

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 897 933**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/35** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2015** **PCT/GB2015/052362**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016** **WO16024129**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2015** **E 15753982 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.09.2021** **EP 3180353**

---

(54) Título: **Proteínas de *Mycobacterium tuberculosis***

(30) Prioridad:

**15.08.2014 BG 11180414**  
**30.06.2015 BG 11204515**

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

**03.03.2022**

(73) Titular/es:

**OXFORD IMMUNOTEC LIMITED (100.0%)**  
**3 Worcester Street**  
**Oxford OX1 2PZ, GB**

(72) Inventor/es:

**AMICOSANTE, MASSIMO;**  
**DURRANT, IAN y**  
**TASKER, SCOTT**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 897 933 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a fragmentos inmunológicamente activos (péptidos o péptidos mimótopos) de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). En particular, la invención se refiere a un grupo de péptidos de *M. tuberculosis* que son altamente antigenicos y caracteristicos de las cepas clínicas de *M. tuberculosis*. Por 10 consiguiente, la invención se refiere además al uso de estos péptidos de *M. tuberculosis* en el diagnóstico de la infección por el complejo *M. tuberculosis*.

**Antecedentes**

15 La tuberculosis es una enfermedad infecciosa predominante provocada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). La mayoría de las infecciones producidas por el complejo *M. tuberculosis* son asintomáticas o latentes. Sin embargo, aproximadamente una de cada diez infecciones latentes prograda finalmente a una enfermedad activa (generalmente tuberculosis pulmonar) que, si se deja sin tratar, es mortal en más del 50 % de las personas.

20 El diagnóstico de laboratorio eficaz de la infección por el complejo *M. tuberculosis* es un aspecto clave para controlar la propagación de la tuberculosis. Asimismo, un diagnóstico rápido y fiable permite implementar el régimen de tratamiento correcto de manera oportuna.

25 Tradicionalmente, la infección por el complejo *M. tuberculosis* se ha diagnosticado mediante la demostración de micobacterias en los fluidos corporales mediante un examen microscópico (usando la tinción para bacilos acidorresistentes (AFB, Acid Fast Bacilli) o un cultivo microbiológico. Sin embargo, las muestras deben contener una alta concentración de micobacterias (es decir, de 5 a 10000/ml) para que el examen microscópico sea fiable y el diagnóstico basado en cultivos sea lento.

30 Los métodos más nuevos para diagnosticar la infección por el complejo *M. tuberculosis* implican detectar una reacción inmunitaria asociada con la infección. Al igual que otras micobacterias, *M. tuberculosis* estimula los linfocitos T CD4+ y CD8+, así como otras células inmunitarias, para provocar una fuerte reacción proinflamatoria de tipo 1 que implica la secreción de citocinas tales como el interferón (IFN)-γ y el Factor de Necrosis Tumoral (FNT)-α. Se pueden utilizar ensayos de liberación de IFN-γ (IGRA, *IFN-Gamma Release Assay*) para detectar esta reacción de Hipersensibilidad de Tipo Retardado (HTR). Los IGRA se basan en el principio de que los linfocitos T de personas sensibilizadas (infectadas) producen IFN-γ cuando se reencuentran con los antígenos de *M. tuberculosis*. Los IGRA disponibles en el mercado para *M. tuberculosis* incluyen el ensayo QuantiFERON-TB original y sus versiones potenciadas QuantiFERON-TB Gold y QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Cellestis International, Carnegie, Australia), el

35 enzimoinmunoanálisis por manchas (ELISPOT, *Enzyme-Linked ImmunoSPOT*) T SPOT-TB (Oxford Immunotec, Oxford, Reino Unido) y diferentes especialidades veterinarias (Bovigam®, Cervigam®, Primagam®, Prionics, Schlieren-Zurich, Suiza).

40 Una ventaja significativa de estos IGRA es su mayor especificidad para la infección por el complejo *M. tuberculosis*. Esto se logra mediante el uso de antígenos específicos de *M. tuberculosis* que están codificados en la Región de Diferencia (RD)1, un segmento genómico que está ausente en la vacuna de bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y en la mayoría de las micobacterias ambientales. Los antígenos RD1 utilizados en los IGRA incluyen ESAT6 y CFP10. Si bien el diagnóstico basado en la reacción inmunitaria a tales antígenos es eficaz, existe una necesidad constante de desarrollar nuevos antígenos alternativos para usar en pruebas de diagnóstico. Por ejemplo, es importante que los antígenos utilizados en las pruebas de diagnóstico sean diferentes a los utilizados en las vacunas para evitar la obtención de resultados falsos positivos en los sujetos vacunados. ESAT6, en particular, se puede incluir en vacunas frente a *M. tuberculosis*. Por supuesto, también se pueden usar nuevos antígenos eficaces en vacunas para prevenir o tratar la infección por el complejo *M. tuberculosis*.

45 El documento WO 03/004520 describe un método para identificar genes micobacterianos que son inducidos o regulados positivamente en condiciones de cultivo que carecen de nutrientes y que mantienen la latencia micobacteriana, y el uso de los genes o péptidos identificados que codifican en vacunas o para identificar la presencia de una infección por micobacterias en una muestra clínica. El documento US 2006/115847 divulga un método para diagnosticar la infección por el complejo *M. tuberculosis* en un sujeto, que comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia un conjunto de fragmentos derivados de una proteína de *M. tuberculosis*.

**Sumario de la invención**

50 Sorprendentemente, los inventores han identificado varios antígenos de *M. tuberculosis* y fragmentos de los mismos que son particularmente útiles en pruebas de diagnóstico para *M. tuberculosis*. Los antígenos identificados contienen varios epítopos de linfocitos T y/o linfocitos B que se asocian eficazmente con moléculas o anticuerpos de Antígenos

Leucocitarios Humanos (ALH), respectivamente. Por lo tanto, los antígenos y fragmentos pueden utilizarse para detectar una reacción inmunitaria anti-*M. tuberculosis* y, por tanto, para determinar la presencia o ausencia de infección por el complejo *M. tuberculosis* en un individuo. Los antígenos y fragmentos también son capaces de inducir una reacción inmunitaria en una persona, por lo que pueden utilizarse para la vacunación profiláctica o terapéutica.

5 Por consiguiente, la invención proporciona un método para diagnosticar la infección por el complejo *M. tuberculosis* en un sujeto, que comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia un conjunto de fragmentos derivados de una proteína de *M. tuberculosis*, en donde el conjunto comprende dos o más fragmentos diferentes derivados de Rv0840c (SEQ ID NO: 6) y en donde los fragmentos del conjunto forman una quimioteca de fragmentos proteicos que abarca al menos el 80 % de la secuencia de SEQ ID NO: 6 en la que los fragmentos tienen una longitud de 12 a 18 aminoácidos y se solapan en 9 a 12 aminoácidos.

10 La invención también proporciona el uso de un conjunto de fragmentos para diagnosticar la infección por el complejo *M. tuberculosis* en una muestra obtenida de un sujeto, en donde el conjunto comprende dos o más fragmentos diferentes derivados de Rv0840c (SEQ ID NO: 6) y los fragmentos del conjunto forman una quimioteca de fragmentos proteicos que abarca al menos el 80 % de la secuencia de SEQ ID NO: 6 en la que los fragmentos tienen una longitud de 12 a 18 aminoácidos y se solapan en 9 a 12 aminoácidos.

#### 20 **Descripción de las figuras**

25 La **FIGURA 1** muestra la reactividad de diferentes sueros de un grupo (Controles, ITL (Infección Tuberculosa Latente), TB (TuBerculosis) activa y TB curada) hacia un conjunto seleccionado de epítopos de linfocitos B de las proteínas descritas en el presente documento.

30 La **FIGURA 2A** muestra una comparación de la Serie A, Serie B y Máx de Serie A/Serie B en el ensayo T-SPOT, n = 183 (87 donantes con TB, 96 donantes sanos).

35 La **FIGURA 2B** muestra la sensibilidad y la especificidad del Máx de Serie A/Serie B en el ensayo T-SPOT.TB, calculadas mediante el análisis de CRD (Curva de Rendimiento Diagnóstico). n = 183 (87 donantes con TB, 96 donantes sanos)

40 La **FIGURA 3** muestra una comparación de conjuntos de epítopos de CD4/CD8 y las correspondientes quimiotecas peptídicas en el ensayo T-SPOT. A - Rv1495, B - TBFG\_13463, C - Rv3845 (87 donantes con TB).

45 La **FIGURA 4** muestra el rendimiento de las quimiotecas peptídicas en el ensayo T-SPOT-TB. A - Mtub2\_17866, B - Rv2654c, C - Rv1677, D - Rv0840c. (87 donantes con TB).

50 La **FIGURA 5** muestra una comparación del máx de los conjuntos de epítopos de CD4/CD8 TBFG\_13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677, y del máx de las quimiotecas de los péptidos TBFG 13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677 (n = 183; con TB = 87).

55 La **FIGURA 6** muestra la curva CRD para un ensayo T-SPOT-TB usando un conjunto de epítopos combinado que comprende todos los conjuntos de epítopos de CD4/CD8 (TBFG 13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677).

60 La **FIGURA 7** muestra el reemplazo de ESAT-6 por la quimioteca de péptidos Rv0840c (n = 183; 87 con TB).

65 La **FIGURA 8** muestra el reemplazo de CPF10 por la quimioteca de péptidos Rv0840c (n = 183; 87 con TB).

70 La **FIGURA 9** muestra la adición de Rv0840c a la Serie A y a la Serie B en el ensayo T-SPOT-TB. Más específicamente, la Figura 8 muestra una comparación de las curvas CRD para el Máx de Serie A/Serie B y el Máx de Serie A/Serie B/quimioteca de péptidos Rv0840c.

#### 45 **Descripción del listado de secuencias**

75 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de TBFG\_13463.

80 La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de Mtub2\_17866.

85 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de Rv2654c.

90 La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de Rv3845.

95 La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de Rv1495.

100 La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de Rv0840c.

105 La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de Rv1677.

110 Las SEQ ID NO: 8 a 10 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase II derivados de TBFG\_13463.

115 Las SEQ ID NO: 11 y 12 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase II derivados de Mtub2\_17866.

120 Las SEQ ID NO: 13 a 19 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase II derivados de Rv0840c.

125 Las SEQ ID NO: 20 a 24 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase II derivados de Rv3845.

130 Las SEQ ID NO: 25 a 27 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase II derivados de Rv2654c.

135 Las SEQ ID NO: 28 a 33 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase II derivados de Rv1677.

140 Las SEQ ID NO: 34 a 40 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase II derivados de Rv1495.

145 Las SEQ ID NO: 41 a 48 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase I derivados de TBFG\_13463.

150 Las SEQ ID NO: 49 a 52 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase I derivados de Mtub2\_17866.

155 Las SEQ ID NO: 53 a 58 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase I derivados de Rv2654c.

160 Las SEQ ID NO: 59 a 64 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase I derivados de Rv3845.

165 Las SEQ ID NO: 65 a 69 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase I derivados de Rv1495.

Las SEQ ID NO: 70 a 87 son secuencias de aminoácidos de epítopos de ALH de clase I derivados de Rv0840c.

Las SEQ ID NO: 88 a 100 son secuencias de aminoácidos de epítopos de linfocitos B derivados de TBFG\_13463.

Las SEQ ID NO: 101 a 103 son secuencias de aminoácidos de epítopos de linfocitos B derivados de Mtub2\_17866.

La SEQ ID NO: 104 es secuencias de aminoácidos de epítopos de linfocitos B derivados de Rv2654c.

5 Las SEQ ID NO: 105 a 112 son secuencias de aminoácidos de epítopos de linfocitos B derivados de Rv3845.

Las SEQ ID NO: 113 a 120 son secuencias de aminoácidos de epítopos de linfocitos B derivados de Rv1495.

Las SEQ ID NO: 121 a 136 son secuencias de aminoácidos de epítopos de linfocitos B derivados de RV0840c. Las SEQ ID NO: 167 - 181 son secuencias de aminoácidos de epítopos de linfocitos B derivados de RV1877.

Las SEQ ID NO: 137 a 141 son secuencias de aminoácidos de epitopos de linfocitos B derivados de Rv1677.

Las SEQ ID NO: 142 a 145 son epítopos de linfocitos B adicionales derivados de 1BFG\_13463. La SEQ ID NO: 146 es un análogo de linfocitos T adicional derivado de Mtbh3\_17862.

La SEQ ID NO: 146 es un epitopo de linfocitos T adquirido derivado de Mtub2\_1. Las SEQ ID NO: 147 y 148 son epitopos de linfocitos T adquiridos derivados de

Las SEQ ID NO: 147 y 148 son epitopos de linfocitos T adicionales derivados de Rv2634C. Las SEQ ID NO: 149 a 152 son epitopos de linfocitos T adicionales derivados de Rv3845.

La SEQ ID NO: 149 a 152 son epitopos de linfocitos T adiocionales derivados de RV3845. La SEQ ID NO: 153 es un epitopo de linfocitos T adicional derivado de Rv1495.

Las SEQ ID NO: 153 es un epitopo de linfocitos T adicionales derivado de RV1493. Las SEQ ID NO: 154 a 157 son epitopos de linfocitos T adicionales derivados de Ry0840c.

## Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que diferentes aplicaciones de los productos y métodos divulgados pueden adaptarse a las necesidades específicas de la técnica. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene únicamente el fin de describir aspectos particulares de la divulgación, y no se pretende ser limitante.

Adicionalmente, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un fragmento" incluye "fragmentos", la referencia a "una célula" incluye dos o más de dichas células, la referencia a "un sujeto" incluye dos o más de dichos sujetos, y similares.

## Métodos

Los presentes inventores han identificado antígenos de *M. tuberculosis* y fragmentos de los mismos que son capaces de desencadenar una reacción inmunitaria hacia *M. tuberculosis*. Por consiguiente, estos antígenos pueden usarse en métodos para diagnosticar la infección por el complejo *M. tuberculosis* en un sujeto. Los antígenos también pueden usarse para tratar o prevenir la infección por el complejo *M. tuberculosis* (infección por el complejo *M. tuberculosis*), por ejemplo, mediante vacunación. El complejo *M. tuberculosis* incluye uno o más de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* (incluyendo la cepa de bacilo de Calmette-Guérin), *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae* y *Mycobacterium mungi*, entre otros. El complejo *M. tuberculosis* incluye preferentemente *Mycobacterium tuberculosis*.

En el presente documento, se describe un método para diagnosticar la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) en un sujeto, que comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) Rv0840c (SEQ ID NO: 6), o uno o más fragmentos del mismo; (b) TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), o uno o más fragmentos del mismo; (c) Rv1677 (SEQ ID NO: 7), o uno o más fragmentos del mismo; (d) Rv2654c (SEQ ID NO: 3), o uno o más fragmentos del mismo; (e) Rv3845 (SEQ ID NO: 4), o uno o más fragmentos del mismo; (f) Rv1495 (SEQ ID NO: 5), o uno o más fragmentos del mismo; y (g) Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2), o uno o más fragmentos del mismo. Por ejemplo, el método puede comprender detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos 5 o al menos seis de (a) a (g). El método puede comprender detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia la totalidad de (a) a (g).

lista.

El método comprende preferentemente detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia (i) Rv0840c (SEQ ID NO: 6), o uno o más fragmentos del mismo; (ii) TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), o uno o más fragmentos del mismo; (iii) Rv1677 (SEQ ID NO: 7), o uno o más fragmentos del mismo; (iv) Rv3845 (SEQ ID NO: 4), o uno o más fragmentos del mismo;

5 y (v) Rv2654c (SEQ ID NO: 3), o uno o más fragmentos del mismo. En la definición de (i) a (v) dada anteriormente, una reacción inmunitaria hacia cualquier combinación de uno o más de (i) a (iv) puede detectarse *in vitro*. Por ejemplo, para cada definición de (i) a (iv), se puede detectar una reacción inmunitaria *in vitro* hacia: (i); (ii); (iii); (iv); (v); (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i) y (v); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iv) y (v); (i), (ii) y (iii); (i), (ii) y (iv); (i), (ii) y (v); (i), (iii) y (iv); (i), (iii) y (v); (i), (iv) y (v); (ii), (iii) y (iv); (ii), (iii) y (v); (ii), (iv) y (v); (iii), (iv) y (v); (i), (ii), (iii) y (iv); (i), (ii), (iii) y (v). Las combinaciones de (i) a (v) se

10 pueden seleccionar independientemente de esta lista.

El método puede comprender detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia (i) Rv0840c (SEQ ID NO: 6), o uno o más fragmentos del mismo; (ii) TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), o uno o más fragmentos del mismo; (iii) Rv1677 (SEQ ID NO: 7), o uno o más fragmentos del mismo; y (iv) Rv2654c (SEQ ID NO: 3). En un aspecto, el método comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia Rv0840c (SEQ ID NO: 6), o uno o más fragmentos del mismo.

#### Fragments

20 Un fragmento de Rv0840c (SEQ ID NO: 6), TBFG 13463 (SEQ ID NO: 1), Rv1677 (SEQ ID NO: 7), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5) o Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2) puede ser una secuencia que comprende cinco o más aminoácidos que se ha obtenido mediante el truncamiento en el extremo N y/o en el extremo C de la secuencia original. Por ejemplo, el fragmento puede comprender aproximadamente 5 o más, aproximadamente 6 o más, aproximadamente 7 o más, aproximadamente 8 o más, aproximadamente 9 o más, aproximadamente 10 o más, aproximadamente 11 o más, aproximadamente 12 o más, aproximadamente 13 o más, aproximadamente 14 o más, aproximadamente 15 o más, aproximadamente 16 o más, aproximadamente 17 o más, aproximadamente 18 o más, aproximadamente 19 o más, aproximadamente 20 o más, aproximadamente 21 o más, aproximadamente 22 o más, aproximadamente 23 o más, aproximadamente 24 o más, aproximadamente 25 o más, aproximadamente 26 o más, o aproximadamente 27 o más aminoácidos. El fragmento puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 27, de aproximadamente 6 a aproximadamente 26, de aproximadamente 7 a aproximadamente 25, de aproximadamente 8 a aproximadamente 24, de aproximadamente 9 a aproximadamente 23, de aproximadamente 10 a aproximadamente 22, de aproximadamente 11 a aproximadamente 21, de aproximadamente 12 a aproximadamente 20, de aproximadamente 13 a aproximadamente 19, de aproximadamente 14 a aproximadamente 18, de aproximadamente 12 a aproximadamente 18, de aproximadamente 12 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 18, de aproximadamente 13 a aproximadamente 17, de aproximadamente 14 a aproximadamente 16, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud.

40 Los fragmentos pueden derivar químicamente de la proteína original, por ejemplo, mediante una escisión proteolítica, o pueden derivar, en un sentido intelectual, de la proteína original, por ejemplo, haciendo uso de la secuencia de aminoácidos de la proteína original y sintetizando los fragmentos tomando como base la secuencia. Los fragmentos pueden sintetizarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

45 El término "fragmento" incluye no solo moléculas en las que los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino también moléculas en las que se invierte el enlace peptídico. Tales peptidomiméticos retroinversos se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como los descritos en Meziere *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237. Este enfoque implica preparar pseudopeptidos que contienen cambios que implican la cadena principal y no la orientación de las cadenas laterales. Meziere *et al.* (1997) muestran que, al menos para las reacciones del MHC de clase II y de los linfocitos T auxiliares, estos pseudopeptidos son útiles. Los péptidos retroinversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

55 De manera similar, se puede prescindir del enlace peptídico por completo siempre que se utilice un resto conector adecuado que conserve la separación entre los átomos de carbono de los restos de aminoácidos; se prefiere particularmente que el resto conector tenga sustancialmente la misma distribución de cargas y sustancialmente la misma planicidad que un enlace peptídico. También se apreciará que el fragmento puede bloquearse convenientemente en su extremo N o C para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exoproteolítica. Por ejemplo, el grupo amino del extremo N de los péptidos puede protegerse haciéndolo reaccionar con un ácido carboxílico, y el grupo carboxilo del extremo C del péptido puede protegerse haciéndolo reaccionar con una amina. También pueden añadirse uno o más restos de aminoácidos adicionales en el extremo N y/o en el extremo C del fragmento, por ejemplo, para aumentar la estabilidad del fragmento. Otros ejemplos de modificaciones incluyen glicosilación y fosforilación. Otra modificación potencial es que los hidrógenos de las aminas de la cadena lateral de R o K pueden reemplazarse por grupos metíleno (-NH<sub>2</sub> → -NH(Me) o -N(Me)<sub>2</sub>).

Los fragmentos de Rv0840c (SEQ ID NO: 6), TBFG 13463 (SEQ ID NO: 1), Rv1677 (SEQ ID NO: 7), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5) o Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2) también pueden incluir variantes de fragmentos que aumenten o disminuyan la semivida de los fragmentos *in vivo*. Algunos ejemplos de variantes capaces de aumentar la semivida de los fragmentos descritos en el presente documento incluyen análogos

5 peptoides de los fragmentos, derivados de D-aminoácidos de los fragmentos e híbridos de péptido-peptoide. El fragmento también puede comprender formas de D-aminoácido del fragmento. La preparación de polipéptidos usando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos disminuye en gran medida cualquier degradación indeseada de dicho agente mediante procesos metabólicos normales, disminuyendo las cantidades de agente que es necesario administrar, junto con la frecuencia de su administración. También pueden usarse las formas de D-aminoácido de la

10 proteína original.

Los fragmentos descritos en el presente documento se pueden obtener de variantes de corte y empalme de las proteínas originales codificadas por el ARNm generadas mediante el corte y empalme alternativo de los transcritos primarios que codifican las cadenas de la proteína original. Los fragmentos también pueden derivar de mutantes de

15 aminoácidos, de variantes de glicosilación y otros derivados covalentes de las proteínas originales que conservan al menos una propiedad de unión al MHC o de unión al anticuerpo de la proteína original. Algunos ejemplos de derivados incluyen moléculas en donde los fragmentos descritos en el presente documento están modificados covalentemente por sustitución, un medio químico, enzimático u otro medio apropiado con un resto distinto a un aminoácido natural.

20 El método puede comprender detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más fragmentos de Rv0840c (SEQ ID NO: 6), TBFG 13463 (SEQ ID NO: 1), Rv1677 (SEQ ID NO: 7), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5) o Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2). Por ejemplo, el método puede comprender detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19

25 o más, 20 o más, 25 o más, o 30 o más fragmentos hacia Rv0840c (SEQ ID NO: 6), TBFG 13463 (SEQ ID NO: 1), Rv1677 (SEQ ID NO: 7), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5) o Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2). Si el método comprende detectar una reacción inmunitaria hacia dos o más fragmentos derivados de

30 una proteína particular, todos los fragmentos derivados de esa proteína pueden ser iguales. Como alternativa, algunos o todos los fragmentos derivados de esa proteína pueden ser diferentes. Por ejemplo, si el método comprende detectar una reacción inmunitaria hacia 3 fragmentos derivados de Rv0840c (SEQ ID NO: 6), los 3 fragmentos pueden ser (i) 3 del mismo fragmento; (ii) 2 del mismo fragmento y un fragmento diferente; o (iii) 3 fragmentos diferentes.

En algunos aspectos, el método descrito en el presente documento comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más conjuntos de fragmentos. Los conjuntos de fragmentos se describen en detalle a

35 continuación.

#### Muestras

La detección *in vitro* de una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) a (g) definidos anteriormente se realiza usando

40 una muestra obtenida del sujeto. La muestra puede ser un líquido corporal, tal como sangre, plasma, suero, esputo u otras secreciones respiratorias, saliva, orina o líquido cefalorraquídeo. La muestra es preferentemente sangre, plasma, suero o esputo, u otras secreciones respiratorias. Como alternativa, la muestra puede ser una muestra de tejido, tal como una biopsia o un aspirado. Por ejemplo, la muestra puede ser un aspirado de ganglio linfático, o una muestra tomada del interior o alrededor de una lesión de tuberculosis, tal como un granuloma. En otro aspecto, la muestra

45 puede obtenerse de un fluido corporal o una muestra de tejido, tal como un lisado celular.

#### Sujeto

El método de la invención puede usarse para diagnosticar la infección por el complejo *M. tuberculosis* en cualquier

50 sujeto adecuado. El sujeto es generalmente un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser producido otro animal o mamífero, por ejemplo, un animal de granja comercial, tal como un caballo, una vaca, una oveja o un cerdo, un animal de laboratorio, tal como un ratón o una rata, un animal de compañía, tal como un gato, un perro, un conejo o conejillo de indias, u otro animal tal como un ave o un primate.

#### 55 Reacciones inmunitarias

La reacción inmunitaria que se detecta *in vitro* puede ser cualquier reacción que sea desencadenada por uno o más de (a) a (g). La reacción inmunitaria puede estar mediada por cualquier tipo de célula inmunitaria. Por ejemplo, la

60 reacción inmunitaria puede estar mediada por linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, neutrófilos, basófilos, mastocitos, eosinófilos, linfoblastos innatos (ILC, *Innate Lymphoid Cells*), linfocitos citolíticos naturales (NK, *Natural Killer*), monocitos, macrófagos y/o timocitos. La reacción inmunitaria es preferentemente una reacción de linfocitos T.

La reacción de linfocitos T es preferentemente la secreción de citocinas y, más preferentemente, la secreción de IFN- $\gamma$  (IFNy). La reacción de linfocitos T puede ser la proliferación de linfocitos T. Como alternativa, la reacción inmunitaria

65 puede ser una reacción de linfocitos B. La reacción de linfocitos B puede ser la proliferación de linfocitos B, o la producción o secreción de anticuerpos. La reacción inmunitaria es preferentemente la producción de anticuerpos frente a uno o más de (a) a (g) definidos anteriormente. Los métodos para medir la proliferación de linfocitos T, la proliferación

de linfocitos B, la secreción de citocinas y la secreción o producción de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

La reacción inmunitaria puede producirse *in vitro*. Preferentemente, la reacción inmunitaria es una reacción Inmunitaria Mediada por Células (IMC) *in vitro*. Como se describe con mayor detalle a continuación, una reacción IMC es una

5 reacción inmunitaria en la que no participan anticuerpos. En cambio, una reacción IMC puede implicar la activación de fagocitos, una activación de linfocitos T citotóxicos, un aumento en la producción de diversas citocinas y/o la liberación de diversas citocinas como reacción frente a un antígeno. Los métodos para detectar reacciones de IMC *in vitro* se conocen en la técnica y se describen con más detalle a continuación.

10 Como alternativa, la reacción inmunitaria puede producirse *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos frente a uno o más de (a) a (g) definidos anteriormente pueden producirse *in vivo*, pero detectarse *in vitro* usando un método descrito en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en el sujeto y retirarse del sujeto en una muestra, tal como una muestra de sangre. A continuación, puede ponerse en contacto la muestra (y los anticuerpos) con uno o

15 más de (a) a (g) definidos anteriormente para detectar la presencia de los anticuerpos y/o cuantificar los anticuerpos, por ejemplo, mediante un enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Los ELISA se describen con más detalle en los Ejemplos 1 a 3 a continuación. La proliferación de linfocitos T y la proliferación de linfocitos B *in vivo* también se pueden medir *in vitro*. Por ejemplo, puede ponerse en contacto una muestra de sangre del sujeto con uno o más de (a) a (g) y se puede medir el predominio de los linfocitos T y/o linfocitos B específicos del antígeno.

20 El método descrito en el presente documento puede detectar la presencia o ausencia de una reacción inmunitaria. La presencia de una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) a (g) definidos anteriormente puede indicar que el sujeto está infectado con *M. tuberculosis*. La ausencia de una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) a (g) definidos anteriormente puede indicar que el sujeto no está infectado con *M. tuberculosis*. En los métodos que implican la detección de una reacción inmunitaria hacia dos o más de (a) a (g) definidos anteriormente, la presencia de una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) a (g) puede indicar infección, como se explica con mayor detalle posteriormente.

25

### *Ensayos de las reacciones IMC*

30 Las reacciones inmunitarias mediadas por células (IMC) se utilizan comúnmente para definir el estado inmunitario de un individuo. Normalmente, en la técnica de la inmunología clínica, la expresión reacción IMC abarca pruebas cutáneas *in vivo*, ensayos de proliferación de linfocitos y la detección *in vitro* de citocinas producidas por Células MonoNucleares Periféricas (CMNP) en presencia de un antígeno específico. El método descrito en el presente documento puede  
35 comprender la detección de una reacción inmunitaria mediada por células *in vitro*. En particular, se puede detectar la reacción IMC basada en citocinas *in vitro* hacia las proteínas y los péptidos descritos en el presente documento. Este ensayo se denomina a continuación en el presente documento "Ensayo de IMC".

40 Las células del sistema inmunitario son capaces de producir moléculas efectoras inmunitarias tales como citocinas después de la estimulación por parte de un antígeno. Los ensayos de IMC consisten en la incubación de una muestra celular con un antígeno y la medición de la presencia (o la ausencia) o de la cantidad de una molécula efectora inmunitaria tal como una citocina, para proporcionar una indicación de la capacidad del individuo para generar una reacción inmunitaria mediada por células frente al antígeno seleccionado. Las células para usar en un ensayo de IMC incluyen poblaciones aisladas de linfocitos (particularmente linfocitos T) y Células Presentadoras de los Antígenos (CPAg). Las CPAg participan en el procesamiento del antígeno para que este último pueda ser reconocido por los receptores de linfocitos T en la superficie de cada linfocito T. El reconocimiento del antígeno puede inducir la producción de citocinas. Las células productoras de citocinas pueden identificarse mediante citometría de flujo. La citometría de flujo puede usarse para cuantificar la frecuencia de las células productoras de citocinas y/o la cantidad de producción de citocinas por parte de las células. Las citocinas inducidas por el antígeno pueden ser liberadas al medio de ensayo y detectadas directamente mediante, por ejemplo, métodos de ELISA, o cuantificarse en términos de la frecuencia de los linfocitos T secretores de citocinas usando un enzimoinmunoanálisis por manchas (ELISPOT). El método de la invención comprende preferentemente un ELISPOT.

55 El enzimoinmunoanálisis por manchas (ELISPOT), de otro modo conocido como ensayo de inmunoplaca en filtro, fue desarrollado inicialmente para detectar y cuantificar los linfocitos B secretores de anticuerpos individuales. En el momento de su desarrollo, la técnica proporcionó una alternativa rápida y versátil a los ensayos convencionales con células formadoras de placa. Las recientes modificaciones han mejorado la sensibilidad del ELISPOT de forma que pueden detectarse células que producen tan pocas como 100 moléculas de una proteína específica por segundo. Esto hace que los ensayos de ELISPOT sean mucho más sensibles que los ensayos de ELISA convencionales. Los ensayos de ELISPOT aprovechan la concentración relativamente alta de un producto celular proteico dado (tal como

60 ensayos de ELISPOT aprovechan la concentración relativamente alta de un producto celular proteico dado (tal como una citocina) en el entorno inmediatamente circundante de la célula secretora de la proteína. Estos productos celulares se capturan y detectan usando anticuerpos de alta afinidad. El ensayo ELISPOT se revisa en "Current Protocols in Immunology", Unidad 6.19, páginas 6.19. 1-8.

65 El ensayo ELISPOT implica normalmente seis etapas: (1) recubrir con un anticuerpo purificado específico para una citocina una placa de microvaloración soportada en membrana; (2) bloquear la placa para impedir la absorción no

específica de cualquier otra proteína; (3) incubar las células secretoras de citocinas con los reactivos apropiados; (4) eliminar las células y los reactivos; (5) añadir un segundo anticuerpo marcado anticitocina; y (6) detectar el complejo anticuerpo-citocina en la membrana.

- 5 El método de la invención comprende preferentemente un ensayo T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, Reino Unido). El ensayo T-SPOT.TB es una variante simplificada de la técnica de ensayo ELISPOT. El ensayo T-SPOT.TB está diseñado para la detección de linfocitos T efectores que reaccionan a la estimulación con antígenos específicos de *M. tuberculosis*. El ensayo enumera los linfocitos T específicos de la TB activados individuales. Es adecuado para usar con todos los pacientes con riesgo de infección TB latente (ITL) o con sospecha de tener la enfermedad de TB, 10 independientemente de la edad, sexo, etnia, terapia o estado inmunitario. Se utilizan dos series separadas de antígenos, que simulan las proteínas RD1 bien caracterizadas ESAT-6 y CFP10, para optimizar la sensibilidad de la prueba.

*Proteínas de M. tuberculosis*

- 15 En algunos aspectos, el método de la invención comprende además detectar una o más proteínas adicionales de *M. tuberculosis*. La una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales pueden ser cualquier proteína de *M. tuberculosis*. En la técnica, se conocen numerosas proteínas de *M. tuberculosis*. La una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales pueden comprender una proteína RD1. La proteína RD1 puede comprender una o ambas de CFP-10 y 20 ESAT-6.

*Conjuntos de fragmentos*

- 25 El método descrito en el presente documento puede comprender detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más conjuntos de fragmentos, en donde cada conjunto comprende dos o más fragmentos derivados de TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5), Rv0840c (SEQ ID NO: 6) o Rv1677 (SEQ ID NO: 7). Por ejemplo, cada conjunto puede comprender tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, o 250 o más, fragmentos derivados de TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5), Rv0840c (SEQ ID NO: 6) o Rv1677 (SEQ ID NO: 7).

- 35 El método puede comprender detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, o 14 o más conjuntos de fragmentos definidos anteriormente. Cuando el método comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia dos o más conjuntos de fragmentos, cada conjunto puede comprender fragmentos derivados de la misma proteína o una proteína diferente seleccionada entre TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5), Rv0840c (SEQ ID NO: 6) y Rv1677 (SEQ ID NO: 7). Cuando el método comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia tres o más conjuntos 40 de fragmentos, cada uno de los conjuntos puede comprender fragmentos derivados de una proteína diferente. Como alternativa, algunos o todos los conjuntos pueden comprender fragmentos derivados de la misma proteína. Por ejemplo, si el método comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia tres conjuntos de fragmentos, todos los conjuntos pueden comprender fragmentos derivados de la misma proteína. Como alternativa, dos de los conjuntos 45 pueden comprender fragmentos derivados de la misma proteína, y el tercer conjunto puede comprender fragmentos derivados de una proteína diferente, o cada uno de los tres conjuntos puede comprender fragmentos derivados de una proteína diferente. Si cualquiera de los dos o más conjuntos se obtiene de la misma proteína, esos conjuntos pueden comprender los mismos fragmentos o diferentes.

- 50 Como se expone a continuación, el método también puede comprender detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia una o más quimiotebas de fragmentos proteicos y/o uno o más conjuntos de epítopos. Cuando el método comprende detectar la reacción inmunitaria *in vitro* hacia una o más quimiotebas de fragmentos proteicos y uno o más conjuntos de epítopos, los fragmentos comprendidos en la quimioteca o quimiotebas de fragmentos proteicos pueden obtenerse de la misma proteína o de dos o más proteínas diferentes como fragmentos comprendidos en el (los) conjunto(s) de epítopos.

55 *Quimiotebas de fragmentos proteicos*

- En un aspecto descrito en el presente documento, los fragmentos de un grupo forman una quimioteca de fragmentos proteicos. Una quimioteca de fragmentos proteicos comprende una pluralidad de fragmentos derivados de una proteína original (para la presente divulgación, TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5), Rv0840c (SEQ ID NO: 6) o Rv1677 (SEQ ID NO: 7)), que en conjunto engloban al menos el 10 %, tal como al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 %, de la secuencia de la proteína original. En la presente invención, los fragmentos de un conjunto forman una quimioteca de fragmentos proteicos que engloba al menos el 80 % de la secuencia de la proteína a partir de la que se obtienen los fragmentos. Más preferentemente, los

fragmentos de un conjunto forman una quimioteca de fragmentos proteicos que engloba toda la secuencia de la proteína a partir de la que se obtienen los fragmentos.

La quimioteca de fragmentos proteicos puede comprender fragmentos que son capaces de estimular los linfocitos T CD4+ y/o CD8+. Preferentemente, la quimioteca de fragmentos proteicos comprende fragmentos que son capaces de estimular los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+. En la técnica se sabe que el tamaño óptimo del fragmento para la estimulación es diferente para los linfocitos T CD4+ y CD8+. Los fragmentos que consisten aproximadamente en 9 aminoácidos (nonámeros) normalmente estimulan únicamente los linfocitos T CD8+, y los fragmentos que consisten aproximadamente en 20 aminoácidos (icosámeros) normalmente estimulan únicamente los linfocitos T CD4+. En términos generales, esto es debido a que los linfocitos T CD8+ tienden a reconocer a su antígeno basándose en su secuencia, mientras que los linfocitos T CD4+ tienden a reconocer a su antígeno basándose en su estructura de un mayor nivel. Sin embargo, los fragmentos que consisten aproximadamente en 15 aminoácidos (pentadecámeros) pueden estimular los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+. Por consiguiente, la quimioteca de fragmentos proteicos comprende preferentemente fragmentos que tienen aproximadamente 15 aminoácidos, tal como aproximadamente 12 aminoácidos, aproximadamente 13 aminoácidos, aproximadamente 14 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 16 aminoácidos, aproximadamente 17 aminoácidos o aproximadamente 18 aminoácidos de longitud.

Todos los fragmentos de un conjunto pueden tener la misma longitud. Como alternativa, un conjunto puede comprender fragmentos de diferentes longitudes. Las longitudes de los fragmentos se han analizado anteriormente.

Una quimioteca de fragmentos proteicos puede comprender fragmentos cuyas secuencias se solapan. Por consiguiente, cada conjunto puede comprender fragmentos cuyas secuencias se solapan. Las secuencias pueden solaparse en uno o más, tal como dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 o más, aminoácidos. Preferentemente, las secuencias se solapan en 9 o más aminoácidos, tal como 10 o más, 11 o más, o 12 o más aminoácidos, ya que esto maximiza el número de fragmentos que comprenden los nonámeros capaces de estimular los linfocitos T CD8+. Más preferentemente, las secuencias se solapan en 11 aminoácidos. Todos los fragmentos solapantes de un conjunto pueden solaparse en el mismo número de aminoácidos.

Como alternativa, un conjunto puede comprender fragmentos cuyas secuencias se solapan en diferentes números de aminoácidos.

La quimioteca de fragmentos proteicos puede comprender fragmentos de 12 a 18 (tal como de 12 a 15, de 15 a 18, de 13 a 17 o de 14 a 16) aminoácidos de longitud que se solapan en de 9 a 12 (tal como de 9 a 11 o de 10 a 12) aminoácidos. Por ejemplo, la quimioteca de fragmentos proteicos puede comprender fragmentos de (i) 14 aminoácidos de longitud que se solapan en 9, 10 u 11 aminoácidos, (ii) 15 aminoácidos de longitud que se solapan en 9, 10 u 11 aminoácidos, o (iii) 16 aminoácidos de longitud que se solapan en 9, 10 u 11 aminoácidos. La quimioteca de fragmentos proteicos comprende preferentemente fragmentos de 15 aminoácidos de longitud que se solapan en 11 aminoácidos.

Las propiedades generales de los fragmentos se han expuesto anteriormente.

#### Conjuntos de epítopos

Un epítopo es la parte de un antígeno que es reconocida por el sistema inmunitario. Específicamente, un epítopo es la parte de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo, un linfocito B o un linfocito T. Por consiguiente, un epítopo de linfocitos T es la parte de un antígeno que es reconocido por un linfocito T. Como los linfocitos T reconocen el antígeno a través del receptor de linfocitos T (RCT), un epítopo de linfocitos T puede ser la parte de un antígeno que se une al (es decir, es reconocido por el) receptor de linfocitos T. De manera similar, un epítopo de linfocitos B es la parte de un antígeno que es reconocido por un linfocito B. Dado que los linfocitos B reconocen el antígeno a través del receptor de linfocitos B (RCB), un epítopo de linfocitos B puede ser la parte de un antígeno que se une al (es decir, es reconocido por el) receptor de linfocitos B.

Los epítopos de linfocitos B y linfocitos T pueden identificarse analizando proteínas nativas completas y fragmentadas, o proteínas antigenéticas recombinantes, para el reconocimiento por el RCB o RCT, respectivamente. Los epítopos de linfocitos B y linfocitos T también pueden identificarse usando métodos informáticos, tales como en los presentes ejemplos. Los resultados de la identificación informática de epítopos pueden verificarse analizando un péptido que tenga la secuencia del epítopo para determinar su antigenicidad. Los métodos para analizar la antigenicidad son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden examinar muestras de sangre del sujeto para detectar la presencia de anticuerpos frente al epítopo mediante ELISA.

En un aspecto descrito en el presente documento, uno o más de los fragmentos del conjunto comprenden un epítopo de linfocitos T o un epítopo de linfocitos B de la proteína de la que se obtienen los fragmentos. Esto da lugar a un "conjunto de epítopos". Uno o más de los fragmentos pueden comprender un epítopo de linfocitos T y un epítopo de linfocitos B. De manera similar, uno o más de los fragmentos pueden comprender uno o más (tal como dos, tres o cuatro) epítopos de linfocitos T y/o uno o más (tal como dos, tres o cuatro) epítopos de linfocitos B. Si un fragmento

- comprende más de un epítopo de linfocitos T o linfocitos B, los epítopos pueden ser iguales o diferentes. El epítopo de linfocitos T puede ser un epítopo de linfocitos T CD4+ o un epítopo de linfocitos T CD8+. Como alternativa, el epítopo de linfocitos T puede ser un epítopo para linfocitos T tanto CD4+ como CD8+. La Tabla 4 enumera epítopos de linfocitos T CD4+ ilustrativos. La Tabla 5 enumera epítopos de linfocitos T CD8+ ilustrativos. La Tabla 6 enumera epítopos de linfocitos B ilustrativos. El uno o más fragmentos de un conjunto pueden comprender cualquiera de estos epítopos. El uno o más fragmentos de un conjunto pueden comprender cualquiera de un número y una combinación de estos epítopos.
- 5 Las propiedades generales de los fragmentos se han expuesto anteriormente. Además, y como se ha indicado anteriormente en relación con los fragmentos que forman una quimioteca de fragmentos proteicos, los fragmentos que comprenden un epítopo de linfocitos T o un epítopo de linfocitos B pueden tener aproximadamente 12 aminoácidos, 10 aproximadamente 13 aminoácidos, aproximadamente 14 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, 15 aproximadamente 16 aminoácidos, aproximadamente 17 aminoácidos o aproximadamente 18 aminoácidos de longitud. Los fragmentos tienen preferentemente aproximadamente 15 aminoácidos de longitud. Como alternativa, los 15 fragmentos pueden tener al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 aminoácidos de longitud. Todos los fragmentos de un conjunto pueden tener la misma longitud, o un conjunto puede comprender fragmentos de diferentes longitudes.
- 20 Los fragmentos que comprenden un epítopo de linfocitos T o un epítopo de linfocitos B pueden tener secuencias solapadas, es decir, cada conjunto puede comprender fragmentos cuyas secuencias se solapen. Las secuencias pueden solaparse en al menos uno, tal como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20, aminoácidos. Preferentemente, 25 las secuencias se solapan en 9 o más aminoácidos, tal como 10 o más, 11 o más, o 12 o más aminoácidos. Lo más preferentemente, las secuencias se solapan en 11 aminoácidos. Todos los fragmentos solapantes de un conjunto pueden solaparse en el mismo número de aminoácidos. Como alternativa, un conjunto puede comprender fragmentos cuyas secuencias se solapan en diferentes números de aminoácidos.
- 30 Los fragmentos que comprenden un epítopo de linfocitos T o un epítopo de linfocitos B pueden tener de 12 a 18 (tal como de 12 a 15, de 15 a 18, de 13 a 17 o de 14 a 16) aminoácidos de longitud y/o solaparse en de 9 a 12 (tal como de 9 a 11 o de 10 a 12) aminoácidos. Por ejemplo, los fragmentos pueden tener (i) 14 aminoácidos de longitud y solaparse en 9, 10 u 11 aminoácidos, (ii) 15 aminoácidos de longitud y solaparse en 9, 10 u 11 aminoácidos, o (iii) 35 16 aminoácidos de longitud y solaparse en 9, 10 u 11 aminoácidos. En algunos casos, los fragmentos tienen preferentemente 15 aminoácidos de longitud y se solapan en 11 aminoácidos.

#### Células

- En un aspecto, el método descrito en el presente documento comprende poner en contacto una población de células inmunitarias obtenidas del sujeto con uno o más de (a) a (g) definidos anteriormente. El uno o más de (a) a (g) pueden 40 comprender una o más quimiotecas de fragmentos proteicos y/o uno o más conjuntos de epítopos como se ha explicado con detalle anteriormente.
- 45 Normalmente, la población se pone en contacto con una cantidad suficiente de uno o más de (a) a (g) para generar una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) a (g). La población puede ponerse en contacto con cualquier cantidad de uno o más de (a) a (g), tal como aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, 50 aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, 1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 500 mg/ml de uno o más de (a) a (g),
- La población de células inmunitarias puede comprender uno o más tipos de células inmunitarias seleccionadas entre linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, neutrófilos, basófilos, mastocitos, eosinófilos, linfoblastos innatos (ILC, *Innate Lymphoid Cells*), linfocitos citolíticos naturales (NK, *Natural Killer*), monocitos, macrófagos y timocitos. La 55 población puede comprender todos estos tipos de células inmunitarias. En un aspecto, la población de células inmunitarias comprende linfocitos T. Preferentemente, la población de células inmunitarias comprende linfocitos T y células presentadoras de antígenos, tales como linfocitos B, células dendríticas o macrófagos. En otro aspecto, la población de células inmunitarias comprende linfocitos B.
- 60 La población de células inmunitarias puede ponerse en contacto además con una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales definidas anteriormente. La población puede ponerse en contacto con una cantidad suficiente de una o más proteínas de *M. tuberculosis* para generar una reacción inmunitaria hacia una o más proteínas. Por ejemplo, la población puede ponerse en contacto con aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 1 µg/ml, 65 aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, 1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml,

aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 500 mg/ml de una o más proteínas adicionales de *M. tuberculosis*. Por ejemplo, la población de células inmunitarias puede ponerse en contacto además con dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales. Si la población se pone en contacto con dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales, la población puede ponerse en contacto con las dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales de forma simultánea o secuencial. Por otra parte, la población puede ponerse en contacto con una o más, o dos o más, de (a) a (g) y una o más, o dos o más, proteínas de *M. tuberculosis* de forma simultánea o secuencial. La población puede ponerse en contacto con cantidades iguales o diferentes de las dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales. Las cantidades de proteínas de *M. tuberculosis* se han explicado con detalle anteriormente.

- 5 10 En otro aspecto, el método descrito en el presente documento comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia dos o más de (a) a (g) definidos anteriormente, en donde la misma población de células inmunitarias se pone en contacto con dos o más de (a) a (g). Los dos o más de (a) a (g) pueden comprender una o más quimiocinas de fragmentos proteicos y/o uno o más conjuntos de epítopos como se ha explicado con detalle anteriormente. La población puede ponerse en contacto con dos o más de (a) a (g) de forma simultánea o secuencial. La población 15 puede ponerse en contacto con cantidades iguales o diferentes de dos o más de (a) a (g). Las cantidades de (a) a (g) se han explicado con detalle anteriormente.

En este aspecto, la población de células inmunitarias puede ponerse en contacto además con una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales definidas anteriormente. Por ejemplo, la población de células inmunitarias puede ponerse 20 en contacto además con dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales. Si la población se pone en contacto con dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales, la población puede ponerse en contacto con las dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales de forma simultánea o secuencial. Por otra parte, la población puede ponerse en contacto con una o más, o dos o más, de (a) a (g) y una o más, o dos o más, proteínas de *M. tuberculosis* de forma 25 simultánea o secuencial. La población puede ponerse en contacto con cantidades iguales o diferentes de las dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales. Las cantidades de proteínas de *M. tuberculosis* se han explicado con detalle anteriormente.

En un aspecto adicional, el método descrito en el presente documento comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia dos o más de (a) a (g) definidos anteriormente, en donde cada uno de los dos o más de (a) a (g) se 30 pone en contacto con una población diferente de células inmunitarias. Los dos o más de (a) a (g) pueden comprender una o más quimiocinas de fragmentos proteicos y/o uno o más conjuntos de epítopos como se ha explicado con detalle anteriormente. Cada población de células inmunitarias puede comprender el mismo tipo o tipos de célula(s) inmunitaria(s). Como alternativa, cada población de células inmunitarias puede comprender un tipo o tipos diferentes 35 de células inmunitarias. Las células inmunitarias ilustrativas se han detallado anteriormente. Por otra parte, los dos o más de (a) a (g) pueden ponerse en contacto con las diferentes poblaciones de células inmunitarias de forma simultánea o secuencial. Cada población diferente puede ponerse en contacto con cantidades iguales o diferentes de dos o más de (a) a (g). Las cantidades de (a) a (g) se han explicado con detalle anteriormente.

En este aspecto adicional, el método puede comprender además detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia una 40 o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales definidas anteriormente, en donde cada una de las proteínas de *M. tuberculosis* adicionales se pone en contacto con una población diferente de células inmunitarias. Por ejemplo, dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales pueden ponerse en contacto cada una con una población diferente de células inmunitarias. Cada población de células inmunitarias puede comprender el mismo tipo o tipos de célula(s) inmunitaria(s). Como alternativa, cada población de células inmunitarias puede comprender un tipo o tipos diferentes 45 de células inmunitarias. Las células inmunitarias ilustrativas se han detallado anteriormente. Por otra parte, las dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales pueden ponerse en contacto con las diferentes poblaciones de células inmunitarias de forma simultánea o secuencial. Cada población diferente puede ponerse en contacto con cantidades iguales o diferentes de las dos o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales. Las cantidades de proteínas de *M. tuberculosis* se han explicado con detalle anteriormente.

50 La puesta en contacto puede llevarse a cabo en cualquier volumen adecuado. Los volúmenes típicos de las muestras varían de aproximadamente 10 µl a aproximadamente 1 ml, preferentemente de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 500 µl, más preferentemente de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 200 µl. Normalmente, el período de tiempo durante el que las células se ponen en contacto con el uno o más de (a) a (g) (y 55 opcionalmente la una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales) es de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 50 horas, por ejemplo, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 40 horas, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 20 horas, de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas, preferentemente de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 2 horas. Las células 60 pueden estar en contacto con los antígenos durante una noche.

Las células pueden ponerse en contacto con el antígeno a cualquier temperatura adecuada. La temperatura adecuada normalmente está en el mismo intervalo que la temperatura corporal normal del ser humano o del animal a partir del cual se derivan las células. Normalmente, la incubación se lleva a cabo a una temperatura fija de entre 65 aproximadamente 4 °C y aproximadamente 38 °C, preferentemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 38 °C, más preferentemente aproximadamente a 37 °C.

Las células normalmente están presentes en pocillos. Las células están presentes preferentemente en los pocillos de una placa plana, que preferentemente es una placa soportada en membrana. Las muestras están presentes más preferentemente en los pocillos de una placa convencional de 96 o 384 pocillos. Tales placas son comercializadas por Fisher Scientific, VWR suppliers, Nunc, Starstedt o Falcon. Los pocillos normalmente tienen una capacidad de aproximadamente 25  $\mu$ l a aproximadamente 250  $\mu$ l, de aproximadamente 30  $\mu$ l a aproximadamente 200  $\mu$ l, de aproximadamente 40  $\mu$ l a aproximadamente 150  $\mu$ l o de aproximadamente 50 a 100  $\mu$ l. Las células obtenidas a partir del sujeto pueden cultivarse antes de usarse en los métodos. Esto permite que haya presentes unas cifras iguales de células adherentes en cada muestra que se está ensayando. Como alternativa, si las células están inmovilizadas o capturadas, las células, tales como células de sangre roja, pueden contarse antes de colocarlas en las placas. Las técnicas de cultivo celular son bien conocidas por la persona experta en la materia. Las células se cultivan normalmente en las condiciones convencionales de 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en medio complementado con suero.

Las células pueden cultivarse en cualquier matraz o recipiente adecuado, y después transferirse a los pocillos. Las células se cultivan normalmente en pocillos. Las células se cultivan preferentemente en una placa plana que comprende dos o más pocillos, tal como una placa convencional de 96 o 384 pocillos. La incubación de las células con el marcador normalmente implica la sustitución del medio de cultivo de cada pocillo por una solución adecuada que comprende el marcador. Las soluciones adecuadas son bien conocidas por un experto en la materia.

## 20 Interpretación de resultados

Como se ha expuesto anteriormente, el método descrito en el presente documento comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más antígenos de *M. tuberculosis*. La detección de una reacción inmunitaria indica que el sujeto tiene una infección por el complejo *M. tuberculosis*. La falta de detección (o ausencia de detección) de una reacción inmunitaria indica que el sujeto no tiene infección por el complejo *M. tuberculosis*. Por consiguiente, el método descrito en el presente documento comprende preferentemente detectar *in vitro* la presencia o ausencia de una reacción inmunitaria hacia uno o más antígenos de *M. tuberculosis*.

En otras palabras, la detección, o la presencia, de una reacción inmunitaria hacia uno o más antígenos de *M. tuberculosis* indica que el sujeto tiene una infección por el complejo *M. tuberculosis*. La falta de detección, o la ausencia, de una reacción inmunitaria hacia uno o más antígenos de *M. tuberculosis* indica que el sujeto no tiene infección por el complejo *M. tuberculosis*.

Se pueden aplicar diferentes criterios para determinar un resultado positivo de la prueba (es decir, la presencia de infección por el complejo *M. tuberculosis* en el sujeto). En primer lugar, se obtiene un resultado positivo de la prueba si se detecta una reacción inmunitaria hacia uno o más (a) a (g) definidos anteriormente. En segundo lugar, se obtiene un resultado positivo de la prueba si se detecta una reacción inmunitaria hacia uno o más (a) a (g) definidos anteriormente y se detecta una reacción inmunitaria hacia uno o más antígenos de *M. tuberculosis* adicionales definidos anteriormente. La reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) a (g) y, si procede, la una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales pueden detectarse (o no detectarse) en la misma o diferente población de células, como se ha explicado con detalle anteriormente.

En un aspecto preferido descrito en el presente documento, la divulgación proporciona un método para determinar si un sujeto tiene o no una infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que comprende detectar *in vitro* la presencia o ausencia de una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) Rv0840c (SEQ ID NO: 6), o uno o más fragmentos del mismo; (b) TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), o uno o más fragmentos del mismo; (c) Rv1677 (SEQ ID NO: 7), o uno o más fragmentos del mismo; (d) Rv2654c (SEQ ID NO: 3), o uno o más fragmentos del mismo; (e) Rv3845 (SEQ ID NO: 4), o uno o más fragmentos del mismo; (f) Rv1495 (SEQ ID NO: 5), o uno o más fragmentos del mismo; y (g) Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2), o uno o más fragmentos del mismo, en donde la presencia de una reacción inmunitaria indica que el sujeto tiene una infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y en donde la ausencia de una reacción inmunitaria indica que el sujeto no tiene una infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).

## Kits

La divulgación también proporciona una combinación de componentes descritos en el presente documento adecuados para usar en un método de la invención que se envasan en forma de un kit en un recipiente.

Específicamente, la divulgación proporciona un kit para diagnosticar la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) en un sujeto que comprende uno o más de (a) Rv0840c (SEQ ID NO: 6), o uno o más fragmentos del mismo; (b) TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), o uno o más fragmentos del mismo; (c) Rv1677 (SEQ ID NO: 7), o uno o más fragmentos del mismo; (d) Rv2654c (SEQ ID NO: 3), o uno o más fragmentos del mismo; (e) Rv3845 (SEQ ID NO: 4), o uno o más fragmentos del mismo; (f) Rv1495 (SEQ ID NO: 5), o uno o más fragmentos del mismo; y (g) Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2), o uno o más fragmentos del mismo. Preferentemente, el kit contiene uno o más fragmentos definidos anteriormente en relación con quimioteas de fragmentos proteicos o conjuntos de epítopos.

El kit puede comprender además un medio para detectar la reacción inmunitaria. Por ejemplo, el kit puede comprender algunos o todos los equipos o reactivos necesarios para realizar un ELISA o un ELISPOT. En particular, el kit puede comprender una o más placas convencionales de fondo plano o soportadas en membrana de 96 o 384 pocillos. El kit 5 puede comprender el uno o más de los reactivos necesarios para recubrir las placas pertinentes y/o para bloquear las placas a fin de evitar una absorción inespecífica. El kit puede comprender uno o más anticuerpos marcados para detectar citocinas u otros productos inmunitarios. El kit puede comprender uno o más reactivos de detección para detectar los anticuerpos marcados.

10 Medicamentos, métodos y uso terapéutico

La divulgación proporciona una composición que comprende uno o más de (a) a (g) definidos anteriormente, para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por el complejo *M. tuberculosis* en un sujeto. La divulgación proporciona adicionalmente un método para tratar o prevenir la infección por el complejo *M. tuberculosis* en un sujeto, 15 que comprende administrar al sujeto uno o más de (a) a (g) definidos anteriormente.

La infección por el complejo *M. tuberculosis* puede ser una infección activa o latente.

20 La formulación de una composición adecuada se puede llevar a cabo usando químicas y metodologías de formulación farmacéutica convencionales, todas ellas muy asequibles al experto en la materia.

Por ejemplo, se pueden combinar uno o más de (a) a (g) con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En el excipiente o vehículo, puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son 25 generalmente agentes farmacéuticos que no inducen una reacción inmunitaria en el individuo que recibe la composición, y que pueden administrarse sin producir excesivos efectos secundarios. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol, tioglicerol y etanol. También se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de 30 ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Se puede encontrar una exposición detallada de excipientes, vehículos y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

35 Tales composiciones se pueden preparar, acondicionar o comercializar en una forma adecuada para la administración en bolo o para la administración continua. Las composiciones inyectables se pueden preparar, acondicionar o comercializar en formas farmacéuticas unitarias, tal como en ampollas o en recipientes multidosis que contengan un conservante. Las composiciones incluyen, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables. Tales 40 composiciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero sin limitación, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una composición para la administración parenteral, el principio activo se puede proporcionar en forma seca (p. ej., un polvo o granulado) para la reconstitución con un vehículo adecuado (p. ej., agua estéril apirógena) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las composiciones se pueden preparar, acondicionar o comercializar en forma de suspensión o solución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución se puede formular de acuerdo con la técnica conocida, 45 y puede comprender, además del principio activo, ingredientes adicionales tales como los agentes dispersantes, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Tales formulaciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando un diluyente o disolvente, no tóxico, parenteralmente aceptable, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero sin limitación, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro de sodio y aceites no volátiles tales como monoglicéridos o diglicéridos sintéticos.

50 Otras composiciones útiles que se pueden administrar por vía parenteral incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal o como un componente de un sistema polimérico biodegradable. Las composiciones para la liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, 55 un polímero poco soluble o una sal soluble en pequeñas cantidades.

Como alternativa, uno o más de (a) a (g) pueden encapsularse, adsorberse a, o asociarse con, vehículos de partículas. Los vehículos de partículas adecuados incluyen aquellos derivados de polímeros de polimetilmetacrilato, así como micropartículas de PLG derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicólicos). Véase, p. ej., Jeffery *et al.* (1993) 60 *Pharm. Res.* 10:362-368. También se pueden usar otros sistemas de partículas y polímeros, por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas moléculas.

65 La formulación de la composición dependerá de factores tales como la naturaleza de las sustancias en la composición y el método de administración. La composición se puede administrar en una variedad de formas farmacéuticas. Puede administrarse por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, transdérmica, intradérmica, intraósea o mediante técnicas de infusión. Un médico será capaz de determinar la vía de administración necesaria para cada

persona en particular.

- Las composiciones administradas comprenderán una concentración adecuada de uno o más de (a) a (g) que sea eficaz sin provocar una reacción adversa. Normalmente, la concentración de cada proteína en la composición estará en el intervalo de 0,03 a 200 nmol/ml. Más preferentemente en el intervalo de 0,3 a 200 nmol/ml, de 3 a 180 nmol/ml, de 10 a 150 nmol/ml, de 50 a 200 nmol/ml o de 30 a 120 nmol/ml. La composición o las formulaciones deben tener una pureza superior al 95 % o 98 %, o una pureza de al menos el 99 %.
- La composición también puede comprender un adyuvante. El adyuvante se administra preferentemente en una cantidad que sea suficiente para aumentar el efecto de uno o más de (a) a (g). El adyuvante u otro agente terapéutico puede ser un agente que potencie los efectos de uno o más de (a) a (g). Por ejemplo, el otro agente puede ser una molécula inmunomoduladora o un adyuvante que potencie la reacción hacia uno o más de (a) a (g).
- En un aspecto descrito en el presente documento, el uno o más de (a) a (g) se usan en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Los agentes se pueden administrar por separado, simultánea o secuencialmente. Pueden administrarse en la misma o en diferentes composiciones que uno o más de (a) a (g). Por consiguiente, en un método descrito en el presente documento, el sujeto también puede tratarse con un agente terapéutico adicional.
- Por lo tanto, se puede formular una composición con uno o más de (a) a (g) y también una o más de otras moléculas terapéuticas. El uno o más de (a) a (g) pueden usarse, como alternativa, de forma simultánea, secuencial o separada con una o más de otras composiciones terapéuticas como parte de un tratamiento combinado.
- Los ejemplos no limitantes de adyuvantes incluyen alumbre, lípido monofosforílico, oligonucleótidos, toxina del cólera y adyuvante incompleto de Freund.
- La administración del uno o más de (a) a (g) puede ser mediante cualquier método adecuado como se ha descrito anteriormente. Las cantidades adecuadas de uno o más de (a) a (g) pueden determinarse empíricamente, pero normalmente están en el intervalo dado a continuación. Para la prevención de la infección por el complejo *M. tuberculosis*, puede bastar con una sola administración de la composición para obtener un efecto beneficioso para el paciente. Sin embargo, se apreciará que el efecto beneficioso puede ser mayor si la composición se administra al sujeto más de una vez, en cuyo caso las pautas posológicas típicas pueden ser, por ejemplo, una vez o dos veces a la semana durante 2-4 semanas cada 6 meses, o una vez al día durante una semana cada cuatro a seis meses.
- Las posologías para la administración dependerán de varios factores, incluyendo la naturaleza de la composición, la vía de administración, y el programa y la cronología de la pauta de administración. Las dosis adecuadas pueden ser del orden de hasta 15 µg, hasta 20 µg, hasta 25 µg, hasta 30 µg, hasta 50 µg, hasta 100 µg, hasta 500 µg o más por administración. Las dosis adecuadas pueden ser de menos de 15 µg, pero al menos 1 ng, o al menos 2 ng, o al menos 5 ng, o al menos 50 ng, o al menos 100 ng, o al menos 500 ng, o al menos 1 µg, o al menos 10 µg. Para algunas moléculas, la dosis usada puede ser mayor, por ejemplo, de hasta 1 mg, hasta 2 mg, hasta 3 mg, hasta 4 mg, hasta 5 mg o mayor. Tales dosis pueden proporcionarse en una formulación líquida, a una concentración adecuada para permitir un volumen apropiado para su administración por la vía seleccionada.
- La dosis de uno o más de (a) a (g) que se va a administrar en la composición puede determinarse de acuerdo con diferentes parámetros, especialmente de acuerdo con la edad, el peso y el estado del sujeto que se va a tratar; la vía de administración; la pauta requerida. Un médico será capaz de determinar la vía de administración necesaria y la posología para cualquier sujeto particular. Una dosis diaria típica es de aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg de peso corporal, dependiendo de la actividad del inhibidor específico, la edad, el peso y el estado del sujeto que se vaya a tratar, así como de la frecuencia y la vía de administración. La dosis puede proporcionarse como una sola dosis o puede proporcionarse como múltiples dosis, por ejemplo, tomadas a intervalos regulares, por ejemplo, 2, 3 o 4 dosis administradas cada hora.
- La composición descrita en el presente documento, o (a) a (g) definidos anteriormente, se puede administrar al sujeto en un día. Como alternativa, la composición descrita en el presente documento (a) a (g) definidos anteriormente puede administrarse al sujeto en al menos dos días, tal como al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 días. El intervalo entre las ocasiones puede ser de 1 a 28 días, tal como de 3 a 25 días, de 6 a 22 días, de 9 a 18 días o de 12 a 15 días. Preferentemente, el intervalo entre ocasiones es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 días.
- Si el método para tratar o prevenir la infección por el complejo *M. tuberculosis* en un sujeto comprende administrar al sujeto dos o más de (a) a (g) definidos anteriormente, cada uno de los dos o más de (a) a (g) puede ser administrado al sujeto individual o conjuntamente.
- La composición descrita en el presente documento, o (a) a (g) definidos anteriormente, se pueden administrar a cualquier sujeto adecuado. El sujeto es generalmente un sujeto humano. El sujeto puede ser cualquiera de los animales o mamíferos mencionados anteriormente con referencia al método de diagnóstico.

El sujeto puede ser un lactante, un joven o un adulto. El sujeto puede tener tuberculosis confirmada o sospecha de tuberculosis. El sujeto puede ser propenso a, o estar en riesgo de contraer, la tuberculosis. Por ejemplo, el sujeto puede tener una predisposición genética a la tuberculosis, vivir en una región de alto riesgo o tener un sistema inmunitario debilitado. El sujeto puede estar infectado con VIH o tener SIDA.

- 5 Los medicamentos descritos en el presente documento se pueden usar junto con otros medios y sustancias para tratar prevenir la tuberculosis. En algunos casos, la composición descrita en el presente documento o los (a) a (g) definidos anteriormente se pueden administrar de manera simultánea, secuencial o por separado con otras sustancias que están destinadas a tratar la tuberculosis o a mejorar los síntomas de la tuberculosis, o a aliviar el dolor. La composición o los (a) a (g) definidos anteriormente se pueden usar junto con tratamientos existentes para la tuberculosis y pueden, por ejemplo, simplemente mezclarse con tales tratamientos. Por tanto, los medicamentos descritos en el presente documento se pueden usar para aumentar la eficacia de los tratamientos existentes para la enfermedad.
- 10

#### Ejemplos

- 15 Ejemplo 1

#### Análisis del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando la plataforma NeutraCorp.

- 20 Los genomas de *Mycobacterium tuberculosis* se analizaron utilizando la plataforma inmunoinformática desarrollada por Proxagen (marca registrada: BG Per.No.85788, de 27/08/2013). Se analizaron los genomas obtenidos de los aislados clínicos para la identificación de los antígenos proteicos inmunogénicos. Se obtuvo un total de 44 genomas completos para MTB de la base de datos GOLD.

25 TABLA 1: lista de los genomas de la cepa de MTB utilizados

Número de la base de datos GOLD	Nombre de la cepa de MTB
Gc00015	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (cepa de laboratorio)
Gc00063	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551
Gc00577	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra
Gc00578	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11 (ExPEC)
Gc01079	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 1435 (MDR)
Gc01851	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 4207 (DS)
Gc01885	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CCDC5079
Gc01886	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CCDC5180
Gc01929	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CTRI-2
Gc02147	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> UT205
Gi00385	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 210
Gi01205	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> C
Gi01206	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Haarlem
Gi01904	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 605 (XDR)
Gi02498	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> GM 1503
Gi02503	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 94_M4241A
Gi02507	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 02_1987
Gi02511	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T17
Gi02512	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T46
Gi02513	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T92
Gi02519	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> EAS054

(continuación)

Número de la base de datos GOLD	Nombre de la cepa de MTB
Gi02522	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> K85
Gi02888	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CPHL_A
Gi03342	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra
Gi03359	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 98-R604 INH-RIF-EM
Gi04656	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 4207
Gi04663	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN R506
Gi04664	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN V2475
Gi05081	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85
Gi05949	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu012
Gi05950	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu011
Gi05951	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu010
Gi05952	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu009
Gi05953	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu008
Gi05954	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu007
Gi05955	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu006
Gi05956	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu005
Gi05957	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu004
Gi05958	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu003
Gi05959	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu002
Gi05960	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> SUMu001
Gi12481	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> OSDD071
Gi12482	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> OSDD504
Gi12483	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> OSDD518

Análisis de los genomas de *Mycobacterium tuberculosis* y selección de proteínas

- 5 Usando la plataforma inmunoinformática de NeutraCorp (Marca registrada: BG Per. No.85788, de 27/08/2013), los presentes inventores analizaron completamente los genomas de MTB para la identificación de todos los posibles fragmentos proteicos con propiedades antigenicas, tanto epítopos de linfocitos T como epítopos de linfocitos B continuos.
- 10 En cada genoma, se seleccionaron proteínas con al menos 1 epítopo disponible (epítopo de linfocitos T y B) de afinidad informática superior al 1 % de la teórica. Estas proteínas se analizaron para detectar la presencia de epítopos de linfocitos T para los alelos o grupos alélicos de ALH-DR asociados a la susceptibilidad o a la protección frente al desarrollo de TB según la Tabla 2.

15

TABLA 2

	Asociación positiva con el desarrollo de TB activa	Asociación negativa con el desarrollo de TB activa
Alelos de ALH-DR (4 dígitos) o grupos (2 dígitos+XX)	DRB1 * 08XX, DRB1 * 14XX, DRB1*1501,DRB1*16XX	DRB1*03XX, DRB1*04XX, DRB1*0701, DRB1*10XX, DRB1*11XX, DRB1*13XX

Se seleccionaron proteínas que presentaban un número de epítopos significativamente mayor (>3 DT de la media de epítopos para cada proteína para todos los alelos) para los alelos o grupos alélicos asociados a los ALH con TB activa con respecto a los asociados a los ALH con protección frente a la TB.

*El análisis de ortología para todas las proteínas identificadas se realizó usando el software EGM2 (Nucl. Acids Res. 2011 doi: 10.1093/nar/gkr1261). Se seleccionaron proteínas seleccionadas presentes en más de 20 genomas de cepas clínicas comunes analizados.*

5

Esto dio lugar a una lista de siete proteínas según la Tabla 3.

TABLA 3

SEQ ID NO:	Nombre de la proteína	Secuencia
SEQ ID NO: 1	<b>TBFG_13463</b>	MTINNQFDDADTHGATSDFWCDAEWAGLRGPVAAGLGRA ALVGYLSVPQGWTEANQANLAAGTEAEPNQALGWLPMQDI DAAAEEAAQPSHALGWLPIEEIDAAASDDGEVSSSPQLPPRP FMMMPHTPSGG
SEQ ID NO: 2	<b>Mtub2_17866</b>	MIDDRHKSTRRTCNHGGITWRVAATSARSARSLATTHPEAG HYGLATWFTRMDAMTAPT
SEQ ID NO: 3	<b>Rv2654c</b>	MSGHALAARTLLAAADELVGGPPVEASAAALAGDAAGAW RTAAVELARALVRAVAESHGVAAVLFAATAAAAAAVDRG DPP
SEQ ID NO: 4	<b>Rv3845</b>	MDRVRRVVTDRDSGAGALARHPLAGRRTDPQLAAFYHRLM TTQRHCHTQATIAVARKLAERTRVTTGRPYQLRDTNGDP VTARGAKELIDAHYHVDTRTHPHNRAHTDTMQNSKPAR
SEQ ID NO: 5	<b>Rv1495</b>	MNAPLRGQVYRCDLGYGAKPWLIVSNNARNRHTADVVA RLTTTRRTIPTWVAMGPSDPLTGYVNADNIETLGKDELGDY LGEVTPATMNKINTALATALGLPWP
SEQ ID NO: 6	<b>Rv0840c</b>	MEGTIAVPGGRVWFQRIGGGPGRPLLVVHGGPLPHNYLAP LRRRLSDEREVIFWDQLGCGNSACPSDSDLWTMNRSAEMA TVAEALALTRFHIFSHWGMLAQYVLDKAPDAVSLTIAN STASIPEFSASLVSLSKCLDVATRSAIDRHEAAGTTHSAEYQA AIRTWNETYLCRTRPWPRELTEAFANMGTEIFETMFGPSDFR IVGNVRDWDVVDRLLADIAVPTLLVVGRFDECSPEHMREMQ GRIAGSRLEFFESSSHMPFIEEPARFDRVMREFRLHDI
SEQ ID NO: 7	<b>Rv1677</b>	VTHSRLIGALTVVAAIVTACGSQPKSQPAVAPTGDAAAATQV PAGQTVPAQLQFSAKTLGDGHDFHGESLLGKPAVLWFWAPW CPTCQGEAPVVGQVAASHPEVTFGVAGLDQVPAMQEfvN KYPVKTFTQLADTDGSVWANFGVTQQPAYAFVDPHGNVDV VRGRMSQDELTRRVTAALTSR

10 *Identificación final del epítopos de linfocitos T y diseño de péptidos.*

Se examinaron las 7 secuencias de proteínas identificadas para la identificación y el diseño de epítopos de linfocitos

T con la plataforma inmunoinformática NeutraCorp™ (Marca registrada: BG Per.No.85788, de 27/08/2013)

Específicamente, en las secuencias de proteínas, se identificaron los posibles epítopos de linfocitos T de alta afinidad (afinidad equivalente al 1 % de los péptidos mejor unidos a cualquier alelo de ALH de clase I y II) de las 7 proteínas.

- 5 Las áreas de la proteína que contenían fragmentos multiepitípicos y/o promiscuos de ALH se seleccionaron como posibles reactivos para el análisis de linfocitos T. Se diseñó un total de 33 péptidos como epítopos de linfocitos T para moléculas de ALH de clase II (Tabla 4).

TABLA 4

SEQ ID NO:	Proteína de referencia	Secuencia de epítopos de ALH de clase II
SEQ ID NO: 8	TBFG_13463	AALVGYLSVPQGWT
SEQ ID NO: 9	TBFG_13463	QALGWLPMQDIDAAA
SEQ ID NO: 10	TBFG_13463	RPFMMPHTPSGGaa
SEQ ID NO: 11	Mtub2_17866	GGITWRVAATSARSA
SEQ ID NO: 12	Mtub2_17866	GHYGLATWFTRMDAMTAPT
SEQ ID NO: 13	Rv0840c	VWFQRIGGGPGRPLLVHGGPGLPH
SEQ ID NO: 14	Rv0840c	HSWGGMLAQQQYVLDKAPDAVS
SEQ ID NO: 15	Rv0840c	VSLTIANSTASIP
SEQ ID NO: 16	Rv0840c	ASLVSLKSCLDVA
SEQ ID NO: 17	Rv0840c	SDFRIVGNVRDWD
SEQ ID NO: 18	Rv0840c	SRLEFFESSSHMP
SEQ ID NO: 19	Rv0840c	DRVMREFRLHDI
SEQ ID NO: 20	Rv3845	MDRVRRVVTDRDGAGA
SEQ ID NO: 21	Rv3845	PQLAAFYHRLMTTQRHC
SEQ ID NO: 22	Rv3845	ATIAVARKLAERT
SEQ ID NO: 23	Rv3845	RPYQLRDTNGDPV
SEQ ID NO: 24	Rv3845	AHYHVDTRTHPHN
SEQ ID NO: 25	Rv2654c	DELVGGPPVEASAA
SEQ ID NO: 26	Rv2654c	GAWRTAAVELARALVRAVAESHGV
SEQ ID NO: 27	Rv2654c	AAVLFAATAAAAAAA
SEQ ID NO: 28	Rv1677	SRLIGALTVVVIAITACGSQPK
SEQ ID NO: 29	Rv1677	APVVGQVAASHPEV
SEQ ID NO: 30	Rv1677	PEVTFVGVAGLDQVP
SEQ ID NO: 31	Rv1677	QEFVNKYPVKTFTQLADTD
SEQ ID NO: 32	Rv1677	SVWANFGVTQQPA
SEQ ID NO: 33	Rv1677	VDVVRGRMSQDELTRRVTLTSR
SEQ ID NO: 34	Rv1495	QVYRCDLGYGAKPWLVSNNAARNRHTA
SEQ ID NO: 35	Rv1495	QVYRCDLGYGAKPWLV
SEQ ID NO: 36	Rv1495	KPWLIVSNNAARNRHTA
SEQ ID NO: 37	Rv1495	ADWAVRLTTTRRTIP

(continuación)

SEQ ID NO:	Proteína de referencia	Secuencia de epítopos de ALH de clase II
SEQ ID NO: 38	Rv1495	PTWVAMG PSDPLT
SEQ ID NO: 39	Rv1495	TGYVNADNIETLGK
SEQ ID NO: 40	Rv1495	ATMNKINTALATALGL

Se diseñó un total de 47 péptidos como epítopos de linfocitos T para moléculas de ALH de clase I (Tabla 5).

5

TABLA 5

SEQ ID NO:	Proteína de referencia	Secuencia de epítopos de ALH de clase I
SEQ ID NO: 41	TBFG_13463	ADTHGATSDFW
SEQ ID NO: 42	TBFG_13463	GPVAAGLGRAAL
SEQ ID NO: 43	TBFG_13463	VGYLSVPQGW
SEQ ID NO: 44	TBFG_13463	TEAEPNQALGWLPM
SEQ ID NO: 45	TBFG_13463	AEAAAQPSHALGWL
SEQ ID NO: 46	TBFG_13463	LPIEEIDAAASD
SEQ ID NO: 47	TBFG_13463	GEVSSSPQLPPRPFMM
SEQ ID NO: 48	TBFG_13463	RPFMMPHTPSGG
SEQ ID NO: 49	Mtub2_17866	STRRTCNHGGITWR
SEQ ID NO: 50	Mtub2_17866	ITWRVAATSARSAR
SEQ ID NO: 51	Mtub2_17866	ATTHPEAGHYGL
SEQ ID NO: 52	Mtub2_17866	EAGHYGLATWFTR
SEQ ID NO: 53	Rv2654c	HALAARTLAAA
SEQ ID NO: 54	Rv2654c	TLLAAADELV
SEQ ID NO: 55	Rv2654c	AALAGDAAGA W
SEQ ID NO: 56	Rv2654c	RTAAVELARALVRAV
SEQ ID NO: 57	Rv2654c	AESHGVAAVLFAA
SEQ ID NO: 58	Rv2654c	VLFAATAAAA VDR
SEQ ID NO: 59	Rv3845	RRTDPQLAAFYHR
SEQ ID NO: 60	Rv3845	HTQATIAVARKLAER
SEQ ID NO: 61	Rv3845	RTRVTITTGRPYQLR
SEQ ID NO: 62	Rv3845	KELIDAHYHV DTR
SEQ ID NO: 63	Rv3845	DTRTHPHNRAHT
SEQ ID NO: 64	Rv3845	RAHTDTMQNSKPAR
SEQ ID NO: 65	Rv1495	VYRCDLGYGAKPWLI
SEQ ID NO: 66	Rv1495	HTADWA VRLTTTR
SEQ ID NO: 67	Rv1495	LTTTRRTIPTWVA
SEQ ID NO: 68	Rv1495	YLGEVTPATMNKI
SEQ ID NO: 69	Rv1495	ALATALGLPW

(continuación)

SEQ ID NO:	Proteína de referencia	Secuencia de epítopos de ALH de clase I
SEQ ID NO: 70	Rv0840c	GTIAVPGGRVWFQR
SEQ ID NO: 71	Rv0840c	LPHNYLAPLRR
SEQ ID NO: 72	Rv0840c	NSACPSDSDLWTMNR
SEQ ID NO: 73	Rv0840c	AEMATVAEALALTR
SEQ ID NO: 74	Rv0840c	AEALALTRFHIFS
SEQ ID NO: 75	Rv0840c	LTRFHIFSHSW
SEQ ID NO: 76	Rv0840c	GMLAQQQYVLDK
SEQ ID NO: 77	Rv0840c	LTIANSTASIPEFSA
SEQ ID NO: 78	Rv0840c	IPEFSASLVSLK
SEQ ID NO: 79	Rv0840c	HSAEYQAAIRTW
SEQ ID NO: 80	Rv0840c	RTWNETYLCRTRPW
SEQ ID NO: 81	Rv0840c	ETYLCRTRPWPR
SEQ ID NO: 82	Rv0840c	RPWPRELTEAFANM
SEQ ID NO: 83	Rv0840c	TEAFANMGTEIF
SEQ ID NO: 84	Rv0840c	FETMFGPSDFRI
SEQ ID NO: 85	Rv0840c	LEFFESSSHMPF
SEQ ID NO: 86	Rv0840c	MPFIEEPPRF
SEQ ID NO: 87	Rv0840c	DRVMMREFRLRLHDI

Identificación final del epítopos de linfocitos B y diseño de péptidos.

- 5 Se examinaron las 7 proteínas identificadas para determinar la presencia de epítopos de linfocitos B lineales con la plataforma inmunoinformática desarrollada NeutraCorp™ (Marca registrada: BG Per.No.85788, de 27/08/2013)
- 10 Para los epítopos de linfocitos B continuos, se identificó la región de la proteína que podía reaccionar con los anticuerpos, de 7 aminoácidos de longitud, en la secuencia de proteína lineal. Las áreas de las secuencias de proteínas con puntos calientes que contenían más de un fragmento identificado se consideraron solo una. Se diseñaron los posibles fragmentos de cada proteína.
- 15 Para la predicción de epítopos de linfocitos B discontinuos y el diseño de péptidos mimótopos, los presentes inventores determinaron primero mediante un modelo de homología la estructura 3D de las 6 proteínas, usando la función Swiss-Prot. Se evaluaron los modelos 3D con el módulo Neutrancorp de la plataforma inmunoinformática desarrollada y se identificaron partes de posible antigenicidad a lo largo de la estructura 3D. Tras la identificación de los diferentes fragmentos que componían los epítopos de linfocitos B discontinuos, la siguiente etapa fue el diseño de los péptidos que imitaban la estructura del epítopo de linfocitos B completo, también denominados mimótopos. Para este fin, para cada epítopo de linfocitos B discontinuo, la inspección manual del modelo de estructura proteica 3D, permitió la identificación espacial de los diferentes fragmentos lineales incluidos en el epítopo. Se determinaron las distancias y la orientación de los fragmentos individuales y se incluyeron espaciadores apropiados de glicina y prolina para permitir la distancia y los ángulos apropiados entre las diferentes partes lineales.
- 20 Se diseñó un total de 48 epítopos y mimótopos peptídicos como antígenos de linfocitos B en las secuencias y estructuras de proteínas (Tabla 6).
- 25

TABLA 6

SEQ ID NO:	Proteína de referencia	Secuencia de epítopos de ALH de clase II
SEQ ID NO: 88	<b>TBFG_13463</b>	ANLAAGTEAEPN

(continuación)

SEQ ID NO:	Proteína de referencia	Secuencia de epítopos de ALH de clase II
SEQ ID NO: 89	<b>TBFG_13463</b>	AAASDDGEVSSSPQLPPRPF
SEQ ID NO: 90	<b>TBFG_13463</b>	AAGTEAEPNQALG
SEQ ID NO: 91	<b>TBFG_13463</b>	DIDAAAEEAAQPSHA
SEQ ID NO: 92	<b>TBFG_13463</b>	EIDAAAASDDGEV
SEQ ID NO: 93	<b>TBFG_13463</b>	FMMMPHTPSGG
SEQ ID NO: 94	<b>TBFG_13463</b>	GEVSSSPQLPPRPFMM
SEQ ID NO: 95	<b>TBFG_13463</b>	GTEAEPNQALG
SEQ ID NO: 96	<b>TBFG_13463</b>	GWTEANQANLA
SEQ ID NO: 97	<b>TBFG_13463</b>	MTINNQFDDADTHGA
SEQ ID NO: 98	<b>TBFG_13463</b>	SVPQGWTEANQ
SEQ ID NO: 99	<b>TBFG_13463</b>	TINNQFDDADTHG
SEQ ID NO: 100	<b>TBFG_13463</b>	WLPMQDIDAAA
SEQ ID NO: 101	<b>Mtub2_17866</b>	KSTRRTCNHGG
SEQ ID NO: 102	<b>Mtub2_17866</b>	VAATSARSARSLA
SEQ ID NO: 103	<b>Mtub2_17866</b>	MIDDRHKSTRRT
SEQ ID NO: 104	<b>Rv2654c</b>	AALAGDAAGA WRT
SEQ ID NO: 105	<b>Rv3845</b>	AGRRTDPQLA
SEQ ID NO: 106	<b>Rv3845</b>	DTRTHPHNRAHTDTMQNSKPAR
SEQ ID NO: 107	<b>Rv3845</b>	GDPVTARGAKE
SEQ ID NO: 108	<b>Rv3845</b>	PLAGRRTDPQLAA
SEQ ID NO: 109	<b>Rv3845</b>	RDTNGDPVTARG
SEQ ID NO: 110	<b>Rv3845</b>	RVVTDRDSGAGAL
SEQ ID NO: 111	<b>Rv3845</b>	TTGRPYQLRDTNGDPVT
SEQ ID NO: 112	Rv3845	VARKLAERTRVTI
SEQ ID NO: 113	<b>Rv1495</b>	AMGPSDPLTGYVNADN
SEQ ID NO: 114	<b>Rv1495</b>	CDLGYGAKPWLV
SEQ ID NO: 115	<b>Rv1495</b>	MNAPLRGQVYR
SEQ ID NO: 116	<b>Rv1495</b>	SNNARNRHTAD
SEQ ID NO: 117	<b>Rv1495</b>	LRGQVYGGEVTPATMNKINGGSNN
SEQ ID NO: 118	<b>Rv1495</b>	LGYRCDLGYGAKGRLTT
SEQ ID NO: 119	<b>Rv1495</b>	TTTRRTIPTWVAMPSDPLT
SEQ ID NO: 120	<b>Rv1495</b>	YRCDDGGDGTLGKDELGD
SEQ ID NO: 121	<b>Rv0840c</b>	MEGTIAVPGGRVWFQRGGGNSA
SEQ ID NO: 122	<b>Rv0840c</b>	MQRIGGPGRGGRRLSDE
SEQ ID NO: 123	<b>Rv0840c</b>	VSLKSCLDVATRSAIDRPEYQAAIRT
SEQ ID NO: 124	<b>Rv0840c</b>	ETYLCRTRPWPRELTE

(continuación)

SEQ ID NO:	Proteína de referencia	Secuencia de epítopos de ALH de clase II
SEQ ID NO: 125	<b>Rv0840c</b>	MEGTIAVPGGRVWFQRGGGNSA
SEQ ID NO: 126	<b>Rv0840c</b>	MQRIGGPGRGGRRLSDE
SEQ ID NO: 127	<b>Rv0840c</b>	VSLKSCLDVATRSAIDRPEYQAAIRT
SEQ ID NO: 128	<b>Rv0840c</b>	ETYLCRTRPWPRELTE
SEQ ID NO: 129	<b>Rv0840c</b>	DVATRSAIDRHE
SEQ ID NO: 130	<b>Rv0840c</b>	GNVRDWDVVDR
SEQ ID NO: 131	<b>Rv0840c</b>	GRVWFQRIGGGPGRPL
SEQ ID NO: 132	<b>Rv0840c</b>	HMREMQGRIAGS
SEQ ID NO: 133	<b>Rv0840c</b>	MREMQGRIAGSR
SEQ ID NO: 134	<b>Rv0840c</b>	QLGCGNSACPSD
SEQ ID NO: 135	<b>Rv0840c</b>	QQYVLDKAPDAVS
SEQ ID NO: 136	<b>Rv0840c</b>	REMQGRIAGSR

### Síntesis de péptidos

La síntesis química de los péptidos terminales libres identificados se ha realizado mediante química Fmoc convencional (Espikem, Prato, Italia). Los péptidos se produjeron con una pureza >90 %.

### Exploración del banco de péptidos sintetizados con biobanco de suero, para la validación de la antigenicidad de las proteínas de MTB seleccionadas

Proxagen disponía de un banco de sueros de pacientes con tuberculosis y controles a través de los resultados de la subvención del proyecto para la competitividad con fondos regionales de la UE "Desarrollo de un prototipo de prueba rápida para el diagnóstico de la tuberculosis activa" (número de proyecto BG161P0003-1.1.01-0220, de 28/12/2011).

Se han analizado muestras de suero de los siguientes grupos para confirmar la inmunogenicidad de las proteínas y los fragmentos identificados:

- Controles sanos (N = 60)
- TB activa (N = 50)
- TB curada (N = 10)

*Análisis de los péptidos ID n.º 88-ID n.º 136 mediante el procedimiento operativo convencional para el ensayo ELISA de múltiples péptidos.*

#### Procedimiento:

25

##### a. Reactivos

- PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, solución salina tamponada con fosfato) estéril 1x
- Tampón de recubrimiento - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> pH 9,3
- Tampón de lavado - PBS 1x
- Tampón de bloqueo - PBS + 1 % de ASB (Albúmina Sérica Bovina)
- Tampón de ensayo - PBS + 1 % de ASB
- IgG anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) (Zymed)
- Sustrato - (0,04 mg/ml o-fenilendiamina (Sigma)
- Solución de detención - 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Tampón de formulación - comprimido de UREA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma)

##### b. Recubrimiento de placas de ELISA:

40

- Se diluyen los péptidos hasta 1 µg/ml en tampón de recubrimiento.
- Se transfieren 50 µl de péptidos diluidos por pocillo a la placa de ELISA.
- Se sella la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora y a 4 °C durante la noche.

c. Placa de bloqueo:

- 5 - Se añaden 200  $\mu$ l de solución de bloqueo (PBS + 1 % de ASB) por pocillo  
 - Se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora  
 - Se desecha el contenido de la placa de ELISA

d. Etapa 1 del ELISA: adición de la muestra

- 10 - Se diluyen los sueros del conjunto en tampón de ensayo (PBS + 1 % de ASB) 1:100  
 - Se transfieren 50  $\mu$ l de sueros diluidos en cada placa de ELISA bajo prueba como en el esquema  
 - Se incuban durante 2 horas a 37 °C  
 - Se lavan 3 veces con PBS (200  $\mu$ l/pocillo)

e. Etapa 2 del ELISA: dilución del conjugado de anticuerpo y adición a la placa de ELISA

- 15 - Se diluye IgG anti-humana conjugada con HRP 1:4000 en tampón de ensayo (PBS + 1 % de ASB)  
 - Se transfieren 50  $\mu$ l por pocillo a la placa de ELISA usando una pipeta multicanal como en el esquema  
 - Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente  
 - Se lava 5 veces con tampón de lavado (200  $\mu$ l/pocillo)

f. Etapa 3 del ELISA: adición de sustrato y lectura de la placa

- 20 - Se prepara el tampón de formulación mediante la adición de 1 comprimido de UREA en 20 ml de H<sub>2</sub>O  
 - Se prepara el tampón de sustrato mediante la adición de 1 comprimido de OPD en 20 ml de tampón de formulación  
 - Se añaden 50  $\mu$ l por pocillo de tampón de sustrato y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente a oscuras.  
 - Se detiene la reacción con 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 N.  
 - Se lee la absorbancia usando un lector de placas de ELISA a 492 nm.

**Resultados:**

35 La Figura 1 muestra los resultados obtenidos con los diferentes sueros del grupo. Hay niveles de anticuerpos significativamente más altos en sujetos con TB activa en comparación con otros grupos cuando se usa el grupo de epítopos de las 6 proteínas como antígenos. Esto demuestra la antigenicidad de estos reactivos y su uso en pruebas de diagnóstico.

**Ejemplo 2****Detección de la antigenicidad prolongada**

40 Para confirmar la antigenicidad de los péptidos de epítopos de linfocitos B identificados mediante análisis inmunobiológico informático, se examinaron mediante ELISA sueros de sujetos con infección por complejo de *M. tuberculosis* activa confirmada microbiológicamente, sujetos con infección por complejo de *M. tuberculosis* latente (ITL) confirmada mediante el ensayo IGRA y sujetos de control sanos para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos frente a los péptidos de SEQ ID NO: 88 a SEQ ID NO: 141.

**Procedimiento de ELISA**a. Reactivos

- 50 - PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, solución salina tamponada con fosfato) estéril 1x  
 - Tampón de recubrimiento - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> pH 9,3  
 - Tampón de lavado - PBS 1x  
 - Tampón de bloqueo - PBS + 1 % de ASB (Albúmina Sérica Bovina)  
 - Tampón de ensayo - PBS + 1 % de ASB  
 - IgG anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) (Zymed)  
 - Sustrato - (0,04 mg/ml o-fenilendiamina (Sigma)  
 - Solución de detención - IN H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 - Tampón de formulación - comprimido de UREA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma)

b. Recubrimiento de placas de ELISA:

- 65 - Se diluyen los péptidos hasta 1  $\mu$ g/ml en tampón de recubrimiento.  
 - Se transfieren 50  $\mu$ l de péptidos diluidos por pocillo a la placa de ELISA.

- Se sella la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora y a 4 °C durante la noche.

c. Placa de bloqueo:

- 5
- Se añaden 200 µl de solución de bloqueo (PBS + 1 % de ASB) por pocillo
  - Se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora
  - Se desecha el contenido de la placa de ELISA

d. Etapa 1 del ELISA: adición de la muestra

- 10
- Se diluyen los sueros del conjunto en tampón de ensayo (PBS + 1 % de ASB) 1:100
  - Se transfieren 50 µl de sueros diluidos en cada placa de ELISA bajo prueba como en el esquema
  - Se incuban durante 2 horas a 37 °C
  - Se lavan 3 veces con PBS (200 µl/pocillo)

e. Etapa 2 del ELISA: dilución del conjugado de anticuerpo y adición a la placa de ELISA

- Se diluye IgG anti-humana conjugada con HRP 1:4000 en tampón de ensayo (PBS + 1 % de ASB)
- Se transfieren 50 µl por pocillo a la placa de ELISA usando una pipeta multicanal como en el esquema
- Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente
- Se lava 5 veces con tampón de lavado (200 µl/pocillo)

f. Etapa 3 del ELISA: adición de sustrato y lectura de la placa

- 25
- Se prepara el tampón de formulación mediante la adición de 1 comprimido de UREA en 20 ml de H<sub>2</sub>Od
  - Se prepara el tampón de sustrato mediante la adición de 1 comprimido de OPD en 20 ml de tampón de formulación
  - Se añaden 50 µl por pocillo de tampón de sustrato y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente a oscuras.
- 30
- Se detiene la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 1 N.
  - Se lee la absorbancia usando un lector de placas de ELISA a 492 nm.

*Resultados*

- 35
- La Tabla 21 muestra la densidad óptica (datos de DO) para cada combinación de péptido/sueros analizada mediante ELISA para establecer los datos de antigenicidad y de sensibilidad preliminar para los péptidos de epítopos de linfocitos B de SEQ ID NO: 88 a SEQ ID NO: 141. Los datos de DO son el valor absoluto de la reactividad de cada suero por duplicado para el pocillo que contiene péptido (es decir, de prueba) menos la reactividad basal del mismo suero para los pocillos sin péptido (es decir, control negativo).

- 40
- Al establecer el percentil 99 o el promedio +3 DT de los controles, se puede definir un valor de corte que dé una puntuación positiva para la reactividad hacia cada péptido en los sueros analizados de sujetos con infección por el complejo *M. tuberculosis* activa confirmada microbiológicamente (sueros con TB activa). Esto permite determinar la reactividad de los sueros con TB activa para cada péptido o para cada serie de péptidos derivados de una sola proteína. Con más detalle:

- 50
- el valor *p* de la prueba de Mann-Whitney para la TB frente a los controles da la significación de los resultados en términos generales para cada péptido;
  - el valor de corte del percentil 99 de la distribución de los datos de control proporciona un umbral de valor de corte simple por encima del cual un suero con TB activa se considera positivo;
  - el promedio +3 DT del valor de corte de la distribución de datos de control proporciona un valor de corte más conservador con una tasa de error teórica <1 %;
  - los *N* positivos entre la TB analizada usando el valor de corte del percentil 99 muestran el número de resultados positivos entre los sueros con TB activa para cada péptido, de acuerdo con el valor de corte del percentil 99;
- 55
- el % de positivos entre TB en el valor de corte del percentil 99 muestra el porcentaje de sueros con TB activa que tienen un resultado positivo de acuerdo con el valor de corte del percentil 99;
  - los *N* positivos entre la TB analizada usando el promedio +3 DT muestran el número de resultados positivos entre los sueros con TB activa para cada péptido, de acuerdo con el promedio +3 DT del valor de corte;
- 60
- el % de positivos entre TB en el promedio +3 DT del valor de corte muestra el porcentaje de sueros con TB activa que tienen un resultado positivo de acuerdo con el promedio +3 DT;
  - *N* positivos > promedio de TB muestra el número de sueros con TB activa que tienen una DO superior al promedio (media) de la DO de todos los sueros con TB activa para ese péptido (en esencia, los sueros que más reaccionan para el péptido); y
  - el % de positivos > promedio de TB muestra el porcentaje de sueros con TB activa que tienen una DO superior al promedio (media) de la DO de todos los sueros con TB activa para ese péptido (en esencia, los sueros que más reaccionan para el péptido).

Para cada proteína, se ha calculado el rendimiento hipotético de una serie que comprende todos los péptidos derivados de la proteína. Como esto se ha calculado usando el promedio +3 DT del valor de corte y el promedio de la DO para los sueros con TB activa (es decir, resultados siempre positivos), no se muestra el rendimiento hipotético para los sueros de control.

5

Los valores de DO de la Tabla 21 muestran que hay niveles significativamente más altos de anticuerpos frente a SEQ ID NO: 88 a SEQ ID NO: 141 en los sujetos que tienen una infección activa por el complejo *M. tuberculosis* en comparación con los sujetos de control (es decir, personas sanas o sujetos que tienen ITL). Estos resultados confirman 10 la antigenicidad de los péptidos de SEQ ID NO: 88 a SEQ ID NO: 141.

Por otra parte, los resultados demuestran que los péptidos de SEQ ID NO: 88 a SEQ ID NO: 141 se pueden utilizar individualmente o en series de proteínas para identificar sueros de sujetos que tienen una infección activa por el complejo *M. tuberculosis*, es decir, para diagnosticar una infección activa por el complejo *M. tuberculosis*.

15

### Ejemplo 3

#### **ELISA de múltiples péptidos**

20 Las pruebas de diagnóstico basadas en la reactividad hacia múltiples péptidos suelen ser más sensibles que las pruebas basadas en la reactividad hacia un solo péptido, ya que puede haber variación individual en la reacción debido a, p. ej., el acervo genético. Por lo tanto, se examinó un conjunto de péptidos que comprendía los péptidos cribados en el Ejemplo 2 para determinar la reactividad con un gran conjunto de sueros de control (con resultados negativos para el IGRA y/o positivos para el IGRA), sueros de pacientes que tenían infección activa por el complejo *M. tuberculosis* (TB activa) y sueros de pacientes que habían permanecido curados de la infección por el complejo *M. tuberculosis* durante más de 24 meses (TB curada). El número de muestras de cada conjunto fue el siguiente:

- 25
- Controles sanos (resultados negativos en el IGRA) (N = 74)
  - Controles sanos infectados con MTB (ITL, resultados positivos en el IGRA y ningún otro signo de TB activa) (N = 30 30)
  - TB activa (N = 66)
  - TB curada (N = 10).

35 Fue necesario seleccionar los péptidos de mejor rendimiento cribados en el Ejemplo 2 para su inclusión en el conjunto de péptidos. En particular, el número de péptidos que pueden incluirse en un solo pocillo de un ELISA de múltiples péptidos se limita a aproximadamente 15-20, ya que la inclusión de demasiados péptidos puede introducir competencia por los sitios de unión durante la etapa de absorción. Por consiguiente, se seleccionaron los péptidos más reactivos del Ejemplo 2 y los péptidos que proporcionaban reactividad complementaria hacia los sueros con TB activa para optimizar la sensibilidad. Específicamente, el conjunto consistió en SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 98, 40 SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 129 y SEQ ID NO: 134.

45 El procedimiento de ELISA se realizó de acuerdo con el Ejemplo 2, excepto que las placas se recubrieron con el conjunto de péptidos, en lugar de un péptido individual.

45

#### *Resultados*

50 La Tabla 7 muestra la densidad óptica (datos de DO) para cada suero analizado con el conjunto de péptidos. Los datos de DO son el valor absoluto de la reactividad de cada suero individual por duplicado para el pocillo que contenía múltiples péptidos (es decir, de prueba) menos el valor simulado del suero.

55 La Tabla 8 muestra las estadísticas descriptivas para los datos contenidos en la Tabla 7 descriptivos de diferentes valores de corte y las comparaciones de Mann-Whitney de los resultados. Como el conjunto de datos es suficientemente grande, los porcentajes mostrados pueden interpretarse como datos preliminares de sensibilidad y especificidad.

TABLA 7

DO a 492 nm - Valor absoluto (valor de prueba de péptidos del conjunto de sueros-valor simulado del suero)			
Controles - resultados negativos en el IGRA	Controles - resultados positivos en el IGRA	TB activa	TB curada (>24 meses)
0,012		0,897	0,033

(continuación)

DO a 492 nm - Valor absoluto (valor de prueba de péptidos del conjunto de sueros-valor simulado del suero)			
Controles - resultados negativos en el IGRA	Controles - resultados positivos en el IGRA	TB activa	TB curada (>24 meses)
0,028		0,200	0,184
0,085		1,748	0,074
0,080		1,572	0,092
0,057		0,743	0,066
0,073		0,989	0,125
0,033		0,712	0,528
0,006		0,787	0,061
0,068		0,343	0,027
0,038		0,101	0,505
0,048		0,086	
0,081		0,169	
0,093		0,113	
0,094		0,303	
0,051		0,682	
0,134		0,699	
0,030		0,712	
0,077		0,405	
0,039		0,069	
0,066		0,703	
0,084		0,739	
0,059		1,297	
0,080		0,873	
0,075		0,732	
0,026		0,048	
0,070		0,490	
0,041		0,244	
0,063		0,357	
0,049		0,362	
0,064		0,093	
0,025		0,540	
0,000		0,605	
0,060		0,489	
0,030		0,740	
0,040		0,076	
0,073		0,182	

(continuación)

DO a 492 nm - Valor absoluto (valor de prueba de péptidos del conjunto de sueros-valor simulado del suero)			
Controles - resultados negativos en el IGRA	Controles - resultados positivos en el IGRA	TB activa	TB curada (>24 meses)
0,084		0,662	
0,085		0,536	
0,043		0,501	
0,124		0,238	
0,022		0,158	
0,069		1,845	
0,031		0,895	
0,057		0,292	
0,075		0,625	
0,051		0,527	
0,071		1,662	
0,067		0,913	
0,018		0,042	
0,061		0,699	
0,033			
0,055			
0,105			
0,106			
0,059			
0,148			
0,036			
0,087			
0,046			
0,075			
0,088	0,105	0,267	
0,035	0,067	0,098	
0,048	0,124	0,587	
0,079	0,148	0,696	
0,074	0,047	0,198	
0,104	0,068	0,066	
0,065	0,131	0,138	
0,094	0,057	0,235	
0,067	0,038	0,959	
0,037	0,069	0,635	
0,087	0,151	0,102	

(continuación)

DO a 492 nm - Valor absoluto (valor de prueba de péptidos del conjunto de sueros-valor simulado del suero)			
Controles - resultados negativos en el IGRA	Controles - resultados positivos en el IGRA	TB activa	TB curada (>24 meses)
0,091	0,089	0,207	
0,108	0,105	0,087	
0,044	0,124	0,178	
	0,054	0,501	
	0,039	0,055	
	0,005		
	0,078		
	0,167		
	0,157		
	0,068		
	0,076		
	0,089		
	0,098		
	0,086		
	0,124		
	0,109		
	0,086		
	0,068		
	0,084		

TABLA 8

	Controles - resultados negativos en el IGRA	Controles - resultados positivos en el IGRA	TB activa	TB curada (>24 meses)
N	74	30	66	10
Promedio	0,063	0,090	0,523	0,170
Mediana	0,065	0,086	0,496	0,083
DT	0,029142772	0,038559836	0,425356087	0,188509505
Percentil 95	0,1067	0,1543	1,50325	0,51765
Percentil 99	0,13778	0,1641	1,78195	0,52593
Promedio + 3 DT	0,150414804	0,206046173		
N positivos > percentil 95 IGRAneg	4	9	54	4
N positivos > percentil 99 IGRAneg	1	4	53	3

(continuación)

	Controles - resultados negativos en el IGRA	Controles - resultados positivos en el IGRA	TB activa	TB curada (>24 meses)
N positivos >Promedio+3 DT IGRA neg	0	3	52	3
N positivos >percentil 95 IGRA pos	0	2	52	3
N positivos >percentil 99 IGRA pos	0	1	51	3
N positivos >Promedio+3 DT IGRA pos	0	0	46	2
% de positivos >percentil 95 IGRA neg	5,41 %	30,00 %	81,82 %	40,00 %
% de positivos >percentil 99 IGRA neg	1,35 %	13,33 %	80,30 %	30,00 %
% de positivos >Promedio+3 DT IGRA neg	0,00 %	10,00 %	78,79 %	30,00 %
% de positivos >percentil 95 IGRA pos	0,00 %	6,67 %	78,79 %	30,00 %
% de positivos >percentil 99 IGRA pos	0,00 %	3,33 %	77,27 %	30,00 %
% de positivos >Promedio+3 DT IGRA pos	0,00 %	0,00 %	69,70 %	20,00 %

#### Ejemplo 4

## 5 Identificación de antígenos de linfocitos T candidatos

### 1. Introducción

Este estudio fue un estudio de viabilidad inicial diseñado para identificar nuevos posibles antígenos para el ensayo T-SPOT.TB y calcular si podrían reemplazar a los antígenos ESAT-6 y CFP10 o poderse añadir al ensayo y aumentar la sensibilidad del ensayo T-SPOT®.TB actual. Para lograr esto, se cribó un conjunto de nuevos antígenos de TB en el ensayo T-SPOT®.TB con 87 donantes con TB confirmada y 96 donantes sanos.

### 2. Métodos

Se analizaron células mononucleares de sangre periférica (CMNP) aisladas de donantes con TB confirmada (confirmada por el ensayo GeneXpert® MTB/RIF) y donantes sanos en el ensayo T-SPOT.TB con la Serie A (SA) del T-SPOT.TB, la Serie B (SB) del T-SPOT.TB y 24 antígenos de TB alternativos. El ensayo GeneXpert® MTB/RIF es una prueba de amplificación de ácido nucleico para la tuberculosis, fabricada por Cepheid. Está respaldado por la Organización Mundial de la Salud para usar en países donde la tuberculosis es endémica, y tiene una sensibilidad declarada del 92,2 % en donantes con TB confirmada por cultivo (675/732) y una especificidad del 99,2 % en donantes sin TB (604/609), Boehme, C. (2011).

Los antígenos analizados se enumeran en la Tabla 9.

TABLA 9

Antígeno	N.º de péptidos
Serie A de T-SPOT.TB	-
Serie B de T-SPOT.TB	-
Conjunto Massi CD4+8	91
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 TBFG_13463	15
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Mtub2_17866	7
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv2654c	11
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv3845	15
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv1495	12
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv0840c	25
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv1677	6
Quimioteca de péptidos Rv2654c	18
Quimioteca de péptidos TBFG_13463	30
Quimioteca de péptidos Rv0840c	69
Quimioteca de péptidos Rv3845	27
Quimioteca de péptidos Rv 1677	43
Quimioteca de péptidos Rv1495	24
Quimioteca de péptidos Mtub2_17866	12

Los epítopos de CD4/CD8 de cada conjunto de epítopos se enumeran en las Tablas 10 a 16.

5

TABLA 10: conjunto de epítopos de CD4/CD8 TBFG\_13643

AALVGYLSVPQGWT
QALGWLPMQDIDAAA
RPFMMMPHTPSGGAA
DTHGATSDFW
HGATSDFW
GPVAAGLGRAAL
VGYLSVPQGW
TEAEPNQALGWLP
EPNQALGWLP
AEAAAQPshalgwl
LPIEEIDAAASD
GEVSSSPQLPPRPF
SSSPQLPPRPFMM
RPFMMMPHTPSG
FMMMPHTPSGG

**TABLA 11: conjunto de epítopos de CD4/CD8 Mtub2\_17866**

GGITWRVAATSARSA
GHYGLATWFTRMDAMTAPT
STRRTCNGGITWR
ITWRVAATSARSAR
ATTHPEAGHYGL
EAGHYGLATWF
HYGLATWFTR

**TABLA 12: conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv2654c**

DELVGGPPVEASAA
GAWRTAAVELARALVRAVAESHG
ELARALVRAV
AAVLFAATAAAAAAA
HALAARTLAAA
TLLAAADELV
AALAGDAAGAW
RTAAVELARALV
AESHGVAAVLFAA
VLFAATAAAAAAV
ATAAAAAVDR

**TABLA 13: conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv3845**

MDRVRRVVTDRDSGAGA
PQLAAFYHRLMTTQRHC
ATIAVARKLAERT
RPYQLRDTNGDPV
AHYHVDTRTHPHN
RRTDPQLAAFYHR
QLAAFYHRL
HTQATIAVARK
ATIAVARKLAER
RTRVTITTGRPY
TITTGRPYQLR
KELIDAHYHVDTR
DTRTHPHNRAHT
RAHTDTMQNSK
TMQNSKPAR

**TABLA 14: conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv1495**

QVYRCDLGYGAKPWLIVSNNARNRHTA
QVYRCDLGYGAKPWLIV
DLGYGAKPWLI
KPWLIVSNNARNRHTA
ADWAVRLTTTRRTIP
PTWVAMGPSDPLT
TGYVNADNIETLGK
ATMNKINTALATALGL
VYRCDLGYGAKPW
LTTRRRTIPTWVA
YLGEVTPATMNKI
ALATALGLPW

**TABLA 15: conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv0840c**

VWFQRIGGGPGRPLLVVHGGPGLPH
HSWGGMLAQQYVLDKAPDAVS
VSLTIANSTASIP
ASLVSLKSCLDVA
SDFRIVGNVRDWD
SRLEFFESSSHMP
DRVMRFLRLHDI
GTIAVPGGRVWFQR
GGRVWFQR
NSACPSDVWLWTM
DVWLWTMNR
AEMATVAEALAL
TVAEALALTR
LTRHFIFHSW
GMLAQQYVLDK
LTIANSTASIPEF
STASIPEFSA
HSAEYQAAIRTW
RTWNETYLCRTRPW
ETYLCRTRPWPR
RPWPRELTEAFAN
TEAFANMGTEIF
LEFFESSSHMPF
MPFIEEPARF
DRVMRFLRLHDI

**TABLA 16: conjunto de epítopes de CD4/CD8 Rv1677**

SRLIGALTVAIIVTACGSQPK
APVVGQVAASHPEV
PEVTFVGVAGLDQVP
QEFVNKYPVKTFTQLADTD
SVWANFGVTQQPA
VDVVRGRMSQDELTRRVALTTSR

5 El conjunto Massi CD4+8 contiene todos los epítopes de CD4/CD8 usados en los conjuntos de epítopes de CD4/CD8 para TBFG\_13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677. Los conjuntos de la quimioteca peptídica para TBFG\_13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c and Rv1677 contienen pentadecámeros que tienen un solapamiento de 11 aminoácidos y cubren la secuencia completa de aminoácidos de las proteínas utilizadas en la selección de epítopes.

10 **3. Resultados**

**3.1 Donantes**

**3.1.1 Donantes con TB**

15 Se analizaron 120 donantes en el ensayo T-SPOT en la Universidad de Ciudad del Cabo. El estado de la infección por TB se confirmó mediante el ensayo GeneXpert MTB RIF. 93 de los 120 donantes tuvieron resultados positivos en el GeneXpert (8/120 dieron resultados negativos en el GeneXperty 19/120 no fueron analizados en el GeneXpert). De los 93 donantes con resultados positivos en el GeneXpert, 4/93 donantes tuvieron recuentos de células bajos (<2,0 × 20 10<sup>6</sup> células/ml) y 2/93 donantes tuvieron controles negativos altos (>10 manchas). Por lo tanto, estos donantes fueron excluidos. Los 87 donantes con TB restantes se utilizaron para el presente ejemplo.

**3.1.2 Donantes sanos**

25 Se analizaron 107 donantes sanos en el ensayo T-SPOT en Oxford Immunotec RU. Se excluyeron 11 donantes de este grupo debido a un mayor riesgo de infección por TB (8 donantes se excluyeron debido a su origen de nacimiento en una región con TB endémica o al tiempo pasado como extranjero en regiones de TB endémica, 1 donante se excluyó debido a un contacto estrecho con una persona infectada por TB y 2 donantes se excluyeron debido a un historial previo de reacciones positivas en el ensayo T-SPOT.TB). Los 96 donantes restantes se incluyeron en el análisis.

30 Debido a la escasez de antígenos, no se analizó la totalidad de los 96 donantes con los 17 antígenos. Los números analizados con cada antígeno se enumeran en la Tabla 17.

35

**TABLA 17**

Antígeno	Número de donantes sanos analizados
Serie A	96
Serie B	96
Conjunto Massi CD4+8	96
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 TBFG_13463	92
Quimioteca de péptidos TBFG 13463	80
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 Mtub2_17866	94
Quimioteca de Mtub2_17866	95
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 Rv2654c	96
Quimioteca de péptidos Rv2654c	95

(continuación)

Antígeno	Número de donantes sanos analizados
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv3845	95
Quimioteca de Rv3845	93
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv1495	94
Quimioteca de Rv1495	96
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv0840c	93
Quimioteca de péptidos Rv0840c	93
Conjunto de epítopos de CD4/CD8 Rv1677	93
Quimioteca de Rv1677	96

### 3.2 Curvas de rendimiento diagnóstico (CRD)

- 5 Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 6. Los recuentos de manchas normalizados de donantes sanos se representaron gráficamente como valores de control. Los recuentos de manchas normalizados de donantes con TB confirmada se representaron gráficamente como valores de pacientes.
- 10 El ensayo T-SPOT.*TB* utiliza el recuento máximo de manchas de la Serie A o de la Serie B como lectura del ensayo, por ejemplo: Donante 1, Serie A = 4 manchas, Serie B = 10 manchas, el resultado del ensayo T-SPOT.*TB*, por lo tanto, = 10 manchas. Este análisis se ha aplicado para calcular el rendimiento del ensayo cuando se utilizan diferentes combinaciones de antígenos. Su uso se indica con el término Máx que sigue a los antígenos enumerados.

### 3.3 Análisis estadístico

- 15 Las curvas CRD se han comparado con el software MedCalc. Se ha utilizado el método de Hanley y McNeil, (Hanley, J., McNeil B. J. (1983)) para comparar la diferencia en el área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*) entre curvas obtenidas del mismo grupo de pacientes ( $p < 0,05$  = diferencia significativa entre curvas).

### 20 3.4 Rendimiento del ensayo T-SPOT.*TB*

- 25 En la Figura 2A, se muestra una curva CRD del rendimiento del ensayo T-SPOT.*TB*. En la Figura 2B, se muestran la sensibilidad y la especificidad del ensayo en diferentes valores de corte para el Máx de Serie A/Serie B. El rendimiento del ensayo T-SPOT.*TB* en este estudio fue del 94,2 % de sensibilidad y 97,9 % de especificidad en un valor de corte de 6 manchas. Estas cifras de rendimiento son similares al rendimiento publicado anteriormente en las instrucciones de uso del ensayo T-SPOT.*TB* de EE.UU. (sensibilidad = 95,6 % (175/183), especificidad = 97,1 % (297/306), PI-TB-US-V4, marzo de 2013). 2/96 donantes sanos dieron positivo con los antígenos de la Serie A/Serie B, estos donantes tienen cita para volver a realizar la prueba en el ensayo T-SPOT.*TB* para confirmar este resultado. La reducción del valor de corte a 3 manchas no afectaría a la sensibilidad, pero habría reducido la especificidad del ensayo al 87,5 %.

### 30 3.5 Comparación de epítopos de CD4/CD8 seleccionados frente a quimiotecas peptídicas que cubren la secuencia de proteína completa

- 35 En este grupo del estudio, se sintetizaron las secuencias peptídicas identificadas informáticamente como posibles epítopos de CD4/CD8 del genoma de *Mtb* y se combinaron de acuerdo con la proteína *Mtb* de la que se obtuvieron. Al mismo tiempo, se obtuvieron copias de las secuencias de la proteína *Mtb* y se sintetizaron quimiotecas peptídicas (pentadecámeros con un solapamiento de 11 aminoácidos) y se combinaron para cada proteína. Se analizaron ambos grupos de conjuntos de péptidos en el ensayo T-SPOT.*TB* en comparación con la Serie A y la Serie B. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.

- 40 La Figura 3 compara el conjunto de epítopos de CD4/CD8 frente a la quimioteca de péptidos Rv1495, TBFG\_13463 y Rv3845. La comparación estadística de las curvas CRD muestra que hubo una diferencia significativa en el rendimiento entre el conjunto de epítopos de CD4/CD8 y la quimioteca peptídica correspondiente en A ( $p = 0,0267$ ). En este caso, la quimioteca peptídica superó a su correspondiente conjunto de epítopos de CD4/CD8. En B y C, no hubo diferencia significativa en el rendimiento entre el conjunto de epítopos de CD4/CD8 y su proteinoteca correspondiente (0,3208 y  $p = 0,1850$  respectivamente).

- 45 La Figura 4 muestra las curvas CRD para la quimioteca de péptidos Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv1677 y Rv0840C. La Tabla 18 muestra la sensibilidad y especificidad de Rv0840c en el T-SPOT.*TB* utilizando diferentes valores de corte ( $n = 180$ ; con TB = 87; Donantes sanos = 93).

TABLA 18

Valor de corte	% de sensibilidad	CI al 95 %	% de especificidad	CI al 95 %	Cociente de verosimilitudes
> 0,5000	89,66	del 81,27 % al 95,16 %	66,67	del 56,13 % al 76,11 %	2,690
> 1,500	87,36	del 78,50 % al 93,52 %	88,17	del 79,82 % al 93,95 %	7,386
> 2,500	80,46	del 70,57 % al 88,19 %	93,55	del 86,48 % al 97,60 %	12,47
> 3,500	78,16	del 68,02 % al 86,31 %	98,92	del 94,15 % al 99,97 %	72,69
> 4,500	74,71	del 64,25 % al 83,42 %	98,92	del 94,15 % al 99,97 %	69,48
> 5,500	73,56	del 63,02 % al 82,45 %	100,0	del 96,11 % al 100,0 %	
> 6,500	72,41	del 61,79 % al 81,46 %	100,0	del 96,11 % al 100,0 %	
> 7,500	65,52	del 54,56 % al 75,39 %	100,0	del 96,11 % al 100,0 %	
> 8,500	63,22	del 52,20 % al 73,31 %	100,0	del 96,11 % al 100,0 %	
> 9,500	60,92	del 49,87 % al 71,21 %	100,0	del 96,11 % al 100,0 %	

La Tabla 19 resume las sensibilidades y especificidades individuales de los conjuntos de epítopes de CD4/CD8 de y quimiotecas de péptidos TBFG 13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677, y el conjunto Massi CD4+8, usando un valor de corte de 6 manchas.

TABLA 19

	Valor de corte de 6 manchas	
Antígeno	Sensibilidad	Especificidad
Conjunto Massi CD4+8	57,47 (50/87)	95,77 (93/96)
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 TBFG_13463	44,8 (39/87)	97,9 (90/92)
Quimioteca de péptidos TBFG_13463	67,8 (59/87)	100 (80/80)
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 Mtub2_17866	28,7 (25/87)	98,9 (93/94)
Quimioteca de Mtub2_17866	42,5 (37/87)	100 (95/95)
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 Rv2654c	31,03 (27/87)	100 (96/96)
Quimioteca de péptidos Rv2654c	58,6 (51/87)	97,9 (93/95)
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 Rv3845	44,8 (39/87)	100 (95/95)
Quimioteca de Rv3845	55,2 (48/87)	97,8 (91/93)
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 Rv1495	49,4 (43/87)	100 (94/94)
Quimioteca de Rv1495	48,3 (42/87)	95,8 (92/96)
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 Rv0840c	8 (7/87)	100 (93/93)
Quimioteca de péptidos Rv0840c	73,6 (64/87)	100 (93/93)
Conjunto de epítopes de CD4/CD8 Rv1677	29,9 (26/87)	100 (93/93)
Quimioteca de Rv1677	67,8 (59/87)	97,8 (94/96)

5 La Tabla 19 resume las sensibilidades y especificidades individuales de los conjuntos de epítopes de CD4/CD8 de y quimiotecas de péptidos TBFG 13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677, y el conjunto Massi CD4+8, usando un valor de corte de 6 manchas.

10 La Figura 5 muestra una comparación del máx de los conjuntos de epítopes de CD4/CD8 de TBFG 13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677 y el máx de las quimiotecas de péptidos TBFG 13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677. De acuerdo con la definición de "máx" anterior, cada conjunto de epítopes y quimioteca peptídica se analizó individualmente en el ensayo T-SPOT.TB. Hubo una diferencia significativa entre el máx de los conjuntos de epítopes de CD4/CD8 y el máx de las quimiotecas peptídicas ( $p = 0,0033$ ).

La Figura 6 muestra los resultados de un solo conjunto de epítopos combinados que comprende todos los conjuntos de epítopos de CD4/CD8 (TBFG\_13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677).

### 3.6 Reemplazo bien de la Serie A (ESAT-6) o de la Serie B (CFP10)

- 5 Una de las principales cuestiones planteadas al comienzo del estudio era si se podría reemplazar uno de los conjuntos de ESAT-6 (Serie A) o CFP10 (Serie B) que se utilizan actualmente en el ensayo T-SPOT.TB sin afectar al rendimiento del ensayo. En este análisis, se han reemplazado ESAT-6 y CFP10 con la quimioteca de péptidos Rv0840c, y los resultados se representan como curvas CRD. La Figura 7 muestra los resultados para el reemplazo de ESAT-6. La 10 Figura 8 muestra los resultados para el reemplazo de CFP10. Se puede ver que la sensibilidad y la especificidad son altas cuando ESAT-6 o CFP10 se reemplazan por la quimioteca de péptidos Rv0840c.

### 3.7 Adición de antígenos al ensayo T-SPOT.TB actual para aumentar la sensibilidad del ensayo

- 15 La cuestión final planteada al comienzo de este estudio era determinar si la adición de un antígeno al ensayo T-SPOT.TB actual podría aumentar la sensibilidad del ensayo T-SPOT.TB. Usando los datos generados en el estudio y el análisis de "máx" mencionado anteriormente, se han determinado los resultados de la adición de quimiotecas peptídicas al ensayo T-SPOT.TB. La Figura 9 muestra una comparación de las curvas CRD para el máx de Serie A/Serie B y el máx de la quimioteca de péptidos Rv0840c de Serie A/Serie B. La Tabla 20 resume la sensibilidad y 20 especificidad del máx de Serie A/Serie B y el máx de la quimioteca de péptidos Rv084c de Serie A/Serie B.

TABLA 20: adición de Rv0840c a la Serie A y a la Serie B en el ensayo T-SPOT.TB usando el análisis de Máx.

				MÁX	Valor de corte de 6 manchas	
Serie A	Serie B				Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Serie A	Serie B	Rv0840c			94,2 (82/87)	97,9 (94/96)
					96,5 (84/87)	97,8 (91/93)

- 25 La inclusión de Rv0840c en el ensayo T-SPOT.TB produjo la detección de 2 donantes con TB confirmada adicionales que el ensayo T-SPOT.TB actual no habría detectado. La inclusión de Rv0840c aumentó la sensibilidad del ensayo T-SPOT.TB hasta el 96,5 % (84/87).

### 4. Conclusión

- 30 Este estudio fue un estudio de viabilidad inicial diseñado para identificar posibles antígenos candidatos para reemplazar a los antígenos ESAT-6 y CFP10 en el ensayo T-SPOT.TB y/o para aumentar la sensibilidad del ensayo T-SPOT.TB actual. Se analizaron 87 donantes con TB y hasta 96 donantes sanos en el ensayo T-SPOT.TB con conjuntos de epítopos de CD4/CD8 TBFG\_13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677, y 35 quimiotecas de péptidos TBFG\_13463, Mtub2\_17866, Rv2654c, Rv3845, Rv1495, Rv0840c y Rv1677 de la Serie A y la Serie B.

- 40 Tanto las quimiotecas peptídicas como los conjuntos de epítopos de CD4/CD8 logran una buena especificidad en el T-SPOT.TB. En algunos casos, las quimiotecas peptídicas (pentadecámeros/solapamiento en 11 aminoácidos) superaron al correspondiente conjunto de epítopos de CD4/CD8. Los resultados muestran que la quimioteca de péptidos Rv0840c en particular es un candidato prometedor para aumentar la sensibilidad del ensayo T-SPOT.TB, reemplazando a ESAT-6 o a CFP10.

### LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> OXFORD IMMUNOTEC LIMITED  
 <120> PROTEÍNAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
 <130> N406089WO  
 50 <150> BG 111804  
 <151> 15/08/2014  
 <150> BG 112045  
 55 <151> 30/06/2015  
 <160> 157  
 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 897 933 T3

<210> 1  
<211> 131  
<212> PRT  
5 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 1

Met Thr Ile Asn Asn Gln Phe Asp Asp Ala Asp Thr His Gly Ala Thr  
1 5 10 15

Ser Asp Phe Trp Cys Asp Ala Glu Trp Ala Gly Leu Arg Gly Pro Val  
20 25 30

Ala Ala Gly Leu Gly Arg Ala Ala Leu Val Gly Tyr Leu Ser Val Pro  
35 40 45

Gln Gly Trp Thr Glu Ala Asn Gln Ala Asn Leu Ala Ala Gly Thr Glu  
50 55 60

Ala Glu Pro Asn Gln Ala Leu Gly Trp Leu Pro Met Gln Asp Ile Asp  
65 70 75 80

Ala Ala Ala Glu Ala Ala Ala Gln Pro Ser His Ala Leu Gly Trp Leu  
85 90 95

Pro Ile Glu Glu Ile Asp Ala Ala Ser Asp Asp Gly Glu Val Ser  
100 105 110

Ser Ser Pro Gln Leu Pro Pro Arg Pro Phe Met Met Pro His Thr Pro  
115 120 125

Ser Gly Gly  
130

10

<210> 2  
<211> 59  
<212> PRT  
15 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 2

Met Ile Asp Asp Arg His Lys Ser Thr Arg Arg Thr Cys Asn His Gly  
 1 5 10 15

Gly Ile Thr Trp Arg Val Ala Ala Thr Ser Ala Arg Ser Ala Arg Ser  
 20 25 30

Leu Ala Thr Thr His Pro Glu Ala Gly His Tyr Gly Leu Ala Thr Trp  
 35 40 45

Phe Thr Arg Met Asp Ala Met Thr Ala Pro Thr  
 50 55

<210> 3

<211> 81

5 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 3

Met Ser Gly His Ala Leu Ala Ala Arg Thr Leu Leu Ala Ala Ala Asp  
 1 5 10 15

Glu Leu Val Gly Gly Pro Pro Val Glu Ala Ser Ala Ala Leu Ala  
 20 25 30

Gly Asp Ala Ala Gly Ala Trp Arg Thr Ala Ala Val Glu Leu Ala Arg  
 35 40 45

Ala Leu Val Arg Ala Val Ala Glu Ser His Gly Val Ala Ala Val Leu  
 50 55 60

Phe Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg Gly Asp Pro  
 65 70 75 80

10 Pro

<210> 4

<211> 119

15 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 4

Met Asp Arg Val Arg Arg Val Val Thr Asp Arg Asp Ser Gly Ala Gly  
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Arg His Pro Leu Ala Gly Arg Arg Thr Asp Pro Gln Leu  
 20 25 30

Ala Ala Phe Tyr His Arg Leu Met Thr Thr Gln Arg His Cys His Thr  
 35 40 45

Gln Ala Thr Ile Ala Val Ala Arg Lys Leu Ala Glu Arg Thr Arg Val  
 50 55 60

Thr Ile Thr Thr Gly Arg Pro Tyr Gln Leu Arg Asp Thr Asn Gly Asp  
 65 70 75 80

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

Val Asp Thr Arg Thr His Pro His Asn Arg Ala His Thr Asp Thr Met  
 100 105 110

Gln Asn Ser Lys Pro Ala Arg  
 115

<210> 5

<211> 105

5 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 5

Met Asn Ala Pro Leu Arg Gly Gln Val Tyr Arg Cys Asp Leu Gly Tyr  
 1 5 10 15

Gly Ala Lys Pro Trp Leu Ile Val Ser Asn Asn Ala Arg Asn Arg His  
 20 25 30

Thr Ala Asp Val Val Ala Val Arg Leu Thr Thr Thr Arg Arg Thr Ile  
 35 40 45

Pro Thr Trp Val Ala Met Gly Pro Ser Asp Pro Leu Thr Gly Tyr Val  
 50 55 60

Asn Ala Asp Asn Ile Glu Thr Leu Gly Lys Asp Glu Leu Gly Asp Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gly Glu Val Thr Pro Ala Thr Met Asn Lys Ile Asn Thr Ala Leu  
 85 90 95

Ala Thr Ala Leu Gly Leu Pro Trp Pro  
 100 105

## ES 2 897 933 T3

<211> 286  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

5 <400> 6

Met Glu Gly Thr Ile Ala Val Pro Gly Gly Arg Val Trp Phe Gln Arg  
 1 5 10 15

Ile Gly Gly Pro Gly Arg Pro Leu Leu Val Val His Gly Gly Pro  
 20 25 30

Gly Leu Pro His Asn Tyr Leu Ala Pro Leu Arg Arg Leu Ser Asp Glu  
 35 40 45

Arg Glu Val Ile Phe Trp Asp Gln Leu Gly Cys Gly Asn Ser Ala Cys  
 50 55 60

Pro Ser Asp Val Asp Leu Trp Thr Met Asn Arg Ser Val Ala Glu Met  
 65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Glu Ala Leu Ala Leu Thr Arg Phe His Ile Phe Ser  
 85 90 95

His Ser Trp Gly Gly Met Leu Ala Gln Gln Tyr Val Leu Asp Lys Ala  
 100 105 110

Pro Asp Ala Val Ser Leu Thr Ile Ala Asn Ser Thr Ala Ser Ile Pro  
 115 120 125

Glu Phe Ser Ala Ser Leu Val Ser Leu Lys Ser Cys Leu Asp Val Ala  
 130 135 140

Thr Arg Ser Ala Ile Asp Arg His Glu Ala Ala Gly Thr Thr His Ser  
 145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gln Ala Ala Ile Arg Thr Trp Asn Glu Thr Tyr Leu Cys  
 165 170 175

Arg Thr Arg Pro Trp Pro Arg Glu Leu Thr Glu Ala Phe Ala Asn Met  
 180 185 190

Gly Thr Glu Ile Phe Glu Thr Met Phe Gly Pro Ser Asp Phe Arg Ile  
 195 200 205

Val Gly Asn Val Arg Asp Trp Asp Val Val Asp Arg Leu Ala Asp Ile  
 210 215 220

ES 2 897 933 T3

Ala Val Pro Thr Leu Leu Val Val Gly Arg Phe Asp Glu Cys Ser Pro  
 225 230 235 240

Glu His Met Arg Glu Met Gln Gly Arg Ile Ala Gly Ser Arg Leu Glu  
 245 250 255

Phe Phe Glu Ser Ser Ser His Met Pro Phe Ile Glu Glu Pro Ala Arg  
 260 265 270

Phe Asp Arg Val Met Arg Glu Phe Leu Arg Leu His Asp Ile  
 275 280 285

<210> 7

<211> 182

5 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 7

Val Thr His Ser Arg Leu Ile Gly Ala Leu Thr Val Val Ala Ile Ile  
 1 5 10 15

Val Thr Ala Cys Gly Ser Gln Pro Lys Ser Gln Pro Ala Val Ala Pro  
 20 25 30

Thr Gly Asp Ala Ala Ala Ala Thr Gln Val Pro Ala Gly Gln Thr Val  
 35 40 45

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

His Gly Glu Ser Leu Leu Gly Lys Pro Ala Val Leu Trp Phe Trp Ala  
 65 70 75 80

Pro Trp Cys Pro Thr Cys Gln Gly Glu Ala Pro Val Val Gly Gln Val  
 85 90 95

Ala Ala Ser His Pro Glu Val Thr Phe Val Gly Val Ala Gly Leu Asp  
 100 105 110

Gln Val Pro Ala Met Gln Glu Phe Val Asn Lys Tyr Pro Val Lys Thr  
 115 120 125

Phe Thr Gln Leu Ala Asp Thr Asp Gly Ser Val Trp Ala Asn Phe Gly  
 130 135 140

Val Thr Gln Gln Pro Ala Tyr Ala Phe Val Asp Pro His Gly Asn Val  
 145 150 155 160

Asp Val Val Arg Gly Arg Met Ser Gln Asp Glu Leu Thr Arg Arg Val  
 165 170 175

Thr Ala Leu Thr Ser Arg  
 180

<210> 8

<211> 14

5 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 8

10 Ala Ala Leu Val Gly Tyr Leu Ser Val Pro Gln Gly Trp Thr  
 1 5 10

<210> 9

<211> 15

15 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 9

Gln Ala Leu Gly Trp Leu Pro Met Gln Asp Ile Asp Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

20

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

25

<400> 10

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

30

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

35

<400> 11

Gly Gly Ile Thr Trp Arg Val Ala Ala Thr Ser Ala Arg Ser Ala  
 1 5 10 15

40

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

45

<400> 12

Gly His Tyr Gly Leu Ala Thr Trp Phe Thr Arg Met Asp Ala Met Thr  
 1 5 10 15

Ala Pro Thr

<210> 13

<211> 25  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

5 <400> 13

Val Trp Phe Gln Arg Ile Gly Gly Gly Pro Gly Arg Pro Leu Leu Val  
 1 5 10 15

Val His Gly Gly Pro Gly Leu Pro His  
 20 25

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

10 <400> 14

15 His Ser Trp Gly Gly Met Leu Ala Gln Gln Tyr Val Leu Asp Lys Ala  
 1 5 10 15

Pro Asp Ala Val Ser  
 20

<210> 15  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

20 <400> 15

25 Val Ser Leu Thr Ile Ala Asn Ser Thr Ala Ser Ile Pro  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

30 <400> 16

35 Ala Ser Leu Val Ser Leu Lys Ser Cys Leu Asp Val Ala  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

40 <400> 17

45 Ser Asp Phe Arg Ile Val Gly Asn Val Arg Asp Trp Asp  
 1 5 10

<210> 18  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

ES 2 897 933 T3

<400> 18

    Ser Arg Leu Glu Phe Phe Glu Ser Ser Ser His Met Pro  
    1                  5                                 10

5    <210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10   <400> 19

    Asp Arg Val Met Arg Glu Phe Leu Arg Leu His Asp Ile  
    1                  5                                 10

15   <210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20   <400> 20

    Met Asp Arg Val Arg Arg Val Val Thr Asp Arg Asp Ser Gly Ala Gly  
    1                  5                                 10                  15

Ala

25   <210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 21

    Pro Gln Leu Ala Ala Phe Tyr His Arg Leu Met Thr Thr Gln Arg His  
    1                  5                                 10                  15

Cys

30

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 22

    Ala Thr Ile Ala Val Ala Arg Lys Leu Ala Glu Arg Thr  
    1                  5                                 10

40

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

45

<400> 23

    Arg Pro Tyr Gln Leu Arg Asp Thr Asn Gly Asp Pro Val  
    1                  5                                 10



ES 2 897 933 T3

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 29

5

Ala Pro Val Val Gly Gln Val Ala Ala Ser His Pro Glu Val  
1 5 10

<210> 30

<211> 15

10

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 30

15

Pro Glu Val Thr Phe Val Gly Val Ala Gly Leu Asp Gln Val Pro  
1 5 10 15

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

20

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 31

Gln Glu Phe Val Asn Lys Tyr Pro Val Lys Thr Phe Thr Gln Leu Ala  
1 5 10 15

Asp Thr Asp

25

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

30

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 32

Ser Val Trp Ala Asn Phe Gly Val Thr Gln Gln Pro Ala  
1 5 10

35

<210> 33

<211> 23

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

40

<400> 33

Val Asp Val Val Arg Gly Arg Met Ser Gln Asp Glu Leu Thr Arg Arg  
1 5 10 15

Val Thr Ala Leu Thr Ser Arg  
20

45

<210> 34

<211> 27

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 34

ES 2 897 933 T3

Gln Val Tyr Arg Cys Asp Leu Gly Tyr Gly Ala Lys Pro Trp Leu Ile  
1 5 10 15

Val Ser Asn Asn Ala Arg Asn Arg His Thr Ala  
20 25

5 <210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10 <400> 35

Gln Val Tyr Arg Cys Asp Leu Gly Tyr Gly Ala Lys Pro Trp Leu Ile  
1 5 10 15

Val

15 <210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 36

Lys Pro Trp Leu Ile Val Ser Asn Asn Ala Arg Asn Arg His Thr Ala  
1 5 10 15

20 <210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

25 <400> 37

Ala Asp Val Val Ala Val Arg Leu Thr Thr Thr Arg Arg Thr Ile Pro  
1 5 10 15

30 <210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

35 <400> 38

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

40 <210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

45 <400> 39

Thr Gly Tyr Val Asn Ala Asp Asn Ile Glu Thr Leu Gly Lys  
1 5 10

ES 2 897 933 T3

5 <210> 40  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 40

10	Ala Thr Met Asn Lys Ile Asn Thr Ala Leu Ala Thr Ala Leu Gly Leu
	1 5 10 15

10 <210> 41  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 15 <400> 41

20	Ala Asp Thr His Gly Ala Thr Ser Asp Phe Trp
	1 5 10

20 <210> 42  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 25 <400> 42

30	Gly Pro Val Ala Ala Gly Leu Gly Arg Ala Ala Leu
	1 5 10

30 <210> 43  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 35 <400> 43

40	Val Gly Tyr Leu Ser Val Pro Gln Gly Trp
	1 5 10

40 <210> 44  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 45 <400> 44

50	Thr Glu Ala Glu Pro Asn Gln Ala Leu Gly Trp Leu Pro Met
	1 5 10

50 <210> 45  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 45

55	Ala Glu Ala Ala Ala Gln Pro Ser His Ala Leu Gly Trp Leu
	1 5 10

ES 2 897 933 T3

5 <210> 46  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 46

Leu	Pro	Ile	Glu	Glu	Ile	Asp	Ala	Ala	Ala	Ser	Asp
1					5					10	

10 <210> 47  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 15 <400> 47

Gly	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Leu	Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Met	Met
1						5					10			15	

20 <210> 48  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 25 <400> 48

Arg	Pro	Phe	Met	Met	Pro	His	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly
1					5				10		

30 <210> 49  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 35 <400> 49

Ser	Thr	Arg	Arg	Thr	Cys	Asn	His	Gly	Gly	Ile	Thr	Trp	Arg
1					5					10			

40 <210> 50  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 45 <400> 50

Ile	Thr	Trp	Arg	Val	Ala	Ala	Thr	Ser	Ala	Arg	Ser	Ala	Arg
1					5				10				

50 <210> 51  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 51

Ala Thr Thr His Pro Glu Ala Gly His Tyr Gly Leu  
 1 5 10

<210> 52

<211> 13

5 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 52

10 Glu Ala Gly His Tyr Gly Leu Ala Thr Trp Phe Thr Arg  
 1 5 10

<210> 53

<211> 11

15 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 53

20 His Ala Leu Ala Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala  
 1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

25 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 54

Thr Leu Leu Ala Ala Ala Asp Glu Leu Val  
 1 5 10

30 <210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

35 <400> 55

Ala Ala Leu Ala Gly Asp Ala Ala Gly Ala Trp  
 1 5 10

40 <210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

45 <400> 56

Arg Thr Ala Ala Val Glu Leu Ala Arg Ala Leu Val Arg Ala Val  
 1 5 10 15

50 <210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 57

Ala Glu Ser His Gly Val Ala Ala Val Leu Phe Ala Ala  
 1 5 10

5 <210> 58  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 58

10 Val Leu Phe Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg  
 1 5 10

15 <210> 59  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 59

20 Arg Arg Thr Asp Pro Gln Leu Ala Ala Phe Tyr His Arg  
 1 5 10

25 <210> 60  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 60

30 His Thr Gln Ala Thr Ile Ala Val Ala Arg Lys Leu Ala Glu Arg  
 1 5 10 15

35 <210> 61  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

40 <400> 61  
 Arg Thr Arg Val Thr Ile Thr Thr Gly Arg Pro Tyr Gln Leu Arg  
 1 5 10 15

45 <210> 62  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 62

50 Lys Glu Leu Ile Asp Ala His Tyr His Val Asp Thr Arg  
 1 5 10

<210> 63  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

&lt;400&gt; 63

Asp	Thr	Arg	Thr	His	Pro	His	Asn	Arg	Ala	His	Thr
1				5					10		

5 &lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10 &lt;400&gt; 64

Arg	Ala	His	Thr	Asp	Thr	Met	Gln	Asn	Ser	Lys	Pro	Ala	Arg
1				5					10				

15 &lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20 &lt;400&gt; 65

Val	Tyr	Arg	Cys	Asp	Leu	Gly	Tyr	Gly	Ala	Lys	Pro	Trp	Leu	Ile
1				5					10				15	

25 &lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 14

25 &lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

&lt;400&gt; 66

His	Thr	Ala	Asp	Val	Val	Ala	Val	Arg	Leu	Thr	Thr	Thr	Arg
1				5					10				

30

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

35 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

&lt;400&gt; 67

Leu	Thr	Thr	Thr	Arg	Arg	Thr	Ile	Pro	Thr	Trp	Val	Ala
1				5					10			

40

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

45

&lt;400&gt; 68

Tyr	Leu	Gly	Glu	Val	Thr	Pro	Ala	Thr	Met	Asn	Lys	Ile
1				5					10			

50

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

ES 2 897 933 T3

<400> 69

Ala Leu Ala Thr Ala Leu Gly Leu Pro Trp  
1 5 10

5

<210> 70

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10

<400> 70

Gly Thr Ile Ala Val Pro Gly Gly Arg Val Trp Phe Gln Arg  
1 5 10

15

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20

<400> 71

Leu Pro His Asn Tyr Leu Ala Pro Leu Arg Arg  
1 5 10

25

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

30

<400> 72

Asn Ser Ala Cys Pro Ser Asp Val Asp Leu Trp Thr Met Asn Arg  
1 5 10 15

35

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 73

Ala Glu Met Ala Thr Val Ala Glu Ala Leu Ala Leu Thr Arg  
1 5 10

40

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

45

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 74

Ala Glu Ala Leu Ala Leu Thr Arg Phe His Ile Phe Ser  
1 5 10

50

<210> 75

<211> 11

<212> PRT



<212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

5 <400> 81

Gl u Th r Ty r Le u C y s Arg Th r Arg Pro Tr p Pro Arg  
 1 5 10

10 <210> 82

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

15 <400> 82

1 5 10

Arg Pro Tr p Pro Arg Gl u Le u Th r Gl u Ala Phe Ala Asn Met

20 <210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

25 <400> 83

1 5 10

Th r Gl u Ala Phe Ala Asn Met Gly Th r Gl u Ile Phe

30 <210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

35 <400> 84

1 5 10

Phe Gl u Th r Met Phe Gly Pro Ser Asp Phe Arg Ile

40 <210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

45 <400> 85

1 5 10

Le u Gl u Phe Phe Gl u Ser Ser Ser His Met Pro Phe

50 <210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

55 <400> 86

1 5 10

Met Pro Phe Ile Gl u Gl u Pro Ala Arg Phe

<210> 87

<211> 13

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

&lt;400&gt; 87

5

Asp	Arg	Val	Met	Arg	Glu	Phe	Leu	Arg	Leu	His	Asp	Ile
1					5						10	

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 12

10

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

&lt;400&gt; 88

15

Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Glu	Ala	Glu	Pro	Asn
1					5					10	

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 20

20

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

&lt;400&gt; 89

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

Pro	Arg	Pro	Phe
20			

25

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

30

&lt;400&gt; 90

Ala	Ala	Gly	Thr	Glu	Ala	Glu	Pro	Asn	Gln	Ala	Leu	Gly
1					5					10		

35

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

40

&lt;400&gt; 91

Asp	Ile	Asp	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Gln	Pro	Ser	His	Ala
1					5				10			15

45

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

50

&lt;400&gt; 92

Glu Ile Asp Ala Ala Ala Ser Asp Asp Gly Glu Val  
 1 5 10

5 <210> 93  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 93

10 Phe Met Met Pro His Thr Pro Ser Gly Gly  
 1 5 10

15 <210> 94  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 <400> 94

Gly Glu Val Ser Ser Ser Pro Gln Leu Pro Pro Arg Pro Phe Met Met  
 1 5 10 15

20 <210> 95  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 25 <400> 95

Gly Thr Glu Ala Glu Pro Asn Gln Ala Leu Gly  
 1 5 10

30 <210> 96  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 35 <400> 96

Gly Trp Thr Glu Ala Asn Gln Ala Asn Leu Ala  
 1 5 10

40 <210> 97  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
 45 <400> 97

Met Thr Ile Asn Asn Gln Phe Asp Asp Ala Asp Thr His Gly Ala  
 1 5 10 15

50 <210> 98  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

ES 2 897 933 T3

<400> 98

    Ser Val Pro Gln Gly Trp Thr Glu Ala Asn Gln  
    1                  5                         10

5    <210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10   <400> 99

    Thr Ile Asn Asn Gln Phe Asp Asp Ala Asp Thr His Gly  
    1                  5                         10

15   <210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20   <400> 100

    Trp Leu Pro Met Gln Asp Ile Asp Ala Ala Ala  
    1                  5                         10

25   <210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

30   <400> 101

    Lys Ser Thr Arg Arg Thr Cys Asn His Gly Gly  
    1                  5                         10

35   <210> 102

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

40   <400> 102

    Val Ala Ala Thr Ser Ala Arg Ser Ala Arg Ser Leu Ala  
    1                  5                         10

45   <210> 103

<211> 12

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

50   <400> 103

    Met Ile Asp Asp Arg His Lys Ser Thr Arg Arg Thr  
    1                  5                         10

55   <210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

ES 2 897 933 T3

<400> 104

Ala Ala Leu Ala Gly Asp Ala Ala Gly Ala Trp Arg Thr  
1 5 10

5

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10

<400> 105

Ala Gly Arg Arg Thr Asp Pro Gln Leu Ala  
1 5 10

15

<210> 106

<211> 22

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20

<400> 106

Asp Thr Arg Thr His Pro His Asn Arg Ala His Thr Asp Thr Met Gln  
1 5 10 15

Asn Ser Lys Pro Ala Arg  
20

25

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

30

<400> 107

Gly Asp Pro Val Thr Ala Arg Gly Ala Lys Glu  
1 5 10

35

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 108

Pro Leu Ala Gly Arg Arg Thr Asp Pro Gln Leu Ala Ala  
1 5 10

40

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

45

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 109

Arg Asp Thr Asn Gly Asp Pro Val Thr Ala Arg Gly  
1 5 10

5 <210> 110  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 110

Arg Val Val Thr Asp Arg Asp Ser Gly Ala Gly Ala Leu  
 1 5 10

10 <210> 111  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

15 <400> 111

Thr Thr Gly Arg Pro Tyr Gln Leu Arg Asp Thr Asn Gly Asp Pro Val  
 1 5 10 15

Thr

20 <210> 112  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

25 <400> 112

Val Ala Arg Lys Leu Ala Glu Arg Thr Arg Val Thr Ile  
 1 5 10

30 <210> 113  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

35 <400> 113

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

40 <210> 114  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 114

Cys Asp Leu Gly Tyr Gly Ala Lys Pro Trp Leu Ile Val  
 1 5 10

45 <210> 115  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 115

ES 2 897 933 T3

Met Asn Ala Pro Leu Arg Gly Gln Val Tyr Arg  
1 5 10

5 <210> 116  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10 <400> 116  
10 Ser Asn Asn Ala Arg Asn Arg His Thr Ala Asp

1 5 10

15 <210> 117  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20 <400> 117

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

Lys Ile Asn Gly Gly Val Ser Asn Asn  
20 25

25 <210> 118  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

30 <400> 118

Leu Gly Tyr Arg Cys Asp Leu Gly Tyr Gly Ala Lys Gly Arg Leu Thr  
1 5 10 15

Thr

35 <210> 119  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 119

Thr Thr Thr Arg Arg Thr Ile Pro Thr Trp Val Ala Met Gly Pro Ser  
1 5 10 15

40 Asp Pro Leu Thr  
20

<210> 120  
<211> 18  
<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 120

Tyr	Arg	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Asp	Gly	Thr	Leu	Gly	Lys	Asp	Glu	Leu
1				5					10					15	

5                   Gly Asp

<210> 121

<211> 22

<212> PRT

10                  <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 121

Met	Glu	Gly	Thr	Ile	Ala	Val	Pro	Gly	Gly	Arg	Val	Trp	Phe	Gln	Arg
1				5						10				15	

Gly	Gly	Gly	Asn	Ser	Ala
20					

15

<210> 122

<211> 17

<212> PRT

20                  <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 122

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

Glu

25

<210> 123

<211> 26

<212> PRT

20                  <213> *Mycobacterium tuberculosis*

30                  <400> 123

Val	Ser	Leu	Lys	Ser	Cys	Leu	Asp	Val	Ala	Thr	Arg	Ser	Ala	Ile	Asp
1			5					10				15			

Arg	Pro	Glu	Tyr	Gln	Ala	Ala	Ile	Arg	Thr
20							25		

35

<210> 124

<211> 16

<212> PRT

20                  <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 124

40

Glu	Thr	Tyr	Leu	Cys	Arg	Thr	Arg	Pro	Trp	Pro	Arg	Glu	Leu	Thr	Glu
1				5				10				15			

<210> 125  
<211> 22

5 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 125

Met Glu Gly Thr Ile Ala Val Pro Gly Gly Arg Val Trp Phe Gln Arg  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Asn Ser Ala  
20

10

<210> 126  
<211> 17

<212> PRT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

15

<400> 126

1 5 10 15

Glu

20

<210> 127  
<211> 26  
<212> RPT

<212> FRT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

25

<400> 127

Val Ser Leu Lys Ser Cys Leu Asp Val Ala Thr Arg Ser Ala Ile Asp  
1 5 10 15

Arg Pro Glu Tyr Gln Ala Ala Ile Arg Thr  
20 25

<210> 128  
<211> 16

<212> PRT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 128

Glu Thr Tyr Leu Cys Arg Thr Arg Pro Trp Pro Arg Glu Leu Thr Glu  
1 5 10 15

<210> 129  
<211> 12

40

<211> 12  
<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 129

Asp Val Ala Thr Arg Ser Ala Ile Asp Arg His Glu  
 1 5 10

<210> 130  
 <211> 11

5 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 130

Gly Asn Val Arg Asp Trp Asp Val Val Asp Arg  
 10 1 5 10

<210> 131  
 <211> 16

15 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 131

Gly Arg Val Trp Phe Gln Arg Ile Gly Gly Pro Gly Arg Pro Leu  
 20 1 5 10 15

<210> 132  
 <211> 12

25 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 132

His Met Arg Glu Met Gln Gly Arg Ile Ala Gly Ser  
 30 1 5 10

<210> 133  
 <211> 12

<212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

35 <400> 133

Met Arg Glu Met Gln Gly Arg Ile Ala Gly Ser Arg  
 40 1 5 10

<210> 134  
 <211> 12

<212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 134

Gln Leu Gly Cys Gly Asn Ser Ala Cys Pro Ser Asp  
 45 1 5 10

<210> 135  
 <211> 13

50 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 135

5                    Gln Gln Tyr Val Leu Asp Lys Ala Pro Asp Ala Val Ser  
                   1                                    5                                    10

5                    <210> 136  
                   <211> 11  
                   <212> PRT  
                   <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
                   <400> 136

10                   Arg Glu Met Gln Gly Arg Ile Ala Gly Ser Arg  
                   1                                    5                                    10

10                   <210> 137  
                   <211> 16  
                   <212> PRT  
                   <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
                   <400> 137

20                   Thr Ala Cys Gly Ser Gln Pro Lys Ser Gln Pro Ala Val Ala Pro Thr  
                   1                                    5                                    10                                    15

20                   <210> 138  
                   <211> 18  
                   <212> PRT  
                   <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
                   <400> 138

25                   Thr Gln Val Pro Ala Gly Gln Thr Val Pro Ala Gln Leu Gln Phe Ser  
                   1                                    5                                    10                                    15

                  Ala Lys

30                   <210> 139  
                   <211> 14  
                   <212> PRT  
                   <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
                   <400> 139

35                   Ser Ala Lys Thr Leu Asp Gly His Asp Phe His Gly Glu Ser  
                   1                                    5                                    10

40                   <210> 140  
                   <211> 15  
                   <212> PRT  
                   <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
                   <400> 140

45                   Met Gln Glu Phe Val Asn Lys Tyr Pro Val Lys Thr Phe Thr Gln  
                   1                                    5                                    10                                    15

50                   <210> 141  
                   <211> 21  
                   <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 141

Asn	Phe	Gly	Val	Thr	Gln	Gln	Pro	Ala	Tyr	Ala	Phe	Val	Asp	Pro	His
1					5					10				15	

Gly	Asn	Val	Asp	Val
		20		

5

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

10 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 142

His	Gly	Ala	Thr	Ser	Asp	Phe	Trp
1					5		

15

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

20 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 143

Glu	Pro	Asn	Gln	Ala	Leu	Gly	Trp	Leu	Pro	Met
1					5				10	

25

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

30 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 144

Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Leu	Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Met	Met
1					5				10			

35

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

40 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 145

40

Phe	Met	Met	Pro	His	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly
1					5			10	

45

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

45 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 146

His Tyr Gly Leu Ala Thr Trp Phe Thr Arg

1 5 10

5 <210> 147  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

10 <400> 147

Glu Leu Ala Arg Ala Leu Val Arg Ala Val  
 1 5 10

15 <210> 148  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

20 <400> 148

Ala Thr Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg  
 1 5 10

25 <210> 149  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 149

Gln Leu Ala Ala Phe Tyr His Arg Leu  
 1 5

30 <210> 150  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 150

Ala Thr Ile Ala Val Ala Arg Lys Leu Ala Glu Arg  
 1 5 10

40 <210> 151  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

45 <400> 151

Thr Ile Thr Thr Gly Arg Pro Tyr Gln Leu Arg  
 1 5 10

50 <210> 152  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 152

Thr Met Gln Asn Ser Lys Pro Ala Arg  
1 5

5

<210> 153

<211> 11

<212> PRT

10 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 153

Asp Leu Gly Tyr Gly Ala Lys Pro Trp Leu Ile  
1 5 10

15

<210> 154

<211> 8

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20

<400> 154

Gly Gly Arg Val Trp Phe Gln Arg  
1 5

25

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

30

<400> 155

Asp Val Asp Leu Trp Thr Met Asn Arg  
1 5

35

<210> 156

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 156

40

Thr Val Ala Glu Ala Leu Ala Leu Thr Arg  
1 5 10

45

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 157

Ser Thr Ala Ser Ile Pro Glu Phe Ser Ala  
1 5 10

50

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) en un sujeto, que comprende detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia un conjunto de fragmentos derivados de una proteína de *M. tuberculosis*, en donde el conjunto comprende dos o más fragmentos diferentes derivados de Rv0840c (SEQ ID NO: 6) y en donde los fragmentos del conjunto forman una quimioteca de fragmentos proteicos que abarca al menos el 80 % de la secuencia de SEQ ID NO: 6 en la que los fragmentos tienen una longitud de 12 a 18 aminoácidos y se solapan en 9 a 12 aminoácidos.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más conjuntos de fragmentos derivados de una proteína de *M. tuberculosis*, en donde cada conjunto comprende fragmentos derivados de una proteína diferente seleccionada entre TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1), Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2), Rv2654c (SEQ ID NO: 3), Rv3845 (SEQ ID NO: 4), Rv1495 (SEQ ID NO: 5) y Rv1677 (SEQ ID NO: 7), y en donde cada fragmento comprende 8 o más aminoácidos.
- 15 3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales, opcionalmente en donde la una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales comprenden una proteína RD1 y opcionalmente en donde la proteína RD1 es CFP-10 o ESAT-6.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los fragmentos del conjunto forman una quimioteca de fragmentos proteicos que engloba toda la secuencia de la proteína a partir de la que se obtienen los fragmentos.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los fragmentos se solapan en 11 aminoácidos.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los fragmentos tienen 15 aminoácidos de longitud.
- 30 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde uno o más de los fragmentos comprenden un epítopo de linfocitos T o un epítopo de linfocitos B de la proteína de la que se obtienen los fragmentos, opcionalmente en donde el epítopo de linfocitos T es un epítopo de CD4 o un epítopo de CD8.
- 35 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la reacción inmunitaria es una reacción inmunitaria mediada por células o una reacción de linfocitos T *in vitro*, opcionalmente en donde la reacción de linfocitos T es secreción de citocinas o proliferación de linfocitos T, y opcionalmente en donde la secreción de citocinas es secreción de interferón γ (IFNγ).
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde:
- 40 (i) la reacción inmunitaria es una reacción de linfocitos B, opcionalmente en donde la reacción de linfocitos B es secreción de anticuerpos o proliferación de linfocitos B; o  
 (ii) la reacción inmunitaria es la producción de anticuerpos frente al conjunto de fragmentos definido en la reivindicación 1.
- 45 10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende un enzimoinmunoanálisis por manchas (ELISPOT).
- 50 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto una población de células inmunitarias obtenidas del paciente con el conjunto de fragmentos definido en la reivindicación 1.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde:
- 55 (I) el método comprende además detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) dos o más fragmentos derivados de TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1); (b) dos o más fragmentos derivados de Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2); (c) dos o más fragmentos derivados de Rv2654c (SEQ ID NO: 3); (d) dos o más fragmentos derivados de Rv3845 (SEQ ID NO: 4); (e) dos o más fragmentos derivados de Rv1495 (SEQ ID NO: 5); o (f) dos o más fragmentos derivados de Rv1677 (SEQ ID NO: 7), en donde cada fragmento comprende 8 o más aminoácidos, y en donde la misma población de células inmunitarias se pone en contacto con el conjunto de fragmentos definido en la reivindicación 1 y el uno o más de (a) a (f); y/o  
 (II) la población de células inmunitarias se pone en contacto además con una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales definidas en la reivindicación 3.
- 60 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde:
- 65 (I) el método comprende además detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia uno o más de (a) dos o más

- 5 fragmentos derivados de TBFG\_13463 (SEQ ID NO: 1; (b) dos o más fragmentos derivados de Mtub2\_17866 (SEQ ID NO: 2); (c) dos o más fragmentos derivados de Rv2654c (SEQ ID NO: 3); (d) dos o más fragmentos derivados de Rv3845 (SEQ ID NO: 4); (e) dos o más fragmentos derivados de Rv1495 (SEQ ID NO: 5); o (f) dos o más fragmentos derivados de Rv1677 (SEQ ID NO: 7), en donde cada fragmento comprende 8 o más aminoácidos, y en donde el conjunto de fragmentos definido en la reivindicación 1 y del uno o más de (a) a (f) se ponen en contacto cada uno con una población diferente de células inmunitarias; y/o  
(II) el método comprende además detectar *in vitro* una reacción inmunitaria hacia una o más proteínas de *M. tuberculosis* adicionales definidas en la reivindicación 3, y en donde cada una de las proteínas de *M. tuberculosis* adicionales se pone en contacto con una población diferente de células inmunitarias.
- 10 14. Uso de un conjunto de fragmentos definidos en la reivindicación 1 para diagnosticar la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) en una muestra obtenida de un sujeto.

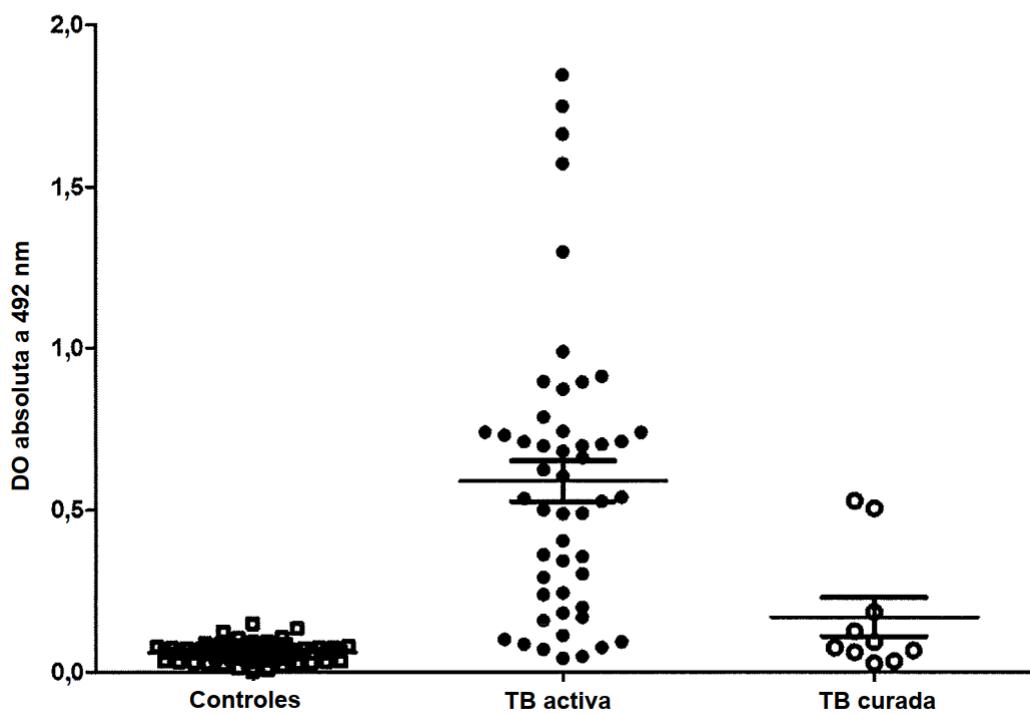
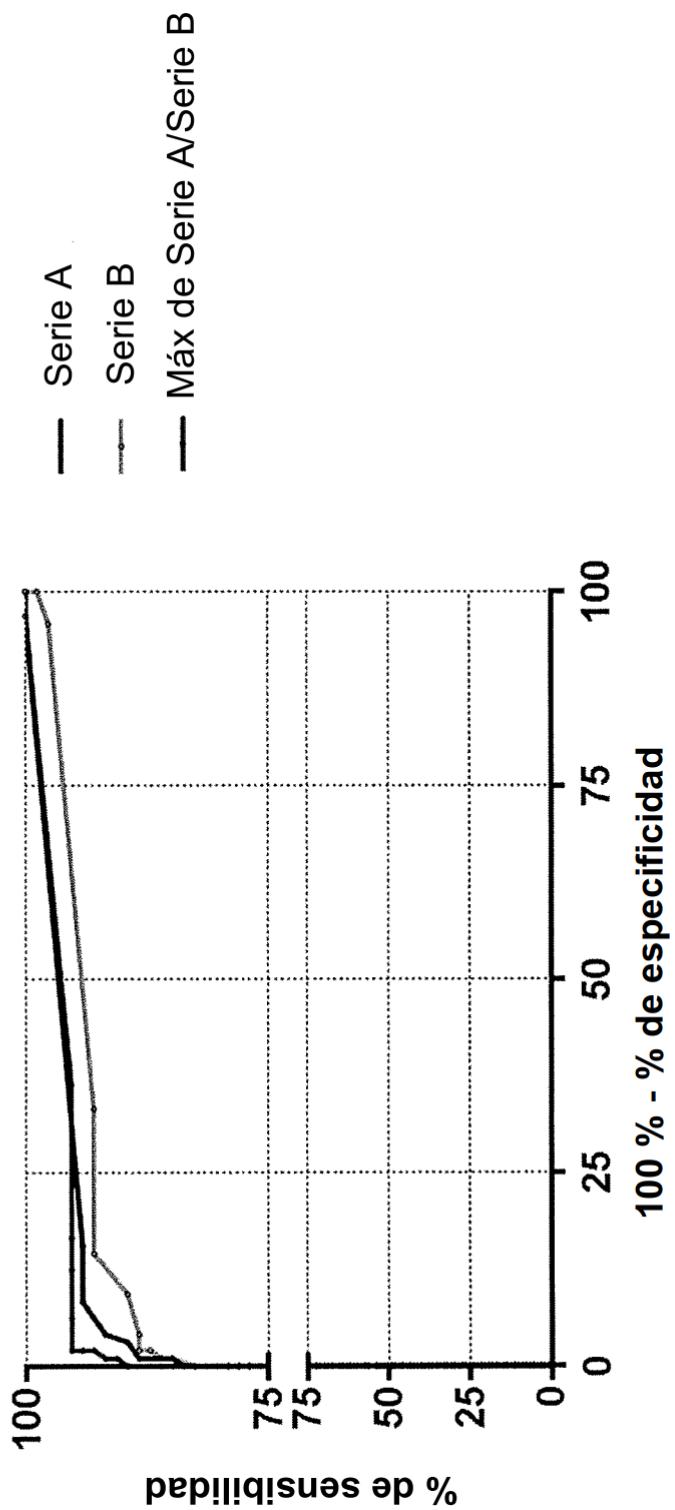
**Fig. 1**

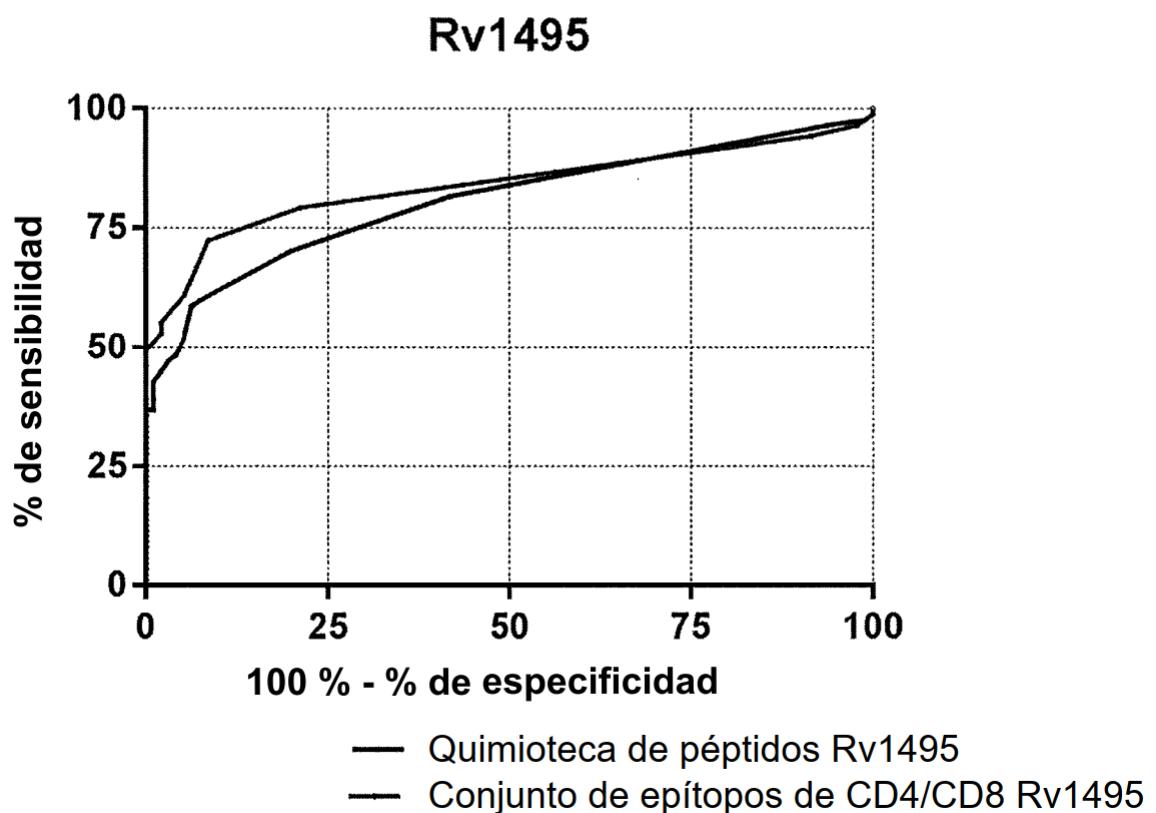
Fig. 2A



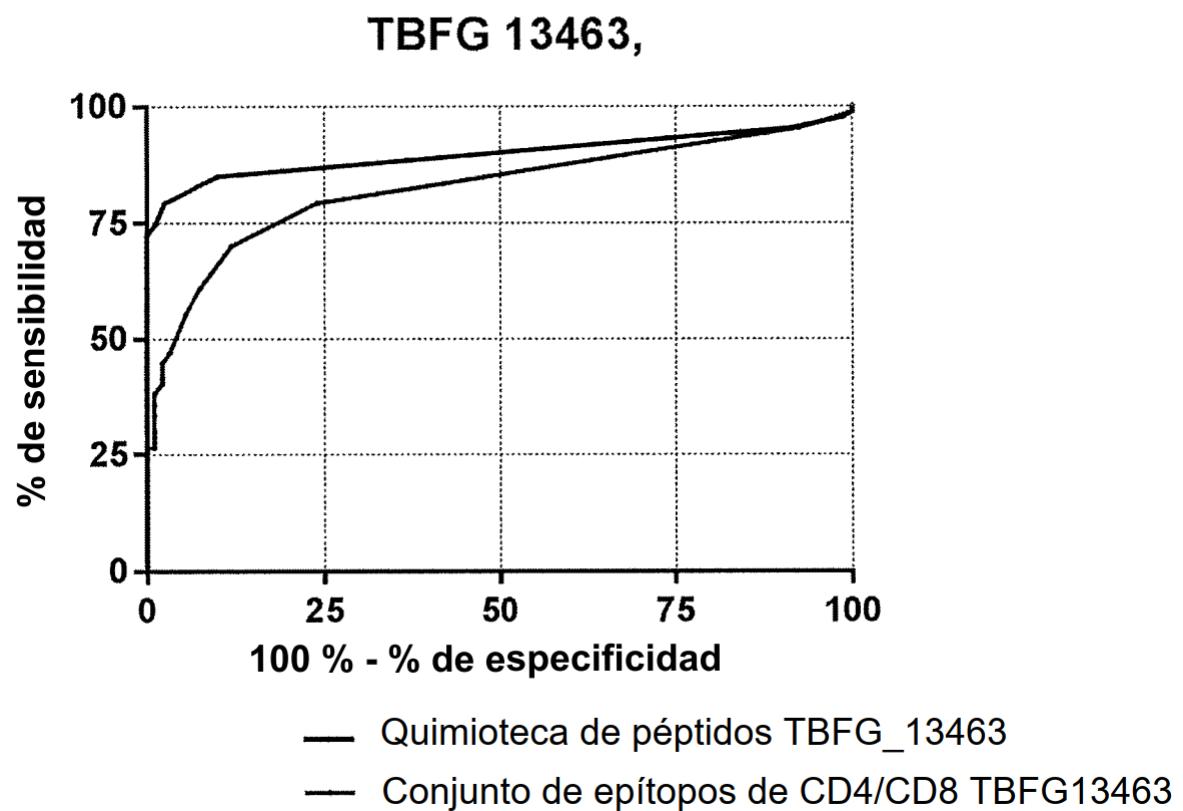
**Fig. 2B**

Valor de corte	Sensibilidad %	Intervalo de confianza del 95 % (IC)	Especificidad %	IC del 95 %	Cociente de verosimilitudes
> -0,5000	100	del 95,85 % al 100,0 %	3,125	del 0,6491 % al 8,862 %	1,032
> 0,5000	95,4	del 88,64 % al 98,73 %	63,54	del 53,09 % al 73,13 %	2,617
> 1,5000	95,4	del 88,64 % al 98,73 %	83,33	del 74,35 % al 90,16 %	5,724
> 2,5000	95,4	del 88,64 % al 98,73 %	87,5	del 79,18 % al 93,37 %	7,632
> 3,5000	95,4	del 88,64 % al 98,73 %	93,75	del 86,89 % al 97,67 %	15,26
> 4,5000	95,4	del 88,64 % al 98,73 %	97,92	del 92,68 % al 99,75 %	45,79
> 6,0000	94,25	del 87,10 % al 98,11 %	97,92	del 92,68 % al 99,75 %	45,24
> 7,5000	93,1	del 85,59 % al 97,43 %	97,92	del 92,68 % al 99,75 %	44,69
> 8,5000	91,95	del 84,12 % al 96,70 %	98,96	del 94,33 % al 99,97 %	88,28
> 9,5000	90,8	del 82,68 % al 95,95 %	98,96	del 94,33 % al 99,97 %	87,17
> 11,00	89,66	del 81,27 % al 95,16 %	100	del 96,23 % al 100,0 %	

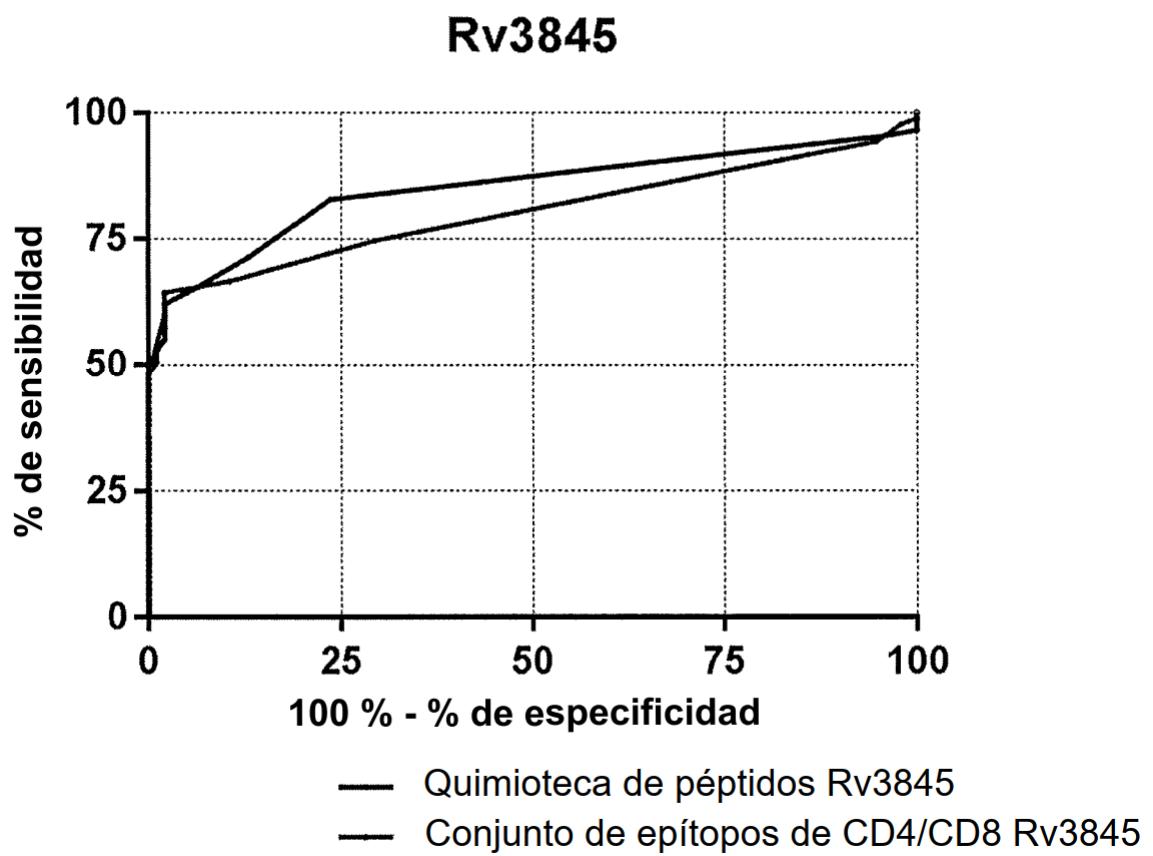
**Fig. 3A**



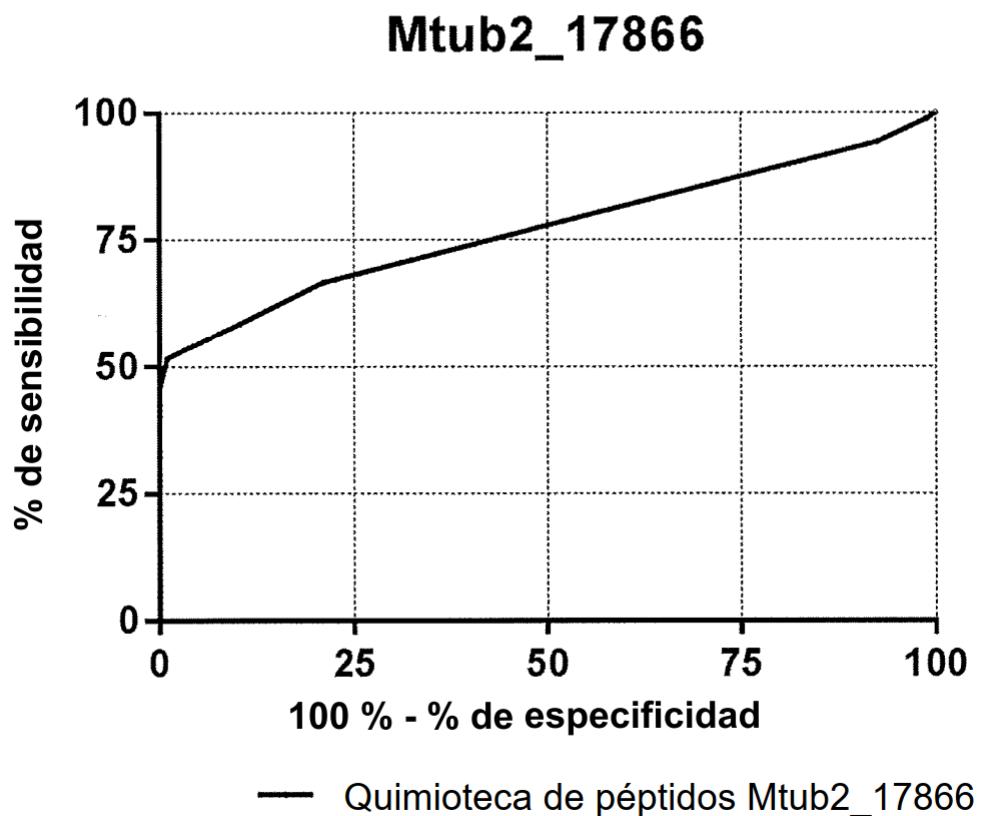
**Fig. 3B**



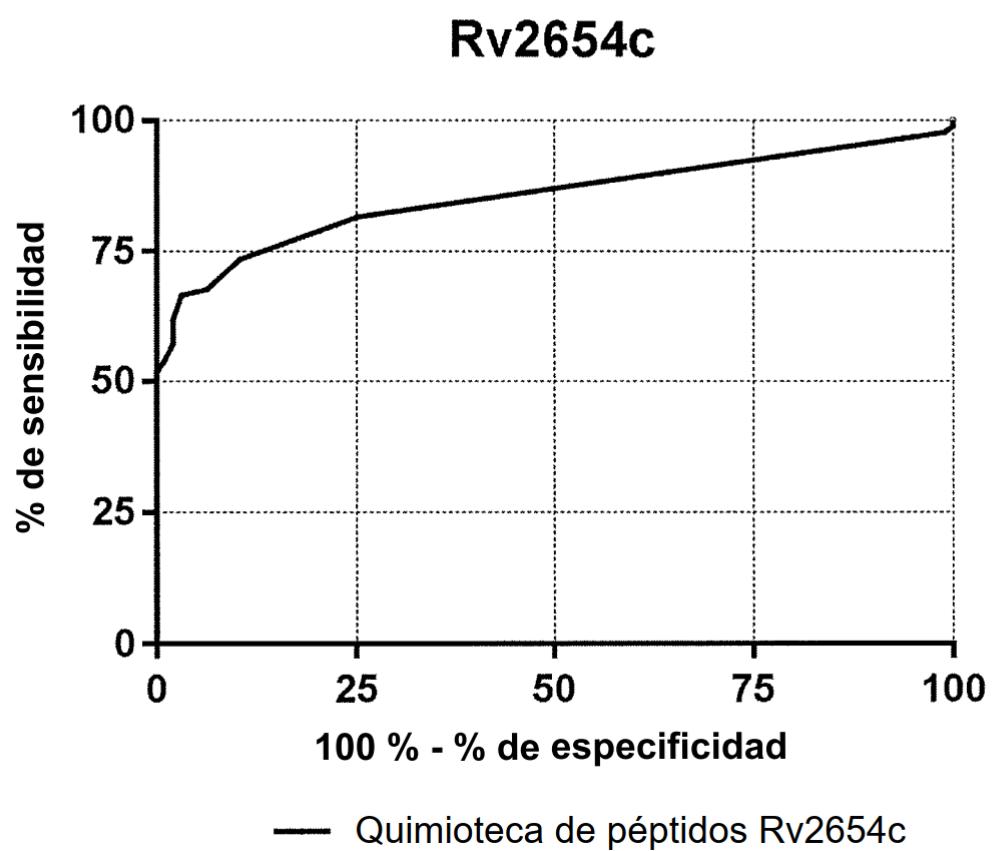
**Fig. 3C**



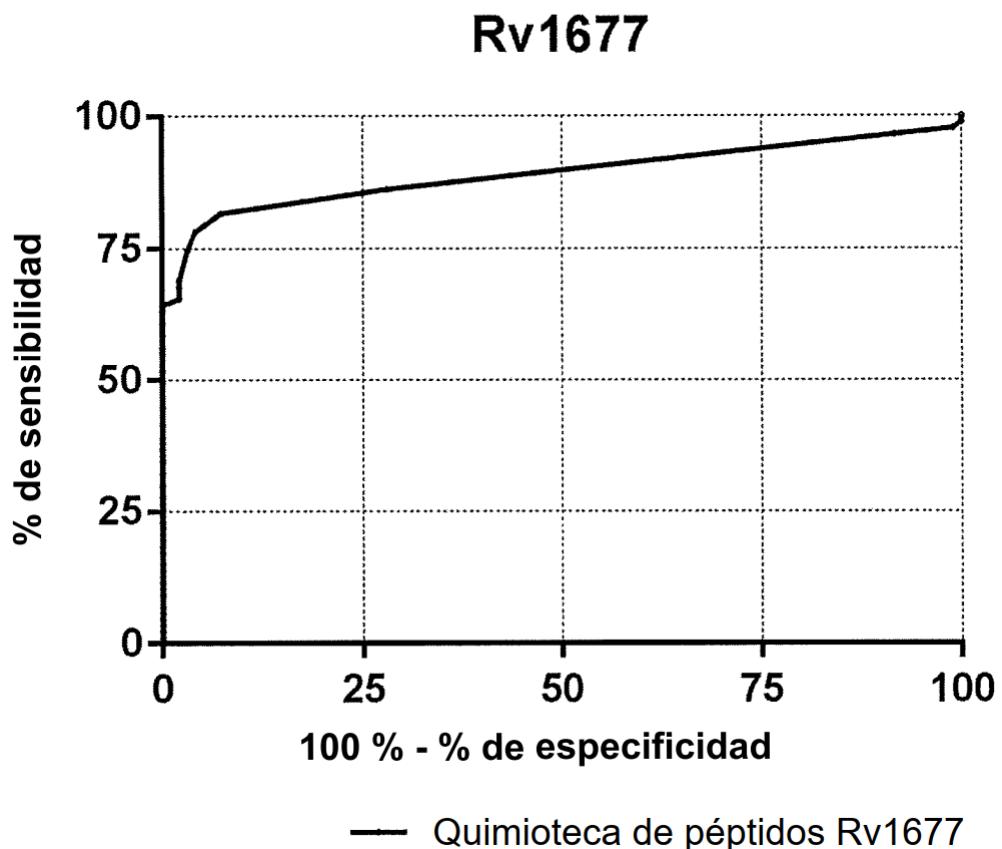
**Fig. 4A**



**Fig. 4B**



**Fig. 4C**



**Fig. 4D**

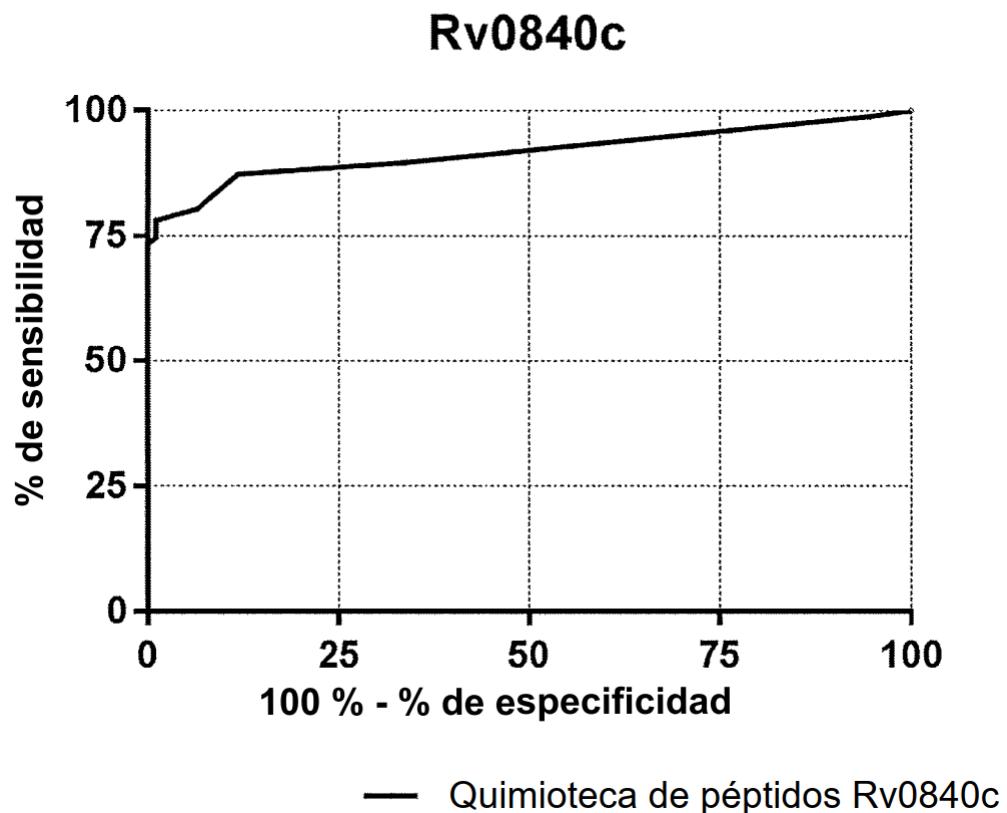
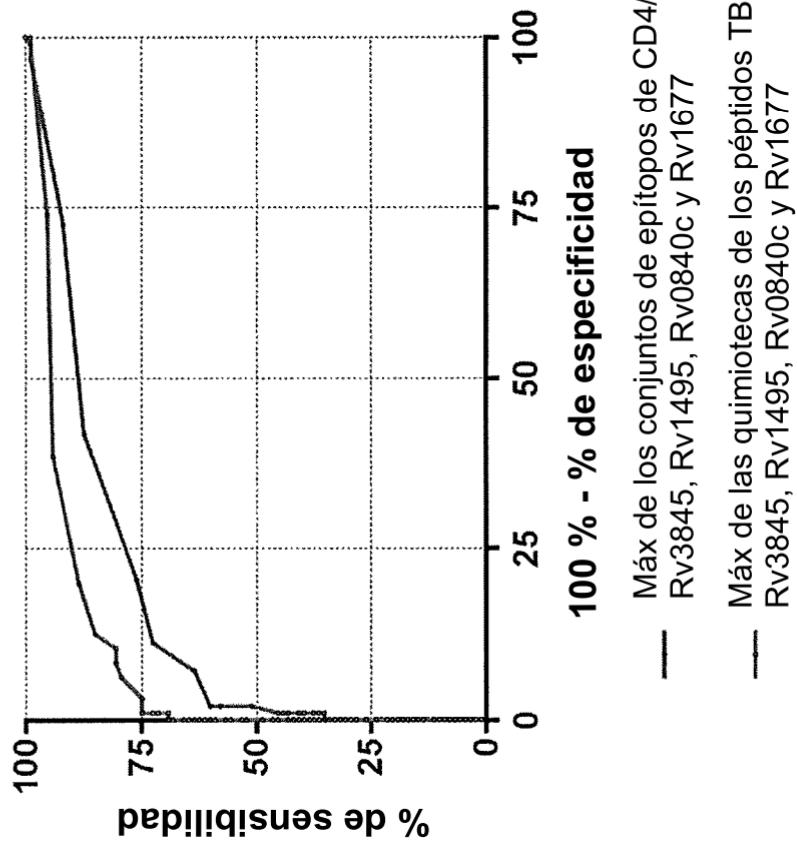
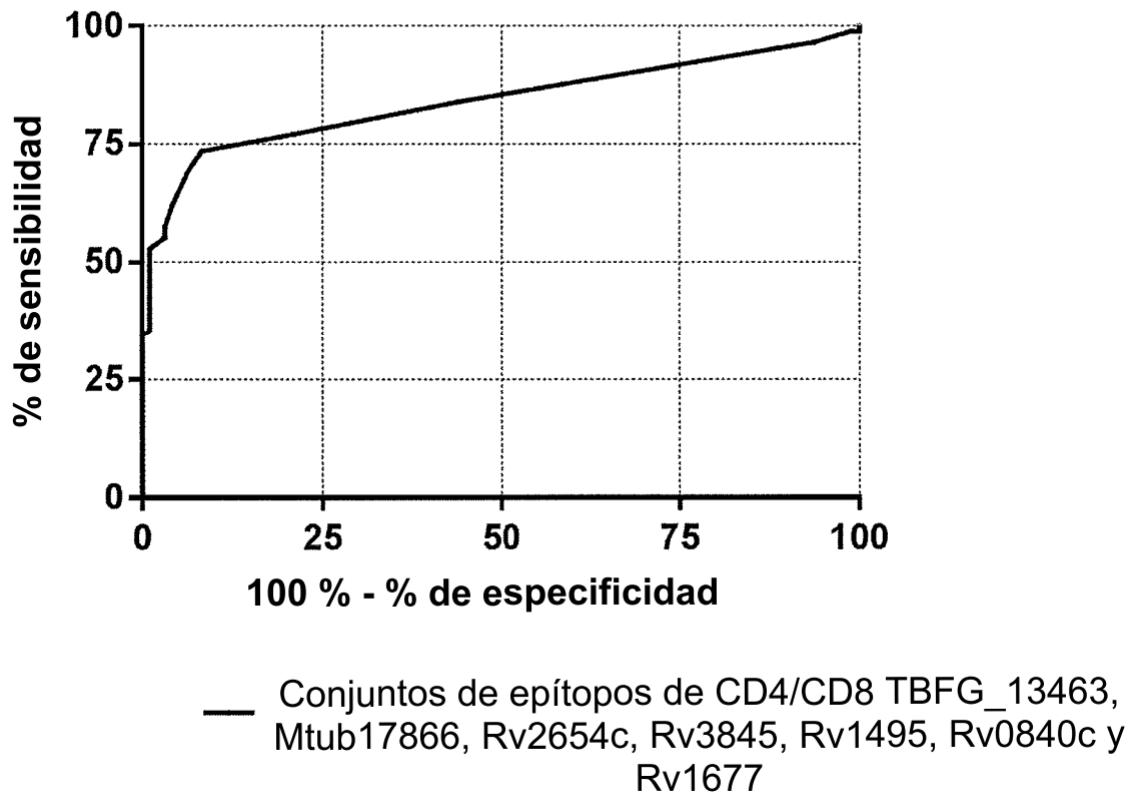
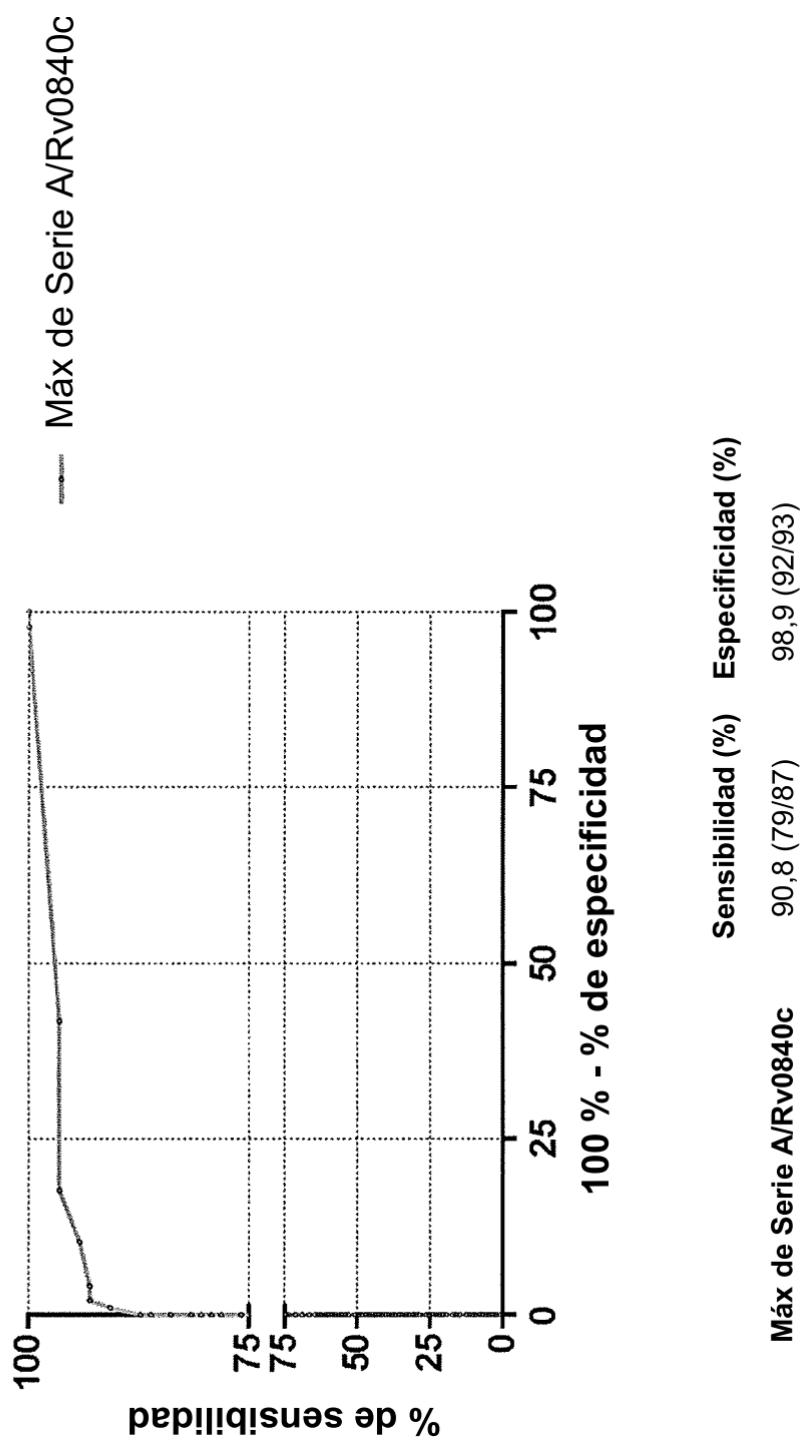


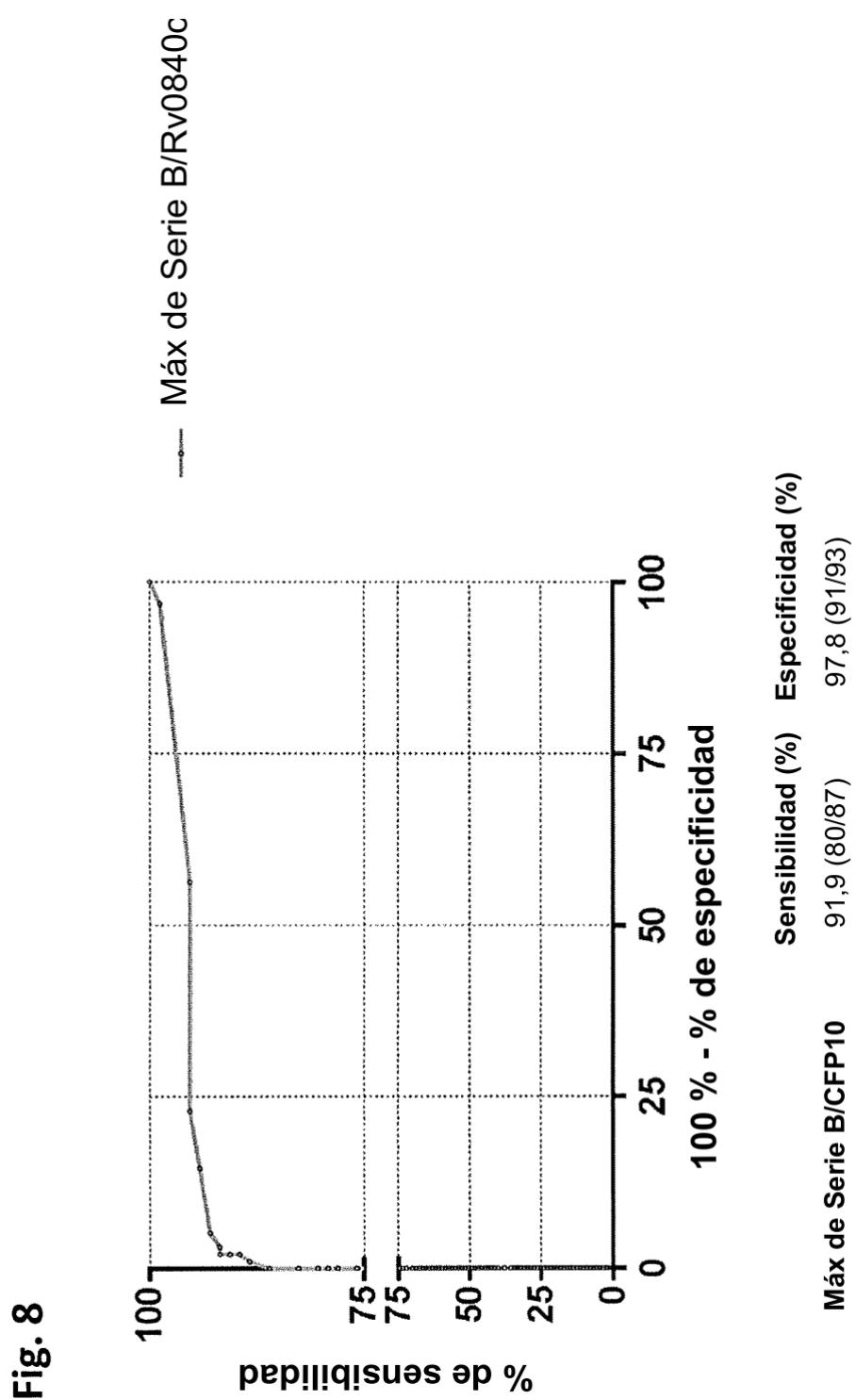
Fig. 5



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 9**

