integrado.

Los vectores de expresión se pueden construir para incluir cualquiera de los segmentos de ADN descritos en el presente documento. Tal ADN podría codificar una proteína antigénica específica para cepas virulentas de micobacterias o incluso sondas de hibridación para detectar ácidos nucleicos de micobacterias en muestras. Se podrían usar segmentos de ADN más largos o más cortos, dependiendo de la proteína antigénica deseada. Las regiones epitópicas de las proteínas expresadas o codificadas por el ADN descrito podrían incluirse como segmentos relativamente cortos de ADN. Una amplia variedad de vectores de expresión es posible incluyendo, por ejemplo, segmentos de ADN que codifican productos de genes indicadores útiles para identificación de productos de genes heterólogos y/o genes de resistencia tales como genes de resistencia a antibióticos los cuales pueden ser útiles en identificar células transformadas.

El vector de la invención se puede usar para transformar células tal como para permitir propagación de los fragmentos de ácidos nucleicos de la invención o tal como para permitir expresión de los fragmentos de polipéptidos de la invención. Así, la invención se refiere también a una célula transformada que alberga al menos un vector tal de acuerdo con la invención, siendo dicha célula una la cual no alberga de forma nativa el vector y/o el fragmento de ácido nucleico de la invención contenido en ella. Una célula transformada tal (la cual es también una parte de la invención) puede ser cualquier célula huésped bacteriana adecuada o cualquier otro tipo de célula tal como un organismo eucariota unicelular, un hongo o levadura, o una célula derivada de un organismo pluricelular, por ejemplo un animal o una planta. Es especialmente en casos donde se desea la glicosilación que se usa una célula de mamífero, aunque la glicosilación de proteínas es un suceso raro en eucariotas. Normalmente, sin embargo, se prefiere una célula procariota tal como una bacteria perteneciente a los géneros *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Escherichia*. Se prefiere que la célula transformada sea una *E. coli*, *B. subtilis* o célula de BCG de *M. bovis*, y se prefiere especialmente que la célula transformada exprese un polipéptido de acuerdo con la invención. Lo último abre la posibilidad para producir el polipéptido de la invención simplemente recuperándolo del cultivo que contiene la célula transformada. En la realización más preferida de esta parte de la invención la célula transformada es de cepa de BCG de *Mycobacterium bovis*: Danish 1331, la cual es la cepa *Copenhagen* de *Mycobacterium bovis* del Copenhagen BCG Laboratory, Statens Seruminstitut; Dinamarca.

Los fragmentos de ácidos nucleicos de la invención permiten la producción recombinante de los fragmentos de polipéptidos de la invención. Sin embargo, también el aislamiento de la fuente natural es una manera de proporcionar los fragmentos de polipéptidos como es síntesis peptídica.

Por lo tanto, la invención se refiere también a la preparación de un fragmento de polipéptido de la invención, comprendiendo dicho procedimiento insertar un fragmento de ácido nucleico como se define anteriormente dentro de un vector el cual es capaz de replicarse en una célula huésped, introduciendo el vector recombinante resultante dentro de la célula huésped (las células transformadas se pueden seleccionar usando diversas técnicas, incluyendo rastreo mediante hibridación diferencial, identificación de productos de genes indicadores condensados, marcadores



de resistencia, anticuerpos antiantigénicos y similares), cultivando la célula huésped en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para llevar a cabo expresión del polipéptido (por supuesto la célula se puede cultivar bajo condiciones apropiadas a las circunstancias, y si se desea el ADN, se usan condiciones de replicación), y recuperando el polipéptido de la célula huésped o medio de cultivo; o

aislar el polipéptido de un filtrado de cultivo a corto plazo como se define en la reivindicación 1; o

aislar el polipéptido de micobacterias completas del complejo de tuberculosis o de lisados o fracciones de los mismos, por ejemplo fracciones que contienen paredes celulares, o

sintetizar el polipéptido mediante síntesis de péptidos en fase sólida o líquida.

El medio usado para cultivar las células transformadas puede ser cualquier medio convencional adecuado para el propósito. Un vector adecuado puede ser cualquiera de los vectores descritos anteriormente, y una célula huésped apropiada puede ser cualquiera de los tipos celulares enumerados anteriormente. Los procedimientos empleados para construir el vector y llevar a cabo la introducción del mismo dentro de la célula huésped pueden ser cualesquiera procedimientos conocidos para tales propósitos dentro del campo del ADN recombinante. En lo siguiente se dará una descripción más detallada de las posibilidades.

En general, por supuesto, se prefieren procariotas para la clonación inicial de secuencias nucleicas de la invención y la construcción de vectores útiles en la invención. Por ejemplo, además de las cepas particulares mencionadas en la discusión más específica más adelante, alguien puede mencionar a modo de ejemplo, cepas tales como cepa 294 de *E. coli* (K12 ATCC N°.: 31446), *E. coli* B, y *E. coli* X 1776 (ATCC N°.: 31537). Estos ejemplos se desean, por supuesto, para ser ilustrativos más que limitantes.

Los procariotas se prefieren también para expresión. Se pueden usar las cepas mencionadas anteriormente, así como *E. coli* W3110 (F-lambda-, prototrófica, ATCC N°.: 273325), bacilos tales como *Bacillus subtilis*, u otras enterobacterias tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans*, y diversas especies de *Pseudomonas*. Especialmente interesantes son micobacterias de crecimiento rápido, por ejemplo *M. smegmatis*, ya que estas bacterias tienen un alto grado de semejanza con complejo de micobacterias del complejo de la tuberculosis y por lo tanto mantienen una buena probabilidad de reducir la necesidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales del producto de expresión.

En general, los vectores plasmídicos que contienen replicón y secuencias control las cuales se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan en conexión con estos huéspedes. El vector lleva de ordinario un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras las cuales son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de la especie *E. coli* (véase, por ejemplo, Bolivar y col., 1977, Gene 2: 95). El plásmido pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina o tetraciclina y así proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. El plásmido pBR, u otro plásmido microbiano o fago debe contener también, o modificarse para contener, promotores los cuales pueden usarse por los microorganismos de la invención.

Aquellos promotores usados más comúnmente en construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas promotores de B-lactamasa (penicilinas) y de lactosa (Chang y col., 1978; Itakura y col., 1977; Goeddel y col., 1979) y un sistema promotor de triptófano (Goeddel y col., 1979, Solicitud de Publicación de EPO N°.: 0036776). Mientras que estos son los más comúnmente usados, se han descubierto y utilizado otros promotores microbianos, y se han publicado detalles que se refieren a sus secuencias nucleotídicas, permitiendo a un trabajador experto ligarlos funcionalmente con vectores plasmídicos (Sebwenlist y col., 1980). Ciertos genes de procariotas se pueden expresar eficientemente en *E. coli* a partir de sus propias secuencias promotoras, descartando la necesidad de adición de otro promotor mediante medios artificiales.

Después de la preparación recombinante del polipéptido de acuerdo con la invención, el aislamiento del polipéptido puede por ejemplo llevarse a cabo mediante cromatografía de afinidad (u otros procedimientos bioquímicos convencionales basados en cromatografía), usando un anticuerpo monoclonal el cual une sustancialmente específicamente al polipéptido de acuerdo con la invención. Otra posibilidad es emplear la electroelución simultánea descrita por Andersen y col. en J. Immunol. Methods 161: 29-39.

De acuerdo con la invención las modificaciones postraduccionales implican lipidización, glicosilación, escisión, o elongación del polipéptido.

En ciertos aspectos, la información de secuencia de ADN proporcionada mediante esta invención permite la preparación de secuencias de ADN (o ARN o APN) relativamente cortas que tienen la capacidad de hibridar específicamente a secuencias de genes micobacterianos. En estos aspectos, las sondas de ácidos nucleicos de una longitud apropiada se preparan en base a una consideración de la secuencia relevante. La capacidad de tales sondas de ácidos nucleicos para hibridar específicamente a las secuencias de genes micobacterianas les da utilidad particular en una diversidad de realizaciones. Más importantemente, las sondas se pueden usar en una diversidad de ensayos de diagnóstico para detectar la presencia de organismos patógenos en una muestra dada. Sin embargo, cada uso se prevé, incluyendo el uso de la información de secuencia para la preparación de cebadores de especies mutantes, o cebadores para usar en preparar otras construcciones genéticas.

Aparte de su uso como puntos de partida para la síntesis de polipéptidos de la invención y para sondas de hibridación (útiles para ensayos de hibridación directa o como cebadores en por ejemplo PCR u otros procedimientos de amplificación molecular) los fragmentos de los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para llevar a cabo expresión *in vivo* de antígenos, es decir los fragmentos de ácidos nucleicos se pueden usar en las así llamadas vacunas de ADN. La investigación reciente ha revelado que un fragmento de ADN clonado en un vector el cual es no replicativo en células eucariotas se puede introducir dentro de un animal (incluyendo un ser humano) mediante por ejemplo inyección intramuscular o administración percutánea (la así llamada aproximación de “pistola génica”). El ADN se toma mediante por ejemplo células musculares y el gen de interés se expresa mediante un promotor el cual está funcionando en eucariotas, por ejemplo un promotor viral, y el producto génico estimula a partir de entonces el sistema inmune. Estos procedimientos recientemente descubiertos se revisan en Ulmer y col., 1993, el cual se incluye por la presente mediante referencia.

Así, la invención se refiere también a una vacuna que comprende un fragmentos de ácido nucleico de acuerdo con la invención, la vacuna que lleva a cabo expresión *in vivo* de antígeno por un animal, incluyendo un ser humano, a quien se ha administrado la vacuna, siendo efectiva la cantidad de antígeno expresado para conferir resistencia sustancialmente incrementada a infecciones con micobacterias del complejo de tuberculosis en un animal, incluyendo un ser humano.

La eficacia de una “vacuna de ADN” tal puede posiblemente potenciarse administrando el gen que codifica el producto de expresión conjuntamente con un fragmento de ADN que codifica un polipéptido el cual tiene la capacidad de modular una respuesta inmune. Por ejemplo, un gen que codifica precursores de linfoquinas o linfocitos (por ejemplo IFN- $\gamma$ , IL-2, o IL-12) podría administrarse conjuntamente con el gen que codifica la proteína inmunogénica, bien administrando dos fragmentos de ADN separados o bien administrando ambos fragmentos de ADN incluidos en el mismo vector. También es una posibilidad administrar fragmentos de ADN que comprenden una multitud de secuencias de nucleótidos las cuales codifican epitopos relevantes de los polipéptidos descritos en el presente documento tal como para llevar a cabo una sensibilización continua del sistema inmune con un amplio espectro de estos epitopos.

Como se explica anteriormente, los fragmentos de polipéptidos de la invención son excelentes candidatos para constituyentes de vacunas o para constituyentes en un agente de diagnóstico inmune debido a su presencia extracelular en medios de cultivo que contienen micobacterias virulentas metabolizadoras que pertenecen al complejo de tuberculosis, o debido a sus altas homologías con tales antígenos extracelulares, o debido a su ausencia en BCG de *M. bovis*.

Así, otra parte de la invención se refiere a una composición inmunológica que comprende un polipéptido o polipéptido de condensación de acuerdo con la invención. Con el fin de asegurar la realización óptima de una composición inmunológica tal se prefiere que comprenda un transportador, vehículo o coadyuvante inmunológicamente y farmacéuticamente aceptable.

Los transportadores adecuados se seleccionan del grupo constituido por un polímero al cual el/los polipéptido(s) está(n) unido(s) mediante interacción no covalente hidrófoba, tal como un plástico, por ejemplo poliestireno, o un polímero al cual el/los polipéptido(s) está(n) covalentemente unido(s), tal como un polisacárido, o un polipéptido, por ejemplo seroalbúmina bovina, ovoalbúmina o hemocianina de lapa de California. Se seleccionan vehículos adecuados del grupo constituido por un diluyente y un agente de suspensión. El coadyuvante se selecciona preferiblemente del grupo constituido por bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), Quil A, poli I:C, coadyuvante incompleto de Freund, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, monofosforil lípido A (MPL) y dipéptido de muramilo (MDP).

Una composición inmunológica preferida de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos fragmentos de polipéptidos diferentes, siendo cada fragmento de polipéptido diferente un polipéptido o un polipéptido de condensación anteriormente definido. Se prefiere que la composición inmunológica comprenda 3-20 fragmentos de polipéptidos o polipéptidos de condensación diferentes.

Una composición inmunológica tal puede estar preferentemente en forma de una vacuna o en forma de un reactivo de prueba cutánea.

En línea con lo anterior, la invención por lo tanto también se refiere a un procedimiento para producir una composición inmunológica de acuerdo con la invención, comprendiendo el procedimiento preparar, sintetizar o aislar un polipéptido de acuerdo con la invención, y solubilizar o dispersar el polipéptido en un medio para una vacuna, y añadir opcionalmente otros antígenos de *M. tuberculosis* y/o un transportador, vehículo y/o sustancia coadyuvante.

La preparación de vacunas las cuales contienen secuencias peptídicas como ingredientes activos se entiende generalmente bien en la técnica, como se ejemplifica mediante las Patentes de los Estados Unidos 4.608.251; 4.601.903, 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770, incorporadas todas en el presente documento mediante referencia. Típicamente, tales vacunas se prepararon como inyectables bien como soluciones líquidas o bien como suspensiones; se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de inyección. La preparación puede también emulsionarse. El ingrediente inmunogénico activo está mezclado a menudo con excipientes los cuales son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el compuesto activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH, o coadyuvantes los cuales potencian la efectividad de las vacunas.

Las vacunas se administran convencionalmente parenteralmente, mediante inyección, por ejemplo, bien subcutáneamente o bien intramuscularmente. Las formulaciones adicionales las cuales son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para supositorios, los aglutinantes y transportadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente 1-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, niveles farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación continuada o polvos y contienen el 10-95% de ingrediente activo, preferiblemente el 25-70%.

Las proteínas se pueden formular dentro de la vacuna como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres del péptido) y las cuales se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres puede derivarse también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, los hidróxidos sódico, potásico, amónico, cálcico o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y similares.

Las vacunas se administran en una manera compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad como sean terapéuticamente efectivas e inmunógenas. La cantidad a administrarse depende del sujeto a tratarse, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmune del individuo para montar una respuesta inmune, y el grado de protección deseado. Los intervalos de dosificación adecuados son del orden de varios miles de microgramos de ingrediente activo por vacunación con un intervalo preferido de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}$  a 1000  $\mu\text{g}$ , tal como en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  a 300  $\mu\text{g}$ , y especialmente en el intervalo de aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  a 50  $\mu\text{g}$ . Los regímenes apropiados para administración inicial y refuerzos de vacunas son también variables pero están tipificados mediante una administración inicial seguida por inoculaciones subsiguientes u otras administraciones.

La manera de solicitud puede variarse ampliamente. Son aplicables cualquiera de los procedimientos convencionales para administración de una vacuna. Estos se cree que incluyen aplicación oral en una base fisiológicamente aceptable sólida o en una dispersión fisiológicamente aceptable, parenteralmente, mediante inyección o similares. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con la edad de la persona a vacunarse y, en un menor grado, con el tamaño de la persona a vacunarse.

Algunos de los polipéptidos de la vacuna son suficientemente inmunógenos en una vacuna, pero para algunos de los otros la respuesta inmune se potenciará si la vacuna comprende adicionalmente una sustancia coadyuvante.

Diversos procedimientos de lograr efecto coadyuvante para la vacuna incluyen uso de agentes tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (alumbre), comúnmente usados como solución del 0,05 al 0,1 por ciento en solución salina tamponada con fosfato, en mezcla con polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol) usados como solución al 0,25 por ciento, agregación de la proteína en la vacuna mediante tratamiento de calor con temperaturas que varían entre 70°C-101°C durante 30 segundos a periodos de 2 minutos respectivamente. Se pueden emplear también agregación reactivando con anticuerpos tratados con pepsina (Fab) a albúmina, mezcla con células bacterianas tales como *C. parvum* o endotoxinas o componentes lipopolisacáridicos de bacterias gram-negativas, emulsión en vehículos de aceite fisiológicamente aceptables tales como monooleato de mannide (Aracel A) o emulsión con solución al 20% de un perfluorocarbono (Fluosol-DA) usado como un sustituto en bloque. De acuerdo con la invención DDA (bromuro de dimetildioctadecilamonio) es un candidato interesante para un coadyuvante, pero también coadyuvantes completos e incompletos de Freund así como QuilA y RIBI son posibilidades interesantes. Posibilidades adicionales son monofosforilo de lípido A (MPL), y dipéptido de muramilo (MDP).

Otra posibilidad altamente interesante (y así, preferida) de lograr efecto coadyuvante es emplear la técnica descrita en Gosselin y col., 1992 (la cual se incorpora así mediante referencia en el presente documento). En breve, la presentación de un antígeno relevante tal como un antígeno de la presente invención puede potenciarse conjugando el antígeno con anticuerpos (o antígeno uniendo fragmentos de anticuerpos) contra los receptores Fc $\gamma$  en monocitos/macrófagos. Especialmente los conjugados entre antígeno y anti-Fc $\gamma$ RI han demostrado potenciar inmunogenicidad para los propósitos de vacunación.

Otras posibilidades implican el uso de sustancias inmunomoduladoras tales como linfoquinas (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12) o inductores de IFN- $\gamma$  sintéticos tales como poli I:C en combinación con los coadyuvantes anteriormente mencionados. Como se discute en el ejemplo 3, se contempla que tales mezclas de antígeno y coadyuvante conducirán a formulaciones de vacuna superiores.

En muchos casos, será necesario que haya múltiples administraciones de la vacuna, usualmente no excediendo de seis vacunaciones, más usualmente no excediendo de cuatro vacunaciones y preferiblemente una o más, usualmente al menos tres vacunaciones. Las vacunaciones serán normalmente a intervalos de dos a doce semanas, más usualmente a intervalos de tres a cinco semanas. Serán deseables los refuerzos de vacuna periódicos a intervalos de 1-5 años, usualmente tres años, para mantener los niveles deseados de inmunidad protectora. El curso de la inmunización puede seguirse mediante ensayos de proliferación *in vitro* de PBL (linfocitos periféricos de la sangre) co-cultivados con ESAT-6 o ST-CF, y especialmente midiendo los niveles de IFN- $\gamma$  liberados de los linfocitos cebados. Los ensayos

se pueden llevar a cabo usando marcas convencionales, tales como radionúclidos, enzimas, fluorescentes, y similares. Estas técnicas se conocen bien y se pueden encontrar en una amplia diversidad de patentes, tales como Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup>.: 3.791.932, 4.174.384 y 3.949.064, como ilustrativas de estos tipos de ensayos.

Debido a la variación genética, diferentes individuos pueden reaccionar con respuestas inmunes de fuerza variable para el mismo polipéptido. Por lo tanto, la vacuna de acuerdo con la invención puede comprender varios polipéptidos diferentes con el fin de incrementar la respuesta inmune. La vacuna puede comprender dos o más polipéptidos, donde todos los polipéptidos son como se definen anteriormente, o algunos pero no todos de los péptidos se pueden derivar de una bacteria que pertenece al complejo de *M. tuberculosis*. En el último ejemplo los polipéptidos que no satisfacen necesariamente los criterios expuestos anteriormente para polipéptidos pueden bien actuar debido a su propia inmunogenicidad o bien actuar meramente como coadyuvantes. Ejemplos de tales polipéptidos interesantes son MPB64, MPT64, y MPB59, pero cualesquiera otras sustancias las cuales se puedan aislar a partir de micobacterias son posibles candidatos.

La vacuna puede comprender 3-20 polipéptidos diferentes, tales como 3-10 polipéptidos diferentes.

Una razón para mezclar los polipéptidos de la invención con un coadyuvante es activar de forma efectiva una respuesta inmune celular. Sin embargo, este efecto puede lograrse también de otras maneras, por ejemplo expresando el antígeno efectivo en una vacuna en un microorganismo no patógeno. Un ejemplo bien conocido de un microorganismo tal es BCG de *Mycobacterium bovis*.

Por lo tanto, otro aspecto importante de la presente invención es una mejora de la vacuna de BCG viva actualmente disponible, la cual es una vacuna para inmunizar un animal, incluyendo un ser humano, contra TB causada por micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis, comprendiendo como el componente efectivo un microorganismo, en el que una o más copias de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido como se define anteriormente se han incorporado dentro del genoma del microorganismo en una manera que permite al microorganismo expresarse y segregar el polipéptido.

En el presente contexto el término "genoma" hace referencia al cromosoma de los microorganismos así como a ADN o ARN extracromosómico, tal como plásmidos. Se prefiere, sin embargo que la secuencia de ADN de la presente invención se haya introducido dentro del cromosoma de microorganismo no patógeno, dado que esto prevendrá la pérdida del material genético introducido.

Se prefiere que el microorganismo no patógeno sea una bacteria, seleccionada por ejemplo del grupo que consta de los géneros *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, y *Escherichia*. Se prefiere especialmente que el microorganismo no patógeno sea BCG de *Mycobacterium bovis*, tal como cepa de BCG de *Mycobacterium bovis*: Danish 1331.

La incorporación de una o más copias de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la invención en una micobacteria de una cepa de BCG de *M. bovis* potenciará el efecto inmunogénico de la cepa de BCG. La incorporación de más de una copia de una secuencia de nucleótidos de la invención se contempla para potenciar la respuesta inmune incluso más, y consecuentemente un aspecto de la invención es una vacuna en la que al menos 2 copias de una secuencia de ADN que codifican un polipéptido se incorporan en el genoma del microorganismo, tal como al menos 5 copias. Las copias de las secuencias de ADN pueden bien ser idénticas codificando polipéptidos idénticos o bien ser variantes de la misma secuencia de ADN codificando polipéptidos idénticos u homólogos de un polipéptido, o en otra realización ser diferentes secuencias de ADN que codifican diferentes polipéptidos donde al menos uno de los polipéptidos está de acuerdo con la presente invención.

La vacuna viva de la invención puede prepararse cultivando una célula no patógena transformada de acuerdo con la invención, y transfiriendo estas células a un medio para una vacuna, y añadiendo opcionalmente un transportador, vehículo y/o sustancia coadyuvante.

Cuando la diagnosis de infección previa o de infección en curso con micobacterias virulentas es el propósito, una muestra de sangre que comprende células mononucleares (entre otras linfocitos T) de un paciente podría ponerse en contacto con una muestra de uno o más polipéptidos de la invención. Este contacto puede llevarse a cabo *in vitro* y una reacción positiva podría ser por ejemplo proliferación de las células T o liberar citoquinas tales como interferón- $\gamma$  dentro de la fase extracelular (por ejemplo dentro de un sobrenadante de cultivo); una prueba *in vivo* adecuada sería una prueba cutánea como se describe anteriormente. Ello es además, concebible para poner en contacto una muestra de suero de un sujeto para poner en contacto con un polipéptido de la invención, la demostración de una unión entre anticuerpos en la muestra de suero y el polipéptido que es indicativo de infección previa o en curso.

La invención por lo tanto se refiere también a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar sensibilización en curso o previa en un animal o un ser humano con bacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis, el procedimiento comprende proporcionar una muestra de sangre del animal o el ser humano, y poner en contacto la muestra del animal con el polipéptido de la invención, una liberación significativa dentro de la fase extracelular de al menos una citoquina por células mononucleares en la muestra de sangre que es indicativa del animal sensibilizándose. Mediante el término "liberación significativa" se quiere decir en el presente documento que la liberación de la citoquina es significativamente mayor que la liberación de la citoquina de una muestra de sangre derivada de un sujeto no tuberculoso (por ejemplo

un sujeto el cual no reacciona en una prueba cutánea tradicional para TB). Normalmente, una liberación significativa es al menos dos veces la liberación observada a partir de una muestra tal.

Finalmente, un anticuerpo monoclonal o policlonal, el cual se hace reaccionar específicamente con un polipéptido de la invención en un inmunoensayo, o un fragmento de unión específica de dicho anticuerpo, es también una parte de la invención. La producción de tales anticuerpos policlonales requiere que un animal adecuado se inmunice con el polipéptido y que estos anticuerpos estén sustancialmente aislados, adecuadamente mediante cromatografía de afinidad inmune. La producción de monoclonales se puede llevar a cabo mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, dado que la presente invención estipula cantidades adecuadas de antígeno tanto para inmunización como para escaneo de los hibridomas positivos.

### Leyendas de las figuras

Fig. 1: ratones inmunes de memoria a largo plazo están protegidos muy eficientemente de una infección con *M. tuberculosis*. Se dio a los ratones una prueba de *M. tuberculosis* y se aisló el bazo a diferentes puntos temporales. Los linfocitos del bazo se estimularon *in vitro* con ST-CF y la liberación de IFN- $\gamma$  se investigó (panel A). Las cuentas de UFC en los bazos de los dos grupos de ratones se indicaron en el panel B. Los ratones de memoria inmune controlan la infección dentro de la primera semana y producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos en ST-CF.

Fig. 2: las células T implicadas en inmunidad protectora se dirigen predominantemente a moléculas de 6-12 a 17-38 kDa. Las células T esplénicas se aislaron cuatro días después de la puesta a prueba con *M. tuberculosis* y se estimularon *in vitro* con fracciones de masa molecular reducida de ST-CF. Se investigó la liberación de IFN- $\gamma$ .

Fig. 3: secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°.: 1) de *cfp7*. La secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID N°.: 2) de CFP7 se da en código de una letra convencional por debajo de la secuencia de nucleótidos. El sitio de unión al ribosoma teórico se escribe en cursivas subrayadas como son las regiones teóricas -10 y -35. Los nucleótidos escritos en negrita son aquellos que codifican CFP7.

### Ejemplo 1

#### Identificación de antígenos de filtrado de cultivo individual implicados en inmunidad protectora

Se generó un grupo de ratones eficientemente protegidos infectando ratones C57BI/6j hembras de 8-12 semanas de edad con  $5 \times 10^4$  *M. tuberculosis* intravenosamente. Después de 30 días de infección los ratones se sometieron a 60 días de tratamiento de antibióticos con isoianida y se dejaron después durante 200-240 días asegurando el establecimiento de inmunidad de memoria de largo plazo restante. Tales ratones de memoria inmune están muy eficientemente protegidos contra una infección secundaria (Fig. 1). La inmunidad duradera larga en este modelo está mediada por una población de células CD4 altamente reactivas reclutadas al sitio de infección y activadas para producir grandes cantidades de IFN- $\gamma$  en respuesta a ST-CF (fig. 1) (Andersen y col. 1995).

Los inventores han usado este modelo para identificar antígenos individuales reconocidos por células T protectoras. Los ratones de memoria inmune se re infectaron con  $1 \times 10^6$  *M. tuberculosis* intravenosamente y los linfocitos esplénicos se cosecharon en el día 4-6 de la re infección, un punto temporal donde esta población es altamente reactiva a ST-CF. Los antígenos reconocidos por estas células T se mapearon mediante la técnica de multielución (Andersen y Heron, 1993). Esta técnica divide las mezclas de proteínas complejas separadas en SDS-PAGE en fracciones reducidas en un tampón fisiológico. Estas fracciones se usaron para estimular linfocitos del bazo *in vivo* y la liberación de IFN- $\gamma$  se monitorizó (figura 2). Ratones inmunes de memoria a largo plazo no reconocieron estas fracciones tras la infección de TB, pero los linfocitos esplénicos obtenidos durante el recuerdo de la inmunidad protectora reconocieron un intervalo de antígenos de filtrado de cultivo y se encontró producción de pico de IFN- $\gamma$  en respuesta a proteínas de peso molecular aparente de 6-12 y 17-30 kDa (figura 2). Se concluye por lo tanto que los antígenos del filtrado de cultivo dentro de estas regiones son las dianas principales reconocidas por las células T efectoras de memoria activadas para liberar IFN- $\gamma$  durante la primera fase de una respuesta inmune protectora.

### Ejemplo 2

#### Clonación de genes que expresan antígenos de filtrado de cultivo de masa baja

En el ejemplo 1 se demostró que antígenos en la fracción de masa molecular baja se reconocen fuertemente por células aisladas a partir de ratones de memoria inmune. Los anticuerpos monoclonales (mAbs) para estos antígenos se generaron por lo tanto inmunizando con la fracción de masa baja en el coadyuvante RIBI (primera y segunda inmunización) seguido por dos inyecciones con las fracciones en hidróxido de aluminio. La condensación y clonación de las líneas celulares reactivas se hizo de acuerdo con procedimientos estándar (Kohler y Milstein, 1975). El procedimiento dio como resultado la provisión de dos mAbs: ST-3 dirigido a un antígeno de filtrado de 9 kDa (CFP9) y PV-2 dirigido a un antígeno de 7 kDa (CFP7), cuando el peso molecular se estima a partir de migración de antígenos en un SDS-PAGE.

## ES 2 291 810 T3

Con el fin de identificar la unión de los antígenos a los Mab, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

La biblioteca de ADN recombinante de *M. tuberculosis*  $\lambda$ gt11 construida por R. Young (Young, R.A., y col 1985) y obtenida a través del programa IMMTUB (WHO.0032.wibr) de la Organización Mundial de la Salud se rastreó por fagos que expresaban productos génicos los cuales deberían unirse a los anticuerpos monoclonales ST-3 y PV-2.

Aproximadamente  $1 \times 10^5$  ufc de la biblioteca génica (que contienen aproximadamente fagos recombinantes al 25%) se plaquearon en *Escherichia coli* Y1090 (DlacU169, proA<sup>+</sup>, Dlon, araD139, supF, trpC22::tn10 [pMC9] ATCC#37197) en agar blando y se incubaron durante 2,5 horas a 42°C.

Las placas se revistieron con láminas de nitrocelulosa saturada con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido y la incubación se continuó durante 2,5 horas a 37°C. La nitrocelulosa se eliminó y se incubó con muestras de los anticuerpos monoclonales en PBS con Tween 20 añadido a una concentración final del 0,05%. Se visualizaron anticuerpos monoclonales unidos mediante inmunoglobulinas antirratón de conejo conjugadas con peroxidasa de rábano picante (P260, Dako, Glostrup, DK) y una reacción de tinción que implica 5,5',3,3'-tetrametilbencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las placas positivas se reclonaron y los fagos que se originan de una placa individual se usaron para lisogenizar *E. coli* Y1089 (DlacU169, proA<sup>+</sup>, Dlon, araD139, strA, hf1150 [chr::tn10] [pMC9] ATCC número 37196). Las cepas lisógenas resultantes se usaron para propagar partículas de fagos para extracción de ADN. Estas cepas de *E. coli* lisógenas se han llamado:

AA226 (que expresa polipéptido reactivo CFP9 de ST-3) la cual se ha depositado el 28 de junio de 1993 con la colección del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMS) bajo el número de acceso DSM 8377 y de acuerdo con las precauciones del Tratado de Budapest, y

AA242 (que expresa polipéptido reactivo CFP7 de PV-2) la cual se ha depositado el 28 de junio de 1993 con la colección del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMS) bajo el número de acceso DSM 8379 y de acuerdo con las precauciones del Tratado de Budapest.

Estas dos cepas de *E. coli* lisógenas se describen en el documento WO 95/01441 como que son los productos polipeptídicos micobacterianos expresados de este modo. Sin embargo, no se da ninguna información concerniente a las secuencias de aminoácidos de estos polipéptidos o su origen genético, y por lo tanto sólo los productos de expresión directa de AA226 y AA242 se hacen disponibles para el público.

La proteína de unión a st-3 se expresa como una proteína condensada a  $\beta$ -galactosidasa, mientras que la proteína de unión a pv-2 parece expresarse en una versión no condensada.

### Secuenciación de secuencia de nucleótidos que codifican la proteína de unión de PV-2 y ST-3

Con el fin de obtener la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la proteína de unión pv-2, el fragmento *EcoRI-EcoRI* derivado de *M. tuberculosis* de aproximadamente 3 kb de AA242 se subclonó en el sitio EcoRI en el pBluescriptSK + (Stratagene) y se usó para transformar *E. coli* XL-1Blue (Stratagene).

De forma similar, para obtener la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la proteína de unión st-3, el fragmento *EcoRI-EcoRI* derivado de *M. tuberculosis* de aproximadamente 5 kb de AA226 se subclonó en el sitio EcoRI en el pBluescriptSK + (Stratagene) y se usó para transformar *E. coli* XL-1Blue (Stratagene).

La secuencia de ADN completa de ambos genes se obtuvo mediante el procedimiento de terminación de cadena dideoxi adaptado de ADN superenrollado mediante uso del kit de ADN Secuenasa versión 1.0 (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) y mediante secuenciación de ciclo usando el sistema Dye Terminator en combinación con un lector de gel automatizado (modelo 373A, Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas. Las secuencias de ADN se muestran en SEQ ID N°.: 1 (CFP7) y en SEQ ID N°.: 3 (CFP9) así como en figuras 3 y 4, respectivamente. Ambas cepas del ADN se secuenciaron.

### CFP7

Una fase de lectura abierta (ORF) que codifica una secuencia de 96 residuos de aminoácidos se identificó a partir de un codón de inicio AGT en la posición 91-93 continuando hasta un codón de terminación TAG en posición 379-381. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra en SEQ ID N°.: 2 (y la figura 3 donde se usan códigos de aminoácidos convencionales de una letra).

CFP7 parece expresarse en *E. coli* como una versión no condensada. La secuencia de nucleótidos en la posición 78-84 se espera que sea la secuencia de Shine Dalgarno y las secuencias de posición 47-50 y 14-19 se espera que sean las regiones -10 y -35, respectivamente.

*Subclonar CFP7 en vectores de expresión*

El PRF que codifica CFP7 se clonó mediante PCR dentro del vector de expresión pRVN01 de pMST24 (Theisen y col., 1995).

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en un reactor termal (ciclador Rapid, Idaho Technology, Idaho) mezclando ADN plasmídico de 10 ng con la mezcla maestra de PCR (0,5  $\mu$ M de cada cebador oligonucleotídico, BSA 0,25  $\mu$ M (Stratagene), tampón bajo en sal (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM y Tritón X-100 al 0,1%) (Stratagene), 0,25 mM de cada desoxinucleósido trifosfato y 0,5 U de ADN polimerasa larga Taq Plus (Stratagene)). El volumen final fue de 10  $\mu$ l (todas las concentraciones dadas son concentraciones en el volumen final). Se llevó a cabo predesnaturalización a 94°C durante 30 segundos. 20 ciclos de lo precedente se llevaron a cabo: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, fusión a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 1 minuto.

Los cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron automáticamente en un sintetizador de ADN (Applied Biosystems, Forster City, Ca, ABI-391, modo PCR), se desbloquearon, y se purificaron mediante purificación de etanol.

Los oligonucleótidos *cfp7* (Tabla 1) se sintetizaron sobre la base de la secuencia de nucleótidos a partir de la secuencia de CFP7 (figura 3). Los oligonucleótidos se manipularon mediante ingeniería genética para incluir un sitio de enzima de restricción *SmaI* en el extremo 5' y un sitio de enzima de restricción *BamHI* en el extremo 3' para subclonado dirigido.

*CFP7*

Mediante el uso de PCR se manipuló mediante ingeniería genética un sitio *SmaI* inmediatamente en posición 5' con respecto del primer codón de la ORF de 291 pb, que codifica el gen *cfp7*, tal que sólo se expresaría la región codificante, y se incorporó un sitio *BamHI* inmediatamente después del codón de parada en el extremo 3'. El fragmento de PCR de 291 pb se escindió mediante *SmaI* y *BamHI*, se purificó a partir de un gel de agarosa y se subclonó dentro de los sitios *SmaI-BamHI* del vector de expresión pMST24. El vector de ADN que contiene la condensación génica se usó para transformar la *E. coli* XL1-Blue (pRVN01).

*Purificación de la CFP7 recombinante*

La ORF se condensó N-terminalmente al  $(\text{His})_6$ -tag (compárese con el documento EP-A-0 282 242). Se preparó antígeno recombinante como sigue: brevemente, una colonia individual de *E. coli* que alberga bien el plásmido pRVN01 o bien el plásmido pRVN02, se inoculó dentro del caldo de Luria-Bertani que contiene ampiciclina a 100  $\mu$ g/ml y 12,5  $\mu$ g/ml de tetraciclina y se cultivó a 37°C a D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,5. IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) se añadió después a una concentración final de 2 mM (la expresión se reguló bien mediante el IPTG fuerte inducible  $P_{\text{tac}}$  o el promotor T5) y el crecimiento se continuó durante 2 horas adicionales. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4.200 x g a 4°C durante 8 minutos. La bacteria sedimentada se almacenó durante toda una noche a -20°C. La pella se resuspendió en tampón BC 40/1000 (Tris-HCl 20 mM a pH 7,9, glicerol al 20%, KCl 100 mM, imidazol 40 mM) y las células se rompieron mediante sonicación (5 veces durante 30 segundos con intervalos de 30 segundos) a 4°C seguido por centrifugación a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C, el sobrenadante (extracto en bruto) se usó para purificación de los antígenos recombinantes.

La proteína de condensación a histidina (His-rCFP7) se purificó a partir del extracto en bruto mediante cromatografía de afinidad en una columna  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA de QIAGEN con un volumen de 100 ml. His-rCFP7 e His-rCFP9 se unen a  $\text{Ni}^{2+}$ . Después de lavados extensivos de la columna en tampón BC 40/100, la proteína de condensación se eluyó con un tampón de BC 1000/100 que contenía imidazol 100 mM, Tris 20 mM a pH 9, glicerol al 20% y KCl 1 M. Subsiguientemente, los productos purificados se dializaron extensivamente frente a Tris 10 mM a pH 8,0. His-rCFP7 e His-rCFP9 se separaron después de contaminantes mediante cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) sobre una columna de intercambio aniónico (Mono Q, Pharmacia, Suecia) en Tris 10 mM a pH 8,0 con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M. Se analizaron las alícuotas de las fracciones mediante electroforesis en gel de dodecil-sulfato sódico de poliacrilamida en gradiente del 10%-20%. Se almacenaron las fracciones que contienen His-rCFP7 purificada.

TABLA 1

*Secuencia de los oligonucleótidos<sup>a</sup> de cfp7*

Orientación y oligonucleótido	Secuencias (5'→3')	Posición <sup>b</sup> (nucleótido)
Sentido pvR3	<u>GCAACACCCGGATGTCGCAAATCATG</u> (SEQ ID N°.: 43)	91-105 (SEQ ID N°.: 1)
Antisentido pvF4	<u>CTACTAAGCTTGGATCC</u> CTAGCCGCCCCATTGCGG SEQ ID N°.: 45)	381-362 (SEQ ID N°.: 1)
<sup>a</sup> Los oligonucleótidos cfp7 se basan en la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 3 (SEQ ID N°.: 1). Los nucleótidos subrayados no están contenidos en la secuencia de nucleótidos de cfp7. <sup>b</sup> Las posiciones referidas son de la parte no subrayada de los cebadores y corresponden a la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 3.		

## Ejemplo 2

*Mapeado del antígeno purificado en un sistema 2DE*

Con el fin de caracterizar el antígeno purificado se mapeó en un sistema de referencia de electroforesis bidimensional (2DE). Esto consiste en un gel teñido de plata que contiene proteínas ST-CF separadas por enfocado isoelectrico seguido por una separación de acuerdo al tamaño en un gel de electroforesis de poliacrilamida. La 2DE se llevó a cabo de acuerdo con Hochstrasser y col (1988). Se aplicaron 85 µg de ST-CF a los tubos de enfocado isoelectrico donde se incluyen los anfolitos de Biorad BioLyt 4-6 (2 partes) y BioLyt 5-7 (3-partes). La primera dimensión se llevó a cabo en geles de tubo de diacrilamida acrilamida/piperazina en presencia de urea, el detergente CHAPS y el agente reductor DTT a 400 V durante 18 horas y 800 V durante 2 horas. EL SDS-PAGE al 10-20% de la segunda dimensión se llevó a cabo a 100 V durante 18 horas y se tiñó con plata. La identificación de CFP7 en la referencia de 2DE se hizo comparando el patrón de manchas del antígeno purificado con ST-CF con y sin el antígeno purificado. Mediante la asistencia de un sistema de software de 2DE analítico (Phoretix International, Reino Unido) las manchas se han identificado en la figura 6.

*Actividad biológica del antígeno recombinante purificado**Inducción de interferón-γ en el modelo de ratón de la infección con TB*

**Infecciones primarias.** Se dieron infecciones intravenosas a ratones C57BL/6j(H-2<sup>b</sup>), CBA/J(H-2<sup>k</sup>), DBA.2(H-2<sup>d</sup>) y A.SW(H-2<sup>s</sup>) hembra de 8 a 12 semanas de edad (Bomholtegaard, Ry) por medio de la vena del rabo lateral con un inóculo de 5 x 10<sup>4</sup> *M. tuberculosis* suspendidas en PBS en un volumen de 0,1 ml. 14 días tras la infección los animales se sacrificaron y las células del bazo se aislaron y probaron para el reconocimiento de antígeno recombinante.

**Respuestas de memoria.** Se dieron infecciones intravenosas a ratones C57BL/6j(H-2<sup>b</sup>) hembra de 8 a 12 semanas de edad (Bomholtegaard, Ry) por medio de la vena del rabo lateral con un inóculo de 5 x 10<sup>4</sup> *M. tuberculosis* suspendidas en PBS en un volumen de 0,1 ml. Después de un mes de la infección los ratones se trataron con isoniazida (Merck y Co., Rahway, NJ) y rifabutina (Farmatalia Carlo Erba, Milán, Italia) en el agua de beber, durante dos meses. Los ratones se dejaron descansar durante 4-6 meses antes de usarse en experimentos. Para el estudio del recuerdo de la memoria inmunitaria, los animales se infectaron con un inóculo de 1 x 10<sup>6</sup> bacterias intravenosamente y se sacrificaron en el día 4 tras la infección. Las células del bazo se aislaron y se probaron para el reconocimiento de antígeno recombinante. La estimulación con rCFP7, dio como resultado un IFN-γ no mayor de 1/3 de la respuesta vista con ST-CF de células productoras de IFN-γ. El antígeno no estimuló liberación de IFN-γ en ratones que no han sido tratados previamente. Adicionalmente no fue tóxico para los cultivos celulares.



TABLA 7

*Respuestas de las células T en infección primaria con TB*

Nombre	C57BL/6j (H2 <sup>b</sup> )	DBA.2 (H-2 <sup>d</sup> )	CBA/J (H-2 <sup>k</sup> )	A.SW (H2 <sup>s</sup> )
rCFP7	+	+	-	-
Liberación de IFN- $\gamma$ durante el recuerdo de la memoria inmunitaria para <i>M. tuberculosis</i> .				
-: ninguna respuesta; +: 1/3 de ST-CF; ++: 2/3 de ST-CF; +++: nivel de ST-CF				

TABLA 8

*Respuestas de las células T en animales de memoria inmune*

Nombre	Respuesta de memoria
rCP7	+
Liberación de IFN- $\gamma$ de ratón 14 días después de infección primaria con <i>M. tuberculosis</i> .	
-: ninguna respuesta; +: 1/3 de ST-CF; ++: 2/3 de ST-CF; +++: nivel de ST-CF	

*Inducción de interferón- $\gamma$  en pacientes humanos de TB y gente vacunada con BCG*

*Donantes humanos:* se obtuvieron PBMC a partir de donantes vacunados con BCG sanos con ninguna exposición conocida a pacientes con TB y a partir de pacientes con infección probada en cultivo o microscopio con *Mycobacterium tuberculosis*. Las muestras de sangre se extrajeron de los pacientes de TB 1-4 meses después de la diagnosis.

*Preparaciones de linfocitos y cultivo celular:* PBMC se aislaron recientemente mediante centrifugación de gradiente de sangre heparinizada en Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega). Las células se resuspendieron en medio completo: RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N.Y.) suplementado con estreptomicina a 40  $\mu$ g/ml, 40 U/ml de penicilina, y glutamina a 0,04 mM/ml, (todo de Gibco Laboratories, Paisley, Escocia) y suero ABO humano normal al 10% (NHS) a partir del banco de sangre local. El número y la viabilidad de las células se determinaron mediante tinción con azul de tripán. Se establecieron cultivos con  $2,5 \times 10^5$  PBMC en 200  $\mu$ l en placas de microtitulación (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y se estimularon con ningún antígeno, ST-CF, PPD (2,5  $\mu$ g/ml); rCFP7, en una concentración final de 5  $\mu$ g/ml. Se usó como un control positivo fitohemaglutinina, 1  $\mu$ g/ml (PHA, Difco laboratories, Detroit, MI). Se recogieron sobrenadantes para la detección de citoquinas después de 5 días de cultivo, se reunieron y almacenaron a -80°C hasta usar.

*Análisis de citoquinas:* se midió interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) con una técnica de ELISA estándar usando un par de mABs comercialmente disponibles de Endogen y se usó de acuerdo con las instrucciones de uso. Se usó IFN- $\gamma$  recombinante (Gibco Laboratories) como un estándar. El nivel de detección para el ensayo fue 50 pg/ml. La variación entre los pocillos duplicados no excederá el 10% del medio. Se muestran respuestas de 9 donantes individuales en Tabla 9.

Se obtuvo una vista en niveles altos de Tabla 9 de liberación de IFN- $\gamma$  después de estimulación con varios de los antígenos recombinantes. rCFP7 parece ser lo más fuertemente reconocido por donantes sanos de BCG.

## ES 2 291 810 T3

TABLA 9

Valores medios de resultados de la estimulación de células sanguíneas humanas de 7 pacientes vacunados con BCG y 7 pacientes con antígenos recombinantes. Se dieron valores de SE para cada antígeno. Se mostraron filtrado de ST-CF y filtrado de cultivos de *M. avium* para la comparación. Controles, Sanos, vacunados con BCG, exposición a TB no conocida

donante:	sin antígeno	PHA	PPD	STCF	CFP7
1	6	9564	6774	3966	7034
2	48	12486	6603	8067	3146
3	190	11929	10000	8299	8015
4	10	21029	4106	3537	1323
5	1	18750	14209	13027	17725
Pacientes de TB, 1-4 meses después de diagnosis					
	sin antígeno	PHA	PPD	STCF	CFP7
6	9	8973	5096	6145	852
7	1	12413	6281	3393	168
8	4	11915	7671	7375	104
9	32	22130	164417	17213	8450

### Ejemplo 3

Los antígenos recombinantes se probaron individualmente como subunidades de vacunas en ratones. Cinco grupos de ratones C57BL/6j hembra, de 6-8 semanas de edad (Bomholtegard, Dinamarca) se inmunizaron subcutáneamente en la base del rabo con vacunas de la siguiente composición:

Grupo 1: 10 µg de CFP7

Grupo 2: 50 µg de ST-CF

Grupo 3: grupo control coadyuvante

Grupo 4: 2,5 x 10<sup>5</sup>/ml de BCG, 0,2 ml

Grupo 5: Grupo control: No tratado

La vacuna de subunidad se dio con DDA como coadyuvante. Los animales de vacunar con un volumen de 0,2 ml. Dos semanas después de la primera inyección y tres semanas después de la segunda inyección los grupos 1-9 se reforzaron un poco más hasta lo anterior. Una semana después de la última inyección los ratones se sangraron y las células de la sangre se aislaron. La respuesta inmune inducida se controló mediante liberación de IFN-γ dentro del sobrenadante del cultivo cuando se estimuló *in vitro* con la proteína homóloga.

6 semanas después de la última inmunización los ratones se pusieron a prueba con aerosol con 5 x 10<sup>6</sup> *Mycobacterium tuberculosis* viables. Después de 6 semanas de infección se mataron los ratones y el número de bacterias viables en pulmón y bazo de ratones infectados se determinó plaqueando diluciones en serie de 3 veces de homogenados de órganos en placas 7H11. Las colonias se contaron después de 2-3 semanas de incubación. La eficacia protectora se expresa como la diferencia entre valores de log<sub>10</sub> de la media geométrica de cuentas obtenidas de cinco ratones del grupo relevante y la media geométrica de cuentas obtenidas de cinco ratones del grupo control relevante.

Los resultados de los experimentos están presentes en la siguiente tabla.

## ES 2 291 810 T3

### *Inmunogenicidad y eficacia protectora en ratones, de ST-VF y subunidad de vacuna*

Subunidad de vacuna	Inmunogenicidad	Eficacia protectora
ST-CF	+++	+++
CFP7	++	-
+++ Inmunógeno fuerte/protección fuerte (nivel de BCG)		
++ Inmunógeno medio/protección media		
- Ningún reconocimiento/ninguna protección		

En conclusión, hemos identificado una proteína que induce niveles altos de protección. CFP7 no induce protección en el modelo de ratón.

#### Ejemplo 4

##### *Distribución de especies de cfp7*

##### *Presencia de cfp7, en diferentes especies micobacterianas*

Con el fin de determinar la distribución del gen *cfp7* en especies que pertenecen al complejo *M. tuberculosis* y en otras micobacterias se usó PCR y/o prueba de bandas de Southern. Las cepas bacterianas usadas se listan en Tabla 10. Se preparó ADN genómico a partir de células micobacterianas como se describe previamente (Andersen y col., 1992).

Se usaron análisis de PCR con el fin de determinar la distribución de los genes *cfp7* en especies pertenecientes al complejo-tuberculosis y en otras micobacterias. Las cepas bacterianas usadas se enumeran en Tabla 10. Se llevó a cabo PCR en ADN genómico preparado a partir de células micobacterianas como se describe previamente (Andersen y col., 1992).

Los cebadores de oligonucleótidos usados se sintetizaron automáticamente en un sintetizador de ADN (Applied Biosystems, Forster City, Ca, ABI-391, modo PCR), se desbloquearon, y se purificaron mediante precipitación de etanol. Los cebadores usados para los análisis se muestran en Tabla 11.

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en un reactor termal (ciclador Rapid, Idaho Technology, Idaho) mezclando 20 ng cromosómicos con la mezcla maestra de PCR (contenía 0,5  $\mu$ M de cada cebador de oligonucleótido, BSA 0,25  $\mu$ M (Stratagene), tampón bajo en sal (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM y Tritón X-100 al 0,1%) (Stratagene), 0,25 mM de cada desoxinucleósido trifosfato y 0,5 U de ADN polimerasa larga Taq Plus (Stratagene)). El volumen final fue de 10  $\mu$ l (todas las concentraciones dadas son concentraciones en el volumen final). Se llevó a cabo predesnaturalización a 94°C durante 30 segundos. 30 ciclos de lo precedente se llevaron a cabo: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, fusión a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 1 minuto.

Se usaron las siguientes combinaciones de cebadores (la longitud de los productos amplificados se da entre paréntesis).

*cfp7*: pVF1 y PVR1 (274 pb), pVF1 y PVR2 (197 pb), pVF3 y PVR1 (302 pb), pVF3 y PVR2 (125 pb).

# ES 2 291 810 T3

TABLA 10

*Cepas de micobacterias usadas en este ejemplo*

Espece y cepa(s)	Fuente
1. <i>M. tuberculosis</i> H37R vATCC <sup>a</sup> (ATCC 27294)	
2. H37R aATTC (ATCC 25177)	
3. Erdman	Obtenida de A. Lazlo, Ottawa, Canadá
4. Subcepa de BCG de <i>M. bovis</i> : Danish 1331	SSI <sup>b</sup>
5. Chinese	SSI <sup>c</sup>
6. Canadian	SSI <sup>c</sup>
7. Glaxo	SSI <sup>c</sup>
8. Russia	SSI <sup>c</sup>
9. Pasteur	SSI <sup>c</sup>
10. Japan	WHO <sup>e</sup>
11. <i>M. bovis</i> MNC 27	SSI <sup>c</sup>
12. <i>M. africanum</i>	Aislado a partir de un paciente danés
13. <i>M. leprae</i> (derivada de armadillo)	Obtenida de J.M. Colston, Londres, Reino Unido
14. <i>M. avium</i> (ATCC 15769)	ATCC
15. <i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	ATCC
16. <i>M. marinum</i> (ATCC 927)	ATCC
17. <i>M. scrofulaceum</i> (ATCC 19275)	ATCC
18. <i>M. intercellulare</i> (ATCC 15985)	ATCC
19. <i>M. fortuitum</i> (ATCC 6841)	ATCC
20. <i>M. xenopi</i> 21. <i>M. flavescens</i>	Aislada de un paciente danés Aislada de un paciente danés
22. <i>M. szulgai</i>	Aislada de un paciente danés

23. <i>M. terrae</i>	SSI <sup>c</sup>
24. <i>E. coli</i>	SSI <sup>d</sup>
25. <i>S. aureus</i>	SSI <sup>d</sup>
<sup>a</sup> American Type Culture Collection, EE.UU. <sup>b</sup> Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca. <sup>c</sup> La colección de los inventores del Departamento de Micobacteriología, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca. <sup>d</sup> Departamento de Microbiología Clínica, Statens Serum Institut, Dinamarca. <sup>e</sup> WHO International Laboratory for Biological Standard, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca.	

TABLA 11

Secuencia del oligonucleótido *cfp7*

Orientación y oligonucleótido	Secuencias (5'-3') <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup> (nucleótidos)
Sentido		
pVR1	<u>GTACGAGAATTC</u> ATGTCGCAAATCATG (SEQ ID N°.: 35)	91-105 (SEQ ID N°.: 1)
pVR2	<u>GTACGAGAATTC</u> GAGCTTGGGGTGCCG (SEQ ID N°.: 36)	168-181 (SEQ ID N°.: 1)
Antisentido		
pVF1	<u>CGTTAGGGATCCT</u> CATCGCCATGGTGTGTTGG (SEQ ID N°.: 38)	340-323 (SEQ ID N°.: 1)
pVF3	<u>CGTTAGGGATCC</u> GGTTCCACTGTGCC (SEQ ID N°.: 39)	268-255 (SEQ ID N°.: 1)
<sup>a</sup> Los nucleótidos subrayados no están contenidos en la secuencia de nucleótidos de <i>cfp7</i> . <sup>b</sup> Las posiciones referidas son de la parte no subrayada de los cebadores y corresponden a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID N°.: 1 para <i>cfp7</i> .		

La prueba de bandas de Southern se llevó a cabo como se describe previamente (Oettinger y Andersen, 1994) con las siguientes modificaciones: se digirieron 2 µg de ADN genómico con *PvuII*, se electroforetizaron en un gel de agarosa al 0,8%, y se transfirieron sobre una membrana de nylon (Hybond N-plus; Amersham International plc., Little Chalfont, Reino Unido) con un dispositivo de transferencia de vacío (Milliblot, TM-µ; Millipore Corp., Bedford, MA). El *cfp7*, se amplificaron fragmentos de genes mediante PCR a partir del plásmido pRVN01 usando los cebadores mostrados en la Tabla 11. Las sondas se marcaron no radiactivamente con un kit de quimioluminiscencia potenciada (ECL, Amersham International plc, Little Chalfont, Reino Unido). La hibridación y detección se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Los resultados se resumieron en Tabla 12.

# ES 2 291 810 T3

TABLA 12

Análisis interespecífico de los genes *cfp7*, *cfp9* y *mpt51* mediante PCR y/o realización de prueba de bandas de Southern y de proteína MPT51 mediante realización de prueba de bandas de Western

Especie y cepa	PCR	Prueba de bandas de Southern
	<i>cfp7</i>	<i>cfp7</i>
1. <i>M. tub.</i> H37Rv	+	+
2. <i>M. tub.</i> H37Rva	+	N.D.
3. <i>M. tub.</i> Erdmann	+	+
4. <i>M. bovis</i>	+	
5. BCG de <i>M. bovis</i> Danish 1331	+	+
6. BCG de <i>M. bovis</i> Japan	+	+
7. BCG de <i>M. bovis</i> Chinese	+	+
8. BCG de <i>M. bovis</i> Canadian	+	+
9. BCG de <i>M. bovis</i> Glaxo	+	+
10. BCG de <i>M. bovis</i> Russia	+	+
11. BCG de <i>M. bovis</i> Pasteur	+	+
12. <i>M. africanum</i>	+	+
13. <i>M. leprae</i> -	-	-
14. <i>M. avium</i>	+	+
15. <i>M. kansasii</i>	+	+
16. <i>M. marinum</i>	-	+
17. <i>M. scrofulaceum</i>	-	-
18. <i>M. intercellulare</i>	+	+
19. <i>M. fortuitum</i>		
20. <i>M. flavescens</i>	+	+
21. <i>M. xenopi</i>	-	N.D.
22. <i>M. szulgai</i>	(+)	-
23. <i>M. terrae</i>	-	N.D.
+, reacción positiva; - ninguna reacción, N.D. no determinada		

## ES 2 291 810 T3

Se encontró *cfp7* en el complejo *M. tuberculosis* incluyendo BCG y las micobacterias ambientales; *M. avium*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. intracellulare* y *M. flavescens*.

### Lista de referencias

- Andersen, P. y Heron, I., 1993, *J. Immunol. Methods* 161: 29-39.
- Andersen, A. B. y col., 1992, *Infect. Immun.* 60: 2317-2323.
- Andersen, P., 1994, *Infect. Immun.* 62: 2536-44.
- Andersen, A. B. y col., 1995, *J. Immunol.* 154: 3359-72.
- Barkholt, V. y Jensen, A. L., 1989, *Anal. Biochem.* 177: 318-322.
- Bodorovsky, M., y J. McIninch. 1993, *Computers Chem.* 17: 123-133.
- van Dyke M. W. y col., 1992, *Gene* páginas 99-104.
- Gosselin y col., 1992, *J. Immunol.* 149: 3477-3481.
- Harboe, M. y col., 1996, *Infect. Immun.* 64: 16-22.
- von Heijne, G., 1984, *J. Mol. Biol.* 173: 243-251.
- Hochstrasser, D.F. y col., 1988, *Anal. Biochem.* 173: 224-235.
- Köler, G. y Milstein, C., 1975, *Nature* 256: 495-497.
- Li, H. y col., 1993, *Infect. Immun.* 61: 1730-1734.
- Lindblad E.B. y col., 1997, *Infect. Immun.* 65: 623-629.
- Mahairas, G. G. y col., 1996, *J. Bacteriol.* 178: 1274-1282.
- Maniatis T. y col., 1989, "Molecular cloning: A laboratory manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Nagai, S. y col., 1991, *Infect. Immun.* 59: 372-382.
- Oettinger, T. y Andersen, Å. B., 1994, *Infect. Immun.* 62: 2058-2064.
- Ohara, N. y col., 1995, *Scand. J. immunol.* 41: 233-442.
- Pal P. G. y Horwitz M. A., 1992, *Infect. Immun.* 60: 4781-92.
- Pearson, W. R. y Lipman D. J., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444-2448.
- Ploug, M. y col., 1989, *Anal. Biochem.* 181: 33-39.
- Porath, J. y col., 1985, *FEBS Lett.* 185: 306-310.
- Roberts, A.D. y col., 1995, *Immunol.* 85: 502-508.
- Sørensen, A.L. y col., 1995, *Infect. Immun.* 63: 1710-1717.
- Theisen, M. y col., 1995, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2: 30-34.
- Valdés-Stauber, N. y Scherer, S., 1994, *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3809-3814.
- Valdés-Stauber, N. y Scherer, S., 1996, *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1283-1286.
- Williams, N., 1996, *Science* 272: 27.
- Young, R. A. y col., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 2583-2587.

## REIVINDICACIONES

## 1. Una preparación de un fragmento polipéptido, el cual

- a) comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID N°.: 2,
- b) comprende una subsecuencia del fragmento de polipéptido definido en a) el cual tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácido, siendo dicha subsecuencia inmunológicamente equivalente al polipéptido definido en a) con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune protectora contra infecciones con micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis o con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune significativa diagnósticamente que indica sensibilización previa o sensibilización en curso con antígenos derivados de micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis,
- c) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia con el polipéptido definido en a) o la subsecuencia definida en b) de al menos el 80% y que al mismo tiempo es inmunológicamente equivalente al polipéptido definido en a) con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune protectora contra infecciones con micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis o con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune significativa diagnósticamente que indica sensibilización previa o sensibilización en curso con antígenos derivados de micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis,

dicha preparación contiene como máximo un 5% en peso de otro material polipeptídico con el cual el fragmento de polipéptido está asociado de forma nativa, con la condición de que, cuando está constituido por la secuencia de aminoácidos 1-96 de SEQ. ID N°.: 2, el fragmento de polipéptido está libre de cualquier otro antígeno de bacterias que pertenezca al complejo de tuberculosis.

2. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho fragmento de polipéptido comprende un epítipo para una célula T ayudante.

## 3. La preparación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, la cual:

- 1) induce una liberación de IFN- $\gamma$  a partir de linfocitos T de memoria cebados retirados de un ratón dentro de 2 semanas después de infección primaria o dentro de 4 días después de que el ratón haya sido puesto a prueba con infección de nuevo con micobacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis, la inducción se llevó a cabo mediante la adición del polipéptido a una suspensión que comprende aproximadamente 200.000 células del bazo por ml, la adición del polipéptido da como resultado una concentración de 1-4  $\mu$ g del polipéptido por ml de suspensión, siendo la liberación de IFN- $\gamma$  valorable mediante determinación de IFN- $\gamma$  en sobrenadante recogido dos días después de la adición del polipéptido a la suspensión, y/o
- 2) induce una liberación de IFN- $\gamma$  de al menos 300 pg por encima del nivel precedente anterior de aproximadamente 1.000.000 PBMC (células mononucleares periféricas de la sangre) humanas por ml aisladas de pacientes de TB en la primera fase de infección, o de donantes vacunados con BCG sanos, o a partir de sanos puestos en contacto con pacientes de TB, la inducción se lleva a cabo mediante la adición del polipéptido a una suspensión que comprende las aproximadamente 1.000.000 PBMC por ml, la adición del polipéptido dio como resultado una concentración de 1-4  $\mu$ g de polipéptido por ml de suspensión, siendo valorable la liberación del IFN- $\gamma$  mediante determinación del IFN- $\gamma$  en sobrenadante recogido 2 días después de la adición del polipéptido a la suspensión; y/o
- 3) induce una liberación de IFN- $\gamma$  a partir de PBMC bovina derivada de animales previamente sensibilizados con micobacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis, siendo dicha liberación al menos dos veces la liberación observada a partir de PBMC bovinas derivadas de animales no previamente sensibilizados con micobacterias pertenecientes al complejo de tuberculosis.

4. La preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el fragmento de polipéptido está libre de cualquier otro antígeno de bacterias que pertenezcan al complejo de tuberculosis.

5. La preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el fragmento de polipéptido está libre de cualquier secuencia señal.

6. Una preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la identidad de secuencia con el polipéptido mostrada en SEQ ID N°.: 2 o con subsecuencias de dicho polipéptido que tienen al menos 12 residuos de aminoácido es al menos del 85%, al menos del 90%, al menos del 91%, al menos del 92%, al menos del 93%, al menos del 94%, al menos del 95%, al menos del 96%, al menos del 97%, al menos del 98%, al menos del 99%, y al menos del 99,5%.



## ES 2 291 810 T3

7. Una preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el fragmento de polipéptido está lipidizado tal como para permitir un efecto autocoadyuvante del polipéptido.

8. Un polipéptido de condensación que comprende al menos un fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes y al menos un compañero de condensación.

9. Un polipéptido de condensación de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compañero de condensación se selecciona del grupo constituido por un fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y otro fragmento de polipéptido derivado de una bacteria que pertenece al complejo de tuberculosis.

10. Una preparación de un fragmento de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para usar como un producto farmacéutico, conteniendo dicha preparación como máximo un 5% en peso de otro material polipeptídico con el cual el fragmento de polipéptido está asociado de forma nativa.

11. El uso de una preparación de un fragmento de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la preparación de una composición farmacéutica para la diagnosis de o vacunación contra tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* o *Mycobacterium bovis*, conteniendo como máximo dicha preparación un 5% en peso de otro material polipeptídico con el cual el fragmento de polipéptido está asociado de forma nativa.

12. Un fragmento de ácido nucleico en forma aislada el cual comprende una secuencia de ácidos nucleicos la cual codifica un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o comprende una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a ello.

13. Un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12, el cual es un fragmento de ADN.

14. Una vacuna que comprende un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, llevando a cabo la vacuna expresión *in vivo* de antígeno por un animal, incluyendo un ser humano, a quien se ha administrado la vacuna, siendo efectiva la cantidad de antígeno expresado para conferir resistencia sustancialmente incrementada a infecciones con micobacterias del complejo de la tuberculosis en un animal, incluyendo un ser humano.

15. Un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13 para usar como un producto farmacéutico.

16. El uso de un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13 en la preparación de una composición farmacéutica para la diagnosis de o la vacunación contra tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* o *Mycobacterium bovis*.

17. Una composición inmunológica que comprende un fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

18. Una composición inmunológica de acuerdo con la reivindicación 17, la cual comprende adicionalmente un transportador, vehículo o coadyuvante farmacéuticamente aceptable.

19. Una composición inmunológica de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el transportador se selecciona del grupo constituido por un polímero al cual el/los polipéptido(s) está(n) unido(s) mediante interacción no covalente hidrófoba, tal como un plástico, por ejemplo poliestireno, un polímero al cual el/los polipéptido(s) está(n) unido(s) covalentemente, tal como un polisacárido, y un polipéptido, por ejemplo seroalbúmina bovina, ovoalbúmina o hemocianina de lapa de California; el vehículo se selecciona del grupo constituido por un diluyente y un agente de suspensión; y el coadyuvante se selecciona del grupo constituido por bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), Quil A, poli I:C, coadyuvante incompleto de Freund, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, monofosforil lípido A (MPL) y dipéptido de muramilo (MDP).

20. Una composición inmunológica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que comprende al menos dos fragmentos de polipéptidos diferentes, siendo cada fragmento de polipéptido diferente un fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

21. Una composición inmunológica de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende 3-20 fragmentos de polipéptidos diferentes, siendo cada fragmento de polipéptido diferente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

22. Una composición inmunológica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, la cual está en forma de una vacuna.

23. Una composición inmunológica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, la cual está en forma de un reactivo de prueba cutánea.

## ES 2 291 810 T3

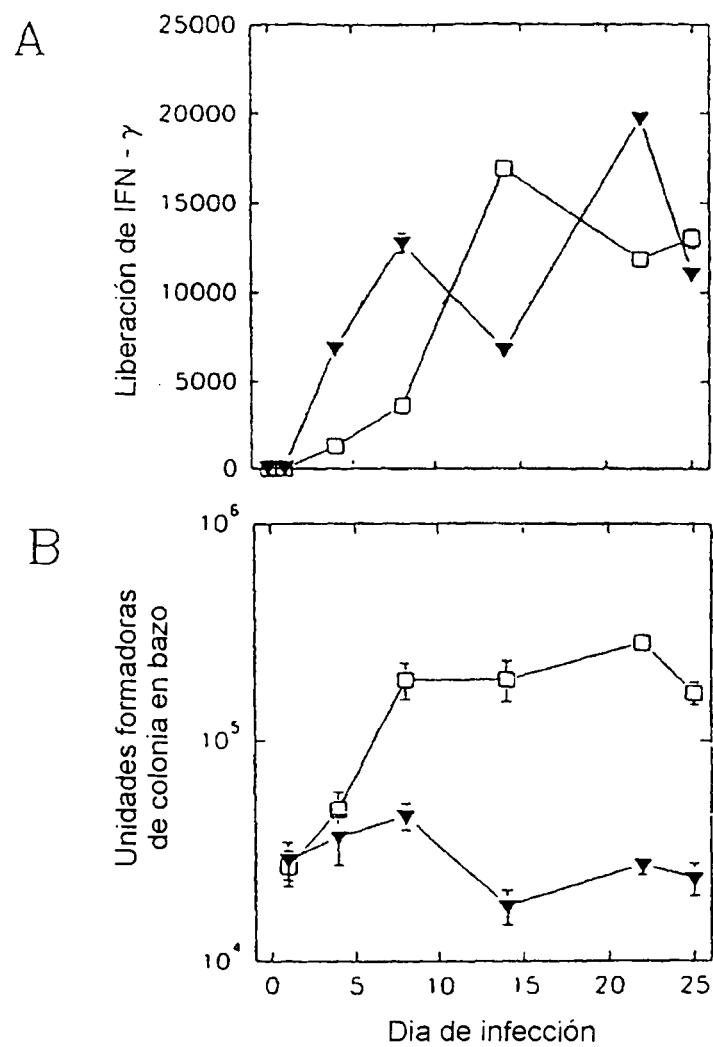
24. Una vacuna para inmunizar un animal, incluyendo un ser humano, contra tuberculosis causada por micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis, que comprenden como el componente efectivo un microorganismo no patógeno, en el que al menos se ha incorporado una copia de un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 dentro del genoma del microorganismo en una manera que permite al microorganismo expresar y opcionalmente segregar el polipéptido.
25. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 24, en la que el microorganismo es una bacteria.
26. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 25, en la que la bacteria se selecciona del grupo constituido por los géneros *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, y *Escherichia*.
27. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 26, en la que el microorganismo es BCG de *Mycobacterium bovis*, tal como cepa de BCG de *Mycobacterium bovis*: Danish 1331.
28. Una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-27, en la que al menos 2 copias de un fragmento de ADN que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 se incorporan dentro del genoma del microorganismo.
29. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 28, en la que el número de copias es al menos 5.
30. Un vector de expresión replicable el cual comprende un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13.
31. Un vector de acuerdo con la reivindicación 30, el cual se selecciona del grupo que consta de un virus, un bacteriófago, un plásmido, un cósmido, y un microcromosoma.
32. Una célula transformada que alberga al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 30 ó 31.
33. Una célula transformada de acuerdo con la reivindicación 32, la cual es una bacteria que pertenece al complejo de tuberculosis, tal como una célula de BCG de *M. tuberculosis bovis*.
34. Una célula transformada de acuerdo con la reivindicación 32 ó 33, la cual expresa un fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
35. Un procedimiento para producir un fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende
- insertar un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13 dentro de un vector el cual es capaz de replicarse en una célula huésped, introduciendo el vector recombinante resultante dentro de la célula huésped, cultivando la célula huésped en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para llevar a cabo expresión del polipéptido, y recuperando el polipéptido de la célula huésped o medio de cultivo; o
- aislar el polipéptido de un filtrado de cultivo a corto plazo como se define en la reivindicación 1; o
- aislar el polipéptido de micobacterias completas del complejo de tuberculosis o de lisados o fracciones de las mismas, por ejemplo fracciones que contienen paredes celulares, o
- sintetizar el polipéptido mediante síntesis de péptidos en fase sólida o líquida.
36. Un procedimiento para producir una composición inmunológica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-21 que comprende
- preparar, sintetizar o aislar un fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y solubilizar o dispersar el polipéptido en un medio para una vacuna, y
- opcionalmente añadir otros antígenos de *M. tuberculosis* y/o un transportador, vehículo y/o sustancia coadyuvante,
- o
- cultivar una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 32-34, y
- transferir las células a un medio para una vacuna, y
- opcionalmente añadir un transportador, vehículo y/o sustancia coadyuvante.
37. Un procedimiento *in vivo* para diagnosticar sensibilización en curso o previa en un animal o ser humano con bacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una muestra de sangre del animal con el fragmento de polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, una

liberación significativa dentro de la fase extracelular de al menos una citoquina por células mononucleares en la muestra de sangre que es indicativa de que el animal está sensibilizado.

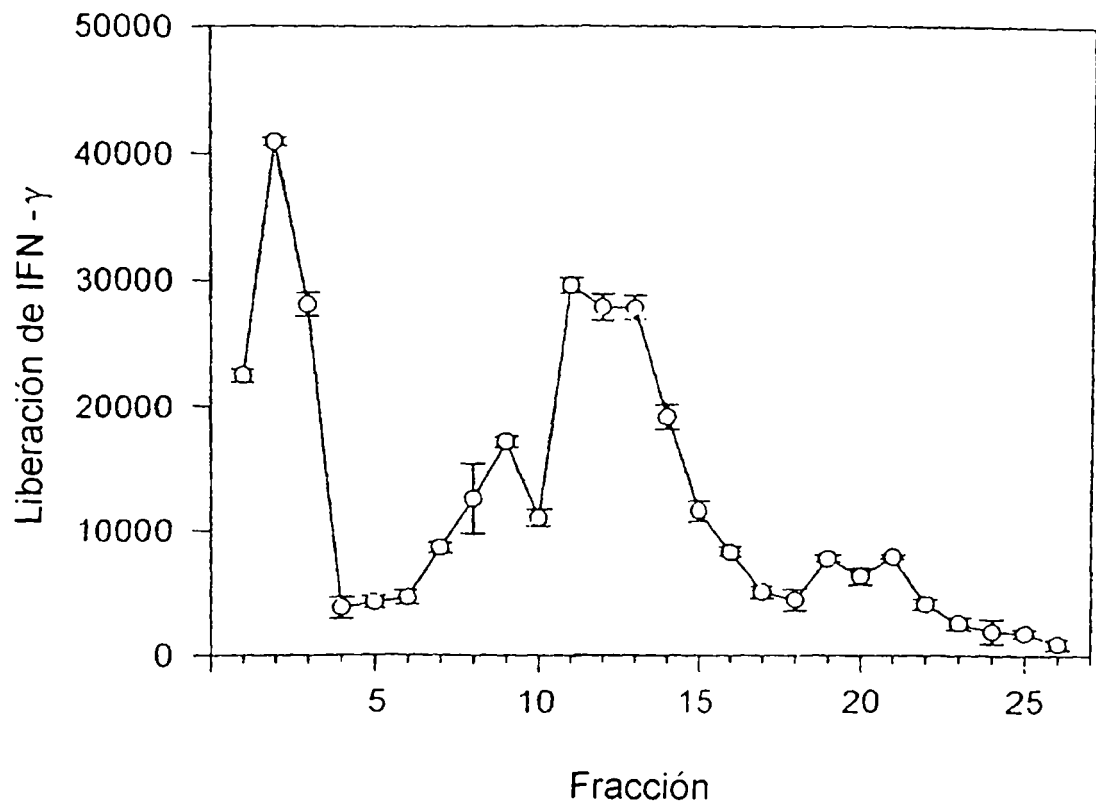
38. Una composición para diagnosticar tuberculosis en un animal, incluyendo un ser humano, que comprende un fragmento de polipéptido definido en reivindicaciones 1-9, o un fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, opcionalmente en combinación con un medio para detección.

39. Un anticuerpo monoclonal o policlonal, el cual se hace reaccionar específicamente con un fragmento de polipéptido en un inmunoensayo, o un fragmento de unión específico de dicho anticuerpo, en el que dicho fragmento de polipéptido se selecciona de:

- a) una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID N°: 2,
- b) una subsecuencia del fragmento de polipéptido definido en a) el cual tiene una longitud de al menos 12 residuos de aminoácidos, siendo dicha subsecuencia inmunológicamente equivalente al polipéptido definido en a) con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune contra infecciones con micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis o con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune significativa diagnósticamente que indica sensibilización previa o sensibilización en curso con antígenos derivados de micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis, o
- c) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia con el polipéptido definido en a) o la subsecuencia definida en b) de al menos el 80% y que al mismo tiempo es inmunológicamente equivalente al polipéptido definido en a) con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune protectora contra infecciones con micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis o con respecto a la capacidad de provocar una respuesta inmune significativa diagnósticamente que indica sensibilización previa o sensibilización en curso con antígenos derivados de micobacterias que pertenecen al complejo de tuberculosis.



**Fig. 1**



**Fig. 2**

```

1  GCGCGCGCGGT ACCTATGTGG CCGCCGATGC TCGCGNCGCG TCGACCTATA CCGGGTTCTG      60
    -35 región                               -10 región

61  ATCGAACCCT GCTGACCGAG AGGACTTGTG ATG TCG CAA ATC ATG TAC AAC TAC CCC GCG      120
    Shine Delgarno M S Q I M Y N Y P A

121  ATG TTG GGT CAC GCC GCG GAT ATG GCC GGA TAT GCC GGC ACG CTG CAG AGC TTG GGT GCC      180
    M L G H A G D M A G Y A G T L Q S L G A

181  GAG ATC GCC GTG GAG CAG GCC GCG TTG CAG AGT GCG TGG CAG GGC GAT ACC GGG ATC ACG      240
    E I A V E Q A A L Q S A W Q G D T G I T

241  TAT CAG GCG TGG CAG GCA CAG TGG AAC CAG GCC ATG GAA GAT TTG GTG CCG GCC TAT CAT      300
    Y Q A W Q A Q W N Q A M E D L V R Y H A

301  GCG ATG TCC AGC ACC CAT GAA GCC AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCC CGC GAC ACC GCC GAA      360
    Y M S S T H E A N T M A M A R D T A E

361  GCC GCC AAA TGG GGC GGC TAG      381
    A A K W G G +

```

Fig. 3

# ES 2 291 810 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Statens Seruminstitut
  - (B) CALLE: Artillerivej 5
  - 10 (C) CIUDAD: Copenhagen
  - (E) PAÍS: Dinamarca
  - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 2300 S
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Fragmentos de ácido nucleico y fragmentos de polipéptidos derivados de *M. tuberculosis*
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 173
- (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 20 (A) TIPO DE MEDIO: disquete
  - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - 25 (D) SOFTWARE: PatentIn Emisión #1.0, Versión #1.30 (EPO)

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°.: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 381 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIPO DE CADENA: doble
  - 35 (D) TOPOLOGÍA: circular
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 40 (A) ORGANISMO: *Mycobacterium tuberculosis*
  - (B) CEPA: H37Rv
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 45 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
  - (B) LOCALIZACIÓN: 91..381
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 50 (A) NOMBRE/CLAVE: -35\_señal
  - (B) LOCALIZACIÓN: 14..19
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 55 (A) NOMBRE/CLAVE: -10\_señal
  - (B) LOCALIZACIÓN: 47..50
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 60 (A) NOMBRE/CLAVE: RBS
  - (B) LOCALIZACIÓN: 78..84
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 65 (A) NOMBRE/CLAVE: mat\_péptido
  - (B) LOCALIZACIÓN: 91..381

## ES 2 291 810 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°.: 1:

5	GGCCGCCGGT ACCTATGTGG CCGCCGATGC TGC GGACGCG TCGACCTATA CCGGGTCTG	60
10	ATCGAACCCT GCTGACCGAG AGGACTTGTG ATG TCG CAA ATC ATG TAC AAC TAC <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 80%;"> <span>Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 80%;"> <span>1 5</span> </div>	114
15	CCC GCG ATG TTG GGT CAC GCC GGG GAT ATG GCC GGA TAT GCC GGC ACG Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr	162
20	CTG CAG AGC TTG GGT GCC GAG ATC GCC GTG GAG CAG GCC GCG TTG CAG Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln	210
25	AGT GCG TGG CAG GGC GAT ACC GGG ATC ACG TAT CAG GCG TGG CAG GCA Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala	258
30	CAG TGG AAC CAG GCC ATG GAA GAT TTG GTG CGG GCC TAT CAT GCG ATG Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met	306
35	TCC AGC ACC CAT GAA GCC AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCC CGC GAC ACC Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr	354
40	GCC GAA GCC GCC AAA TGG GGC GGC TAG Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly	381

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°.: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID N°.: 2:

50	Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 80%;"> <span>1 5 10 15</span> </div>	
55	Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 80%;"> <span>20 25 30</span> </div>	
60	Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 80%;"> <span>35 40 45</span> </div>	
65	Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 80%;"> <span>50 55 60</span> </div>	
70	Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 80%;"> <span>65 70 75 80</span> </div>	
75	Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 80%;"> <span>85 90 95</span> </div>	