

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 357 487**

21 Número de solicitud: 200901635

51 Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/325 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **23.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2011**

Fecha de la concesión: **24.02.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **07.03.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
07.03.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
AVDA. SÉNECA 2
28040 MADRID, ES y
ST GEORGE'S UNIVERSITY OF LONDON**

72 Inventor/es:
**CASTELLANOS RIZALDOS, ELENA;
ARANAZ MARTÍN, ALICIA;
MATEOS GARCÍA, ANA;
ÁLVAREZ SÁNCHEZ, JULIO;
BEZOS GARRIDO, JAVIER;
ROMERO MARTÍNEZ, BEATRIZ;
RODRÍGUEZ CAMPOS, SABRINA;
MOYA ÁLVAREZ, NURIA;
LOZANO BARRILERO, FRANCISCO;
JUAN FERRV, LUCÍA 89;
DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, LUCAS;
BULL, TIM JOHN y
LINEDALE, RICHARD**

74 Agente/Representante:
No consta

54 Título: **CEPA DE MYCOBACTERIUM AVIUM SUPE SPECIES PARA TUBERCULOSIS TIPO II Y APLICACIONES**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a una nueva cepa de Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis que ha sufrido una delección de 16,3 Kb por la que carece de genes mce (mammalian cell entry). Así mismo se refiere a un método desarrollado basado en la reacción en cadena de la polimerasa para detectar otras cepas de Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis que carezcan de dichos genes. Además, en la presente invención se refleja la validación de metodologías para el empleo de esta cepa de Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis CECT 7530 en ensayos de invasión in vitro en diferentes líneas celulares de orígenes diversos. Adicionalmente, la presente invención hace mención al desarrollo de métodos para la medición de la viabilidad de Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis en el interior de células eucariotas durante los procesos de invasiones in vitro mediante la estimación del número de copias del gen precursor del ARNr 16S el pre-ARNr 16S.

ES 2 357 487 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* tipo II y aplicaciones.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a la primera y única cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mutante para genes de entrada a células mamíferas (*mammalian cell entry genes*, *mce*). Se trata de un microorganismo que presenta una delección de 16,3 Kpb en su genoma que comprende genes *mce*, miembros de la familia PE/PPE (denominados así debido a las presencia de motivos prolina-ácido glutámico y prolina-prolina-ácido glutámico, respectivamente) y un regulador transcripcional. La cepa objeto de la presente invención fue obtenida de un rebaño de cabras que presentaba una forma paucibacilar de la enfermedad de Johne o paratuberculosis (con una carga bacteriana baja en el interior de los macrófagos). Por lo tanto, la presente solicitud trata de la primera y única cepa de *M. a. paratuberculosis* mutante natural de genes *mce* que puede emplearse como cepa de referencia en ensayos de patogenicidad y virulencia. A su vez, la cepa objeto de la presente invención puede aplicarse en el diseño de nuevos microarrays para estudios de hibridación genómica comparada (HGC) y como sujeto de trabajo en el desarrollo de nuevas vacunas vivas atenuadas.

20 **Estado de la técnica**

En la actualidad se está realizando el estudio de los factores de virulencia de las bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, para así poder entender los mecanismos de interacción patógeno-hospedador durante el transcurso de la infección (Casali, N. *et al.*, 2007, BMC Genomics, 8, 60; Haile, Y. *et al.*, 2002, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 33 (2), 125-132; Gioffre, A. *et al.*, 2005, Microbes. Infect. 7 (3), 325-334; Flesselles, B. *et al.*, 1999, FEMS Microbiol. Lett. 177 (2), 237-242; El-Shazly, S. *et al.*, 2007, Int. J. Tubero. Lung Dis. 11 (6), 676-682; Parker, S. L. *et al.*, 1995, Clin. Diagn. Lab Immunol. 2 (6), 770-775). De todos los factores implicados en este proceso, de especial interés son aquellos grupos de genes denominados *mammalian cell entry genes* (*mce*), cuyos productos de expresión génica (las proteínas Mce) son esenciales para la entrada celular y supervivencia en el interior de los macrófagos.

La importancia de estos genes *mce* se demostró mediante la invasión de células hospedadoras de la línea celular HeLa con una cepa no patogénica de *Escherichia coli* en cuyo genoma se había insertado el gen *mce1A* de *Mycobacterium tuberculosis* (Arruda, S. *et al.*, 1993, Science, 261 (5127), 1454-1457). En la actualidad, todos los esfuerzos se están dirigiendo a la creación de nuevos mutantes *mce* de *M. tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. Estos mutantes han demostrado, a través de diferentes experimentos de invasión *in vitro*, una atenuación en su virulencia e invasividad (Flesselles, B. *et al.*, 1999, FEMS Microbiol. Lett. 177 (2), 237-242). Además, también se han observado diferencias en cuanto a los rasgos anatómo-patológicos entre cepas *mce* mutantes y las cepas salvajes de *M. tuberculosis*, el primero de los cuales originaba la formación de una formación granulomatosa aberrante en ratones, además de una mayor proliferación de la población linfocítica en comparación con la cepa salvaje (Shimono, N. *et al.*, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 100 (26), 15918-15923).

Dentro de las bacterias del complejo *Mycobacterium avium* complex (MAC), entre las que se incluye *Mycobacterium avium* subespecie *avium* (*M. a. avium*), se observó una correlación directa entre la susceptibilidad a determinados antibióticos, la morfología de las colonias y la expresión de diferentes genes *mce*. En el mismo estudio demostraron que los fenotipos más virulentos de *M. a. avium* presentaban una sobre-expresión de los genes *mce* (Cangelosi, G. A. *et al.*, 2006, Antimicrob. Agents Chemother. 50 (2), 461-468).

Dentro de los miembros de MAC se encuentra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*), agente etiológico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis. Esta enfermedad se caracteriza por estar ampliamente distribuida tanto a nivel geográfico como de hospedador, aunque se encuentra afectando principalmente a animales de abasto. Además, diversos estudios han descrito que *M. a. paratuberculosis* es un posible agente contribuyente en la enfermedad de Crohn en el hombre (Harris, N. B. *et al.*, 2001, Veterinary Medicine. Clin. Microbiol. Rev., 14 (3), 489-512). Por todo esto, la correcta caracterización molecular de *M. a. paratuberculosis* es de crucial importancia para poder implementar las medidas adecuadas para su erradicación.

En este microorganismo, estos genes *mce* se encuentran repartidos a lo largo de su genoma, formando operones o grupos de seis genes *mce* y dos genes *yrbE*, cuyas funciones son la producción de proteínas de unión a sustratos y permeasas para el transporte a través de la membrana celular respectivamente (Casali, N. *et al.*, 2007, BMC Genomics, 8, 60).

Por otra parte, *M. a. paratuberculosis* se ha dividido en tres grupos ampliamente diferenciados denominados I (previamente citado como grupo sheep u ovino), II (denominado con anterioridad grupo cattle ó bovino) y III (intermedio), los cuales se han subdividido mediante el empleo de diversas técnicas moleculares (de Juan, L. *et al.*, 2006, Vet. Microbiol. 115 (1-3), 102-110; Dohmann, K. *et al.*, 2003, J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5215-5223; Stevenson, K. *et al.*, 2002, J. Clin. Microbiol., 43 (8), 3704-3712; Castellanos, E. *et al.*, 2007, J. Clin. Microbiol. 45 (10), 3439-3442; Castellanos, E. *et al.*, 2008, Proceedings del 9º Coloquio Internacional de Paratuberculosis, 6-8; Griffiths, T. *et al.*, 2008, J. Clin. Microbiol. 46 (4), 1207-1212) así como requerimientos nutricionales a la hora de su cultivo (de Juan, L. *et al.*, 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72 (9), 5927-5932).

En la actualidad existen tan sólo dos cepas de *M. a. paratuberculosis* de tipo II disponibles para los laboratorios que realizan diferentes estudios de invasión y patogenicidad *in vivo* e *in vitro*, entre las cuales se encuentra la única cepa de referencia secuenciada *M. a. paratuberculosis* K-10, y la cepa vacunal *M. a. paratuberculosis* 316F. Sin embargo, cepas de *M. a. paratuberculosis* que sean *mce* mutantes naturales (genes con una implicación en los mecanismos de entrada del microorganismo en la célula hospedadora), no están a disposición de ningún laboratorio puesto que nadie ha obtenido hasta la presente fecha este tipo de mutantes *mce*.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere en primer lugar a la obtención, conservación y uso de una cepa de *M. a. paratuberculosis mce* mutante natural como material de referencia para validar, estandarizar y llevar a cabo ensayos de virulencia y patogenicidad. La nueva cepa ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Edificio de Investigación, 46100 Burjassot (Valencia) donde le ha sido asignado el número de depósito provisional 7530.

Con el término “cepa *mce* mutante natural” en la presente invención se hace referencia a todas aquellas cepas de *M. a. paratuberculosis* en cuyo genoma se ha producido una delección de 16,3 Kb sin intervención alguna de la ingeniería genética. Esta delección está constituida por 19 marcos de lectura abiertos (ORF) consecutivos (MAP0108-MAP0126) entre los cuales se encuentra comprendido el operón *mce7* (MAP0108-MAP0113), genes de las familias PE/PPE (de la presencia de motivos prolina-ácido glutámico y prolina-prolina-ácido glutámico respectivamente) (MAP0122-MAP0124) y un regulador transcripcional (MAP0116) entre otros.

La cepa de *M. a. paratuberculosis* CECT 7530, objeto de la presente invención, fue obtenida de un rebaño de cabras de la raza de Guadarrama que presentaba una forma paucibacilar de la enfermedad de Johne o paratuberculosis (caracterizada por presentar una carga bacteriana baja en el interior de los macrófagos). En este rebaño únicamente se aisló la cepa de *M. a. paratuberculosis mce* mutante natural objeto de la patente (infección monoclonal), por lo que el rebaño infectado a su vez presentaba una protección natural frente a la enfermedad originada por otras cepas de *M. a. paratuberculosis*. Sin embargo, esta cepa delecionada en genes de virulencia mantenía su capacidad inmunógena en el citado rebaño. *M. a. paratuberculosis* se caracteriza por ser un patógeno intracelular y por lo tanto, el desarrollo de vacunas vivas atenuadas (no registradas actualmente en el mercado) sería importante para ayudar al control y la erradicación de esta enfermedad.

Por lo tanto, la presente solicitud trata de la primera y única cepa de *M. a. paratuberculosis* mutante natural de genes *mce* que puede emplearse como cepa de referencia en ensayos de patogenicidad y virulencia.

La cepa de *M. a. paratuberculosis mce* mutante natural fue caracterizada mediante la técnica de microarray. Dentro del terreno de la caracterización molecular en *M. a. paratuberculosis*, el uso de microarrays está siendo en la actualidad una técnica de amplia difusión dada la gran cantidad de información que proporciona, para la cual solo es necesario el empleo de una pequeña cantidad de ADN de alta calidad (Semret, M. *et al.*, 2005, J. Clin. Microbiol. 43 (8), 3704-3712; Paustian, M. L. *et al.*, 2008, BMC Genomics 9, 135; Wu, C. W. *et al.*, 2006, J. Bacteriol. 188 (2), 711-723). Esta técnica de microarray se basa en la creación de una micromatriz tapizada con el ADN de los genes del microorganismo a estudiar sobre un portaobjetos. Luego las placas se hibridan con ADN complementario de la muestra problema, la cual se compara con ADN complementario de la cepa de referencia (en este caso *M. a. paratuberculosis* K-10, una cepa tipo II, con número de acceso GeneBank AE016958; número de secuencia referencia NC_002944) marcada cada una de ellas (muestra y control) con un cromógeno cada una (Cy3 y Cy5) y, posteriormente, mediante el uso de un Software específico (Imagen 7. 5, BlueFuse v. 3. 5 y Gene Spring v.7. 2) se obtiene un perfil genómico de la muestra analizada. De esta forma podemos realizar estudios comparativos entre las distintas cepas de *M. a. paratuberculosis*, es decir, la realización de un estudio completo de HGC.

Para realizar la confirmación de los hallazgos obtenidos con el microarray se diseñó una reacción de amplificación por PCR. La citada PCR estaba dirigida a los genes flanqueantes (es decir, a los genes MAP0107 y MAP1027) de la región delecionada (MAP0108-MAP0126). En el caso de la no presencia de la delección en el genoma de las cepas de *M. a. paratuberculosis*, el fragmento comprendido entre ambos genes era demasiado grande (16,3 Kb) para ser amplificado, por lo que el resultado de la PCR fue negativo. Sólo cuando la delección había tenido lugar, el fragmento se amplificó mediante PCR, dando lugar a un producto de 881 pb.

Con el objeto de estandarizar esta metodología se realizó un análisis exhaustivo en un total de 99 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos en las diferentes áreas geográficas de España, Escocia y Dinamarca, representando los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* (I, II y III), de diferentes hospedadores animales (caprina, vacuno, ovino) y obtenidos durante un período de siete años (2000-2007), y entre las cuales se incluyeron dos de las cepas analizadas a su vez por microarray. El análisis por PCR reveló un total de 53 cepas de *M. a. paratuberculosis* cuyo genoma presentaba esta delección. De las anteriores, 49 cepas pertenecían al mismo rebaño y el resto a rebaños que estaban geográficamente próximos y entre los cuales había existido intercambio de animales en el pasado. El tamaño del producto de PCR para estas 53 cepas fue el esperado, es decir de 881 pb, el cual se evidenció en un gel de electroforesis al 2%. Para llevar a cabo la validación de esta técnica de PCR se realizó la secuenciación de los productos de PCR (de 881 pb) obtenidos en tres de las cepas de *M. a. paratuberculosis* en las que la delección estaba presente (CECT 7530, MI05/00483-2 y MI05/00484-2) y para cada una de las hebras de ADN por separado [tanto de la hebra (+)

como de la hebra (-)]. La posterior secuenciación confirmó que el producto amplificado se correspondía con parte de la secuencia de los genes flanqueantes (es decir, MAP0107 y MAP0127) a la región deletada (MAP0108-MAP0126).

5

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Morfología estrellada de las colonias de *M. a. paratuberculosis* CECT 7530.

10 Figura 2. Imagen obtenida con el Software Gene Spring v.7. 2, y posterior a la normalización de los datos obtenidos en primera instancia con el microarray. En la imagen se observan reflejados en gris claro cada uno de los genes comunes entre la cepa *M. a. paratuberculosis* CECT 7530 y *M. a. paratuberculosis* K-10. Los puntos reflejados en gris oscuro representan todos aquellos genes presentes en *M. a. paratuberculosis* K-10 pero ausentes en la cepa CECT 7530.

15

Figura 3. En el dendrograma se observa la comparación entre cepas de *M. a. paratuberculosis* tipos I, II y III para esa región específica del genoma (delimitada por los genes MAP0108 y MAP0126). Representados en gris oscuro están todos aquellos genes que han sido deletados en la cepa CECT 7530 pero, por el contrario, están presentes en el resto de cepas de *M. a. paratuberculosis* sometidas a este análisis de hibridación genómica comparada por microarray.

20

Modo de realización de la invención

25 *Obtención y caracterización de la cepa de M. a. paratuberculosis CECT 7530*

La cepa de *M. a. paratuberculosis* CECT 7530 fue obtenida inicialmente de un homogenizado de válvula ileoceal, linfonodos mesentéricos e intestino de una cabra de la raza autóctona de Guadarrama, localizada en la Comunidad de Madrid. La muestra se cultivó en medios específicos para el aislamiento de este microorganismo y mediante métodos previamente descritos (de Juan, L. *et al.*, 2006, Vet. Microbiol. 115 (1-3), 102-110) y se incubó a 37°C en una estufa hasta obtener un crecimiento visible (Figura 1).

30

La mencionada cepa fue inicialmente tipificada como cepa tipo II por la PCR descrita por Desmond Collins (Collins, D. M. *et al.*, 2002, J. Clin. Microbiol. 40 (12), 4760-4762) y otras técnicas moleculares rápidas anteriormente citadas (Castellanos, E. *et al.*, 2008, Proceedings del 9º Coloquio Internacional de Paratuberculosis, 6-8). Para el estudio del genoma completo de esta cepa de *M. a. paratuberculosis* CECT 7530 se empleó el microarray MAPAC, desarrollado por el Grupo de Microarray (BµG@S) de la Universidad de Saint George's de Londres, Reino Unido.

35

En el estudio de HGC, se incluyeron cepas de *M. a. paratuberculosis* representantes del tipo I y III y la cepa objeto de la solicitud de patente (CECT 7530).

40

En cuanto al microarray (MAPAC) que se utilizó en el estudio, se trata de un microarray de oligonucleótidos de 60-mer de longitud, en los que están representados los genomas tanto de *M. a. paratuberculosis* K-10 como de *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis* 104. El presente microarray comprende 4132 oligonucleótidos dirigidos a genes compartidos entre los genomas de ambos microorganismos, 218 genes específicos para *M. a. paratuberculosis* K-10, 952 específicos para *M. a. hominissuis* 104, 18 genes únicos para *M. a. paratuberculosis* tipos I y III, 19 secuencias MIRU (mycobacterial interspersed repetitive units) en *M. a. paratuberculosis*, 58 regiones intergénicas en *M. a. paratuberculosis* K-10 y 7 genes transportados en el plásmido pVT2 de *M. a. hominissuis* 104. La totalidad de oligonucleótidos que conformaron el microarray fueron sintetizados (Operon, Biotechnologies, Germany), suministrados en placas de 384 pocillos y resuspendidos a una concentración de 50 mM en 50% DMSO. A continuación los oligonucleótidos fueron dispuestos en una micromatriz mediante el empleo del robot MicroGrid II (BioRobotics) y posteriormente post-procesados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para los procesos de rehidratación y fijación de los mismos. El diseño de este microarray se encuentra disponible en BµG@Sbase (Número de acceso A-BUGS-35; <http://bugs.sgul.ac.uk/A-BUGS-35>) y también en ArrayExpress (Número de acceso: A-BUGS-35; <http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>).

50

55

El protocolo de hibridación del ADN de la cepas de *M. a. paratuberculosis* CECT 7530 y la de referencia *M. a. paratuberculosis* K-10 fue el mismo que el descrito por Dorrell *et al.* (Dorrell, N. *et al.* 2001, Genome Res. 11, 1706-1715). A continuación, y según lo descrito previamente (Castellanos, E. *et al.*, 2009, Appl. Environ. Microbiol. 75 (3), 676-686) los microarrays se escanearon (Affymetrix 428) y los datos de intensidad de la señal se extrajeron con el programa BlueFuse para Microarrays v 3.5 (BlueGenome, Cambridge UK). Finalmente, el análisis de datos y la normalización de los mismos se realizó con el programa GeneSpring 7.3.1 (Agilent Technologies) y Eisen Cluster (Eisen, J. A., *et al.*, 1998, Genome Res. 8 (3), 163-167).

65

Los resultados del microarray para la cepa CECT 7530 reflejaron una delección importante con respecto a la cepa referencia de *M. a. paratuberculosis* K-10. Esta delección implica un conjunto de 19 ORF consecutivos comprendidos

entre los genes MAP0108 y MAP0126, ambos inclusive, entre los que se encuentra enmarcado el operón de virulencia *mce7*, además de genes de la familia PE/PPE, y reguladores transcripcionales entre otros (Tabla 1), (Figuras 2 y 3).

TABLA 1

Lista de los ORFs deletados en M. a. paratuberculosis CECT 7530 en comparación con el genoma de M. a. paratuberculosis K-10 tras el análisis de los datos obtenidos mediante el estudio de hibridación genómica comparada por microarray

ORF	Comienzo del ORF	Final del ORF	Función/posible función
MAP0108	117766	119289	<i>mce7A</i>
MAP0109	119286	120365	<i>mce7B</i>
MAP0110	120358	121404	<i>mce7C</i>
MAP0111	121401	122516	<i>mce7D</i>
MAP0112	122519	123751	<i>mce7E</i>
MAP0113	123748	124998	<i>mce7F</i>
MAP0114	125030	125626	Mas7-1 A (proteína asociada <i>mce</i>)
MAP0115	125640	126425	Precursor de la deshidrogenasa <i>xoxF</i>
MAP0116	126473	127819	Regulador transcripcional Rv1255c/MT1294
MAP0117	128027	128251	Función desconocida
MAP0118	128239	128607	Función desconocida
MAP0119c	128943	129731	Función desconocida
MAP0120c	129728	130150	Función desconocida
MAP0121	130222	130782	Función desconocida
MAP0122	130795	131100	Proteína hipotética de la familia PE
MAP0123	131103	132008	Proteína hipotética de la familia PPE
MAP0124	132086	132796	Proteína de la familia PPE
MAP0125c	132818	133513	Metiltransferasa
MAP0126	133655	134077	Proteína hipotética Rv1558/MT1609

La confirmación de la delección fue realizada mediante PCR dirigida a los genes flanqueantes de la región deletada en la cepa de *M. a. paratuberculosis* CECT 7530, que son los genes MAP0107 y MAP0127. Los oligonucleótidos desarrollados para este propósito (SEQ ID no. 1 y 2) fueron diseñados mediante el empleo del software Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Además, como doble control de calidad, se realizó otra PCR dirigida al gen F57 (Poupart, P. *et al*, 1993, J. Clin. Microbiol. 31 (6), 1601-1605) (SEQ ID no. 3 y 4) para confirmar la presencia de ADN de *M. a. paratuberculosis*. Con esta otra PCR se pudo así confirmar que la ausencia de amplificación por PCR se debía al gran tamaño del fragmento a amplificar (16,3 Kb) en el caso de la no existencia de la delección en este fragmento del genoma y no a la insuficiente calidad y cantidad de ADN de *M. a. paratuberculosis* (Tabla 2).

TABLA 2

Oligonucleótidos específicos diseñados para confirmar la delección (MAP0108-MAP0126) y los empleados para la amplificación del gen F57. La posición de los mismos está reflejada con respecto a la cepa *M. a. paratuberculosis* K-10, cepa de referencia secuenciada

ORFs	Secuencia de primers (5'-3')	SEQ ID no.	Tamaño producto PCR (bp)*	Posición en el genoma de <i>Map</i> K-10 (bp)
MAP0107-	AATGCGTGGTATTCGTCTGG	1		117524-
MAP0127	(F)	2	881	134946
	CTTGAACGGCAGCACCAT (R)			
	CCCGATAGCTTTCCTCTCCT	3		
F57	(F)	4	609	887329-
	GATCTCAGACAGTGGCAGGTG			886721
	(R)			

* En el caso de que la cepa analizada presente la delección del fragmento comprendido entre los genes MAP0108 y MAP0126, el tamaño de la PCR es de 881 pb. Sin embargo, en el caso de la presencia de este fragmento (16,3 Kb), al tratarse de un tamaño demasiado grande para amplificación por PCR no se obtiene un producto en esta reacción de amplificación.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l, los cuales contenían 5 μ l de la muestra de ADN, 1x Standard Reaction Buffer con 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs (Biotools, B&M Labs, S.A, Madrid), oligonucleótidos F (SEQ ID no.1 y 3) y R (SEQ ID no.2 y 4) (3 μ M), 10% de DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) y 2.5 U de Biotools DNA Taq polymerase (Biotools, Spain). Las condiciones de PCR fueron: un paso único de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos y después 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 45 segundos, y extensión a 72°C durante 1 minuto 30 segundos, con un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 minutos.

En el caso de la presencia del operón *mce*, el producto de PCR era demasiado grande para poder ser amplificado (16,3 Kb). Por esto, en el caso de la cepa *M. a. paratuberculosis* CECT 7530 se obtuvo un producto de PCR de 881 pb visible en un gel de agarosa al 2%. Tras la puesta a punto de la técnica de PCR se sometieron al análisis por PCR un total de 99 cepas de *M. a. paratuberculosis*, aislados de diferentes hospedadores, regiones de España, Dinamarca y Escocia, obtenidos en un período de tiempo de siete años (2000-2007) y representantes de los tipos I, II y III. Los resultados de PCR, revelaron la presencia de esta delección (MAP0108-MAP0126) en un total de 53 aislados de *M. a. paratuberculosis*, 49 de los cuales fueron obtenidos del mismo rebaño que *M. a. paratuberculosis* CECT 7530 y el resto de rebaños localizados en áreas geográficas cercanas, los cuales habían compartido intercambio de animales previamente.

A continuación, se seleccionaron los productos de PCR (881 pb) de las cepas CECT 7530, MI05/00483-2 y MI05/00484-2 obtenidos con los oligonucleótidos (SEQ ID no. 1 y SEQ ID no. 2) dirigidos a los genes MAP0107 y MAP0127. Los citados productos de la amplificación por PCR fueron purificados mediante el empleo del kit de purificación QIAquick PCR purification kit (Qiagen, GmbH), y secuenciados en un secuenciador de ADN ABI Prism 3730 (Applied Biosystems) (Servicio de secuenciación, CIB, Madrid, España). Las secuencias de ambas hebras de ADN [hebra (+) y hebra (-)] fueron a continuación alineadas mediante el empleo de Biological Sequence Alignment Editor Software y analizadas con Artemis Software (www.sanger.ac.uk/Software/Artemis) (Rutherford, K. *et al.*, 2000, Bioinformatics, 16 (10), 944-945) y con la herramienta disponible en GenBank de Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El resultado del análisis de las secuencias confirmó que el producto de PCR amplificado correspondía únicamente con las secuencias de los genes flanqueantes (MAP0107 y MAP0127), y no la secuencia de los genes comprendidos en la delección (MAP108 al MAP0126).

ES 2 357 487 B1

Las secuencias de las tres cepas de *M. a. paratuberculosis mce* mutantes naturales secuenciadas (CECT 7530, MI05/00483-2 y MI05/00484-2) están caracterizadas por SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente. Cabe puntualizar que las secuencias reflejadas en la presente invención se corresponden con la parte interpretable de los cromatogramas de las secuencias obtenidas tras la secuenciación de los productos de PCR resultantes de la amplificación mediante PCR del fragmento de 881 pb, correspondiente a las secuencias de los genes flanqueantes (MAP0107 y MAP0127) a la región delecionada (MAP0108-MAP0126).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis de tipo II mutante para genes de entrada celular y virulencia: *mce* (MAP0108-MAP0113) y PE/PPE (MAP0122-MAP0124).
- 10 2. Uso de la cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* CECT 7530 en ensayos de invasión en líneas celulares como referencia para estudios de invasión y patogenicidad *in vivo* e *in vitro*.
3. Uso de la cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* CECT 7530 en el diseño de nuevos microarrays para su aplicación en estudios de hibridación genómica comparada (HGC).
- 15 4. Uso de la cepa de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* CECT 7530 como sujeto de trabajo para la obtención de nuevas cepas vacunales vivas atenuadas para la enfermedad de Johne o paratuberculosis.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

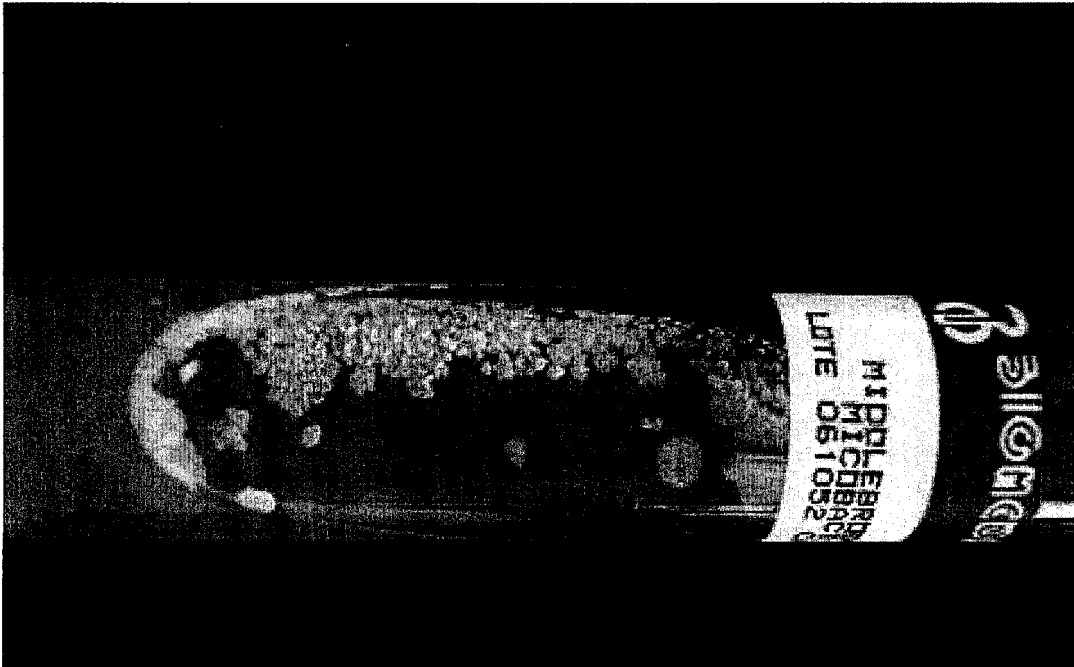


Fig. 2

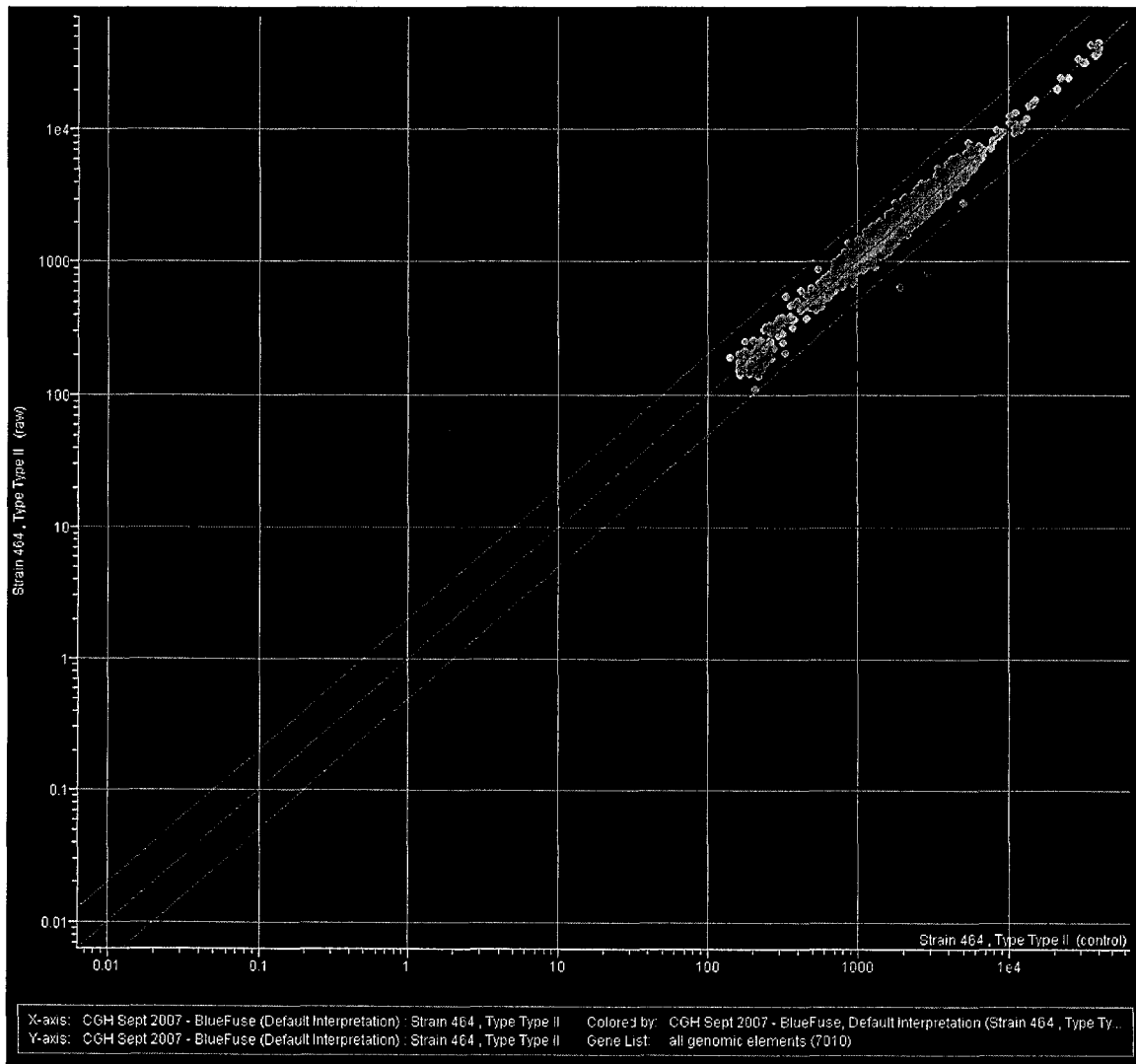
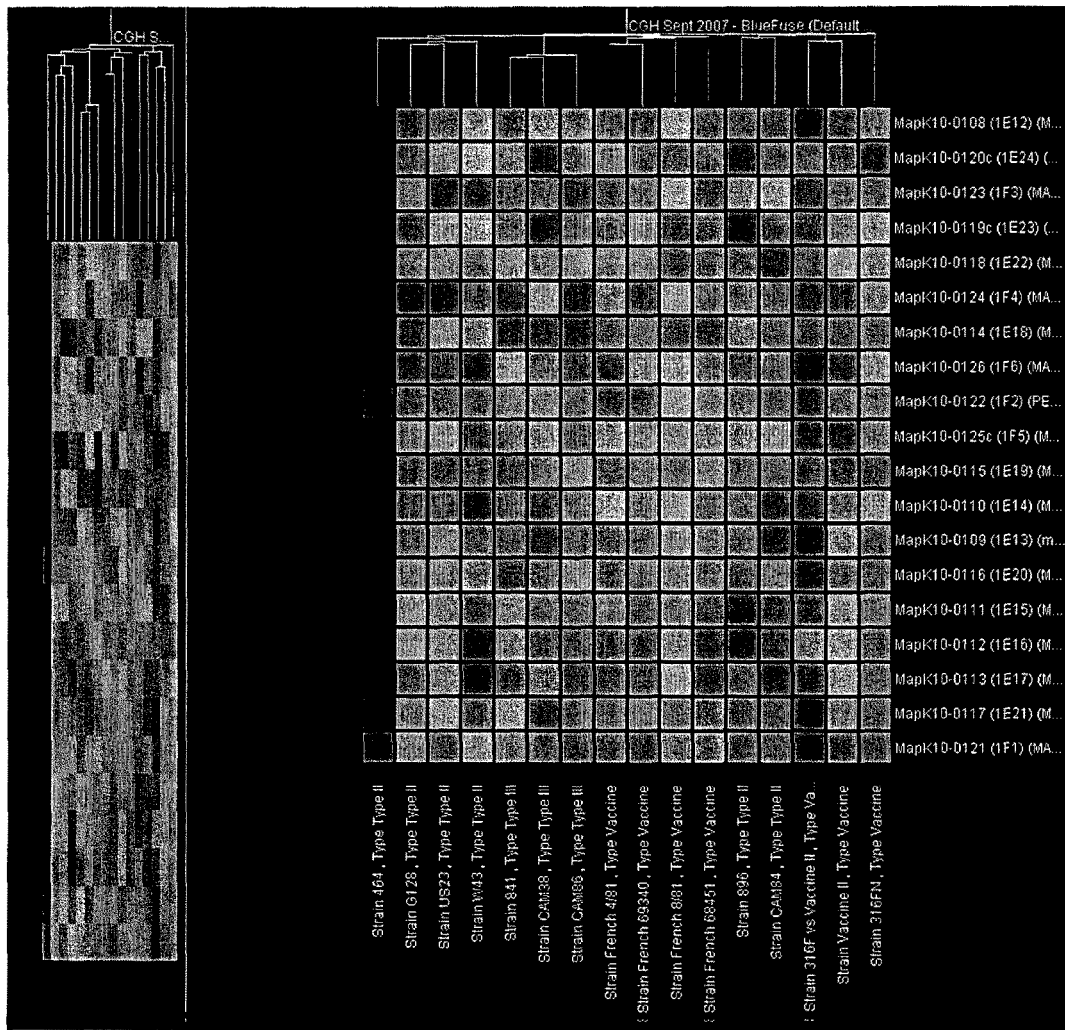


Fig. 3



LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad Complutense de Madrid
- 5 <120> Cepa de *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* tipo II y aplicaciones.
- <160> 7
- <210> 1
- <211> 20
- 10 <212> ADN
- <213> *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis*
- <400> 1
- 15 aatgcgtggt attcgtctgg
 20
- 20 <210> 2
- <211> 18
- <212> ADN
- 25 <213> *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis*
- <400> 2
- 30 cttgaacggc agcaccat
 18
- <210> 3
- 35 <211> 20
- <212> ADN
- <213> *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis*
- 40 <400> 3
- cccgatagct ttcctctcct
 20
- 45 <210> 4
- <211> 21
- 50 <212> ADN
- <213> *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis*
- <400> 4
- 55 gatctcagac agtggcaggt g
 21
- 60 <210> 5
- <211> 690
- <212> ADN
- 65 <213> *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* CECT 7530

ES 2 357 487 B1

<400> 5

5 gaggggtgtgg gagtagccgc cgggcatgcg atgcgggcca gcatcacogt cgtgatcatg
60 gtcaacatgt tgctcacat ggcggtgtgg agcatcgacg cgggcgcgag attcgggtggc
120 tgaatggcga attcgttaga cttcgacggc cgcggcccca cggaccacca gctgctggcc
180 ctgggggcca cgggtgctgcc cgctcgttg gtgggtttcc tggtggaact tccgctgctg
10 240 ctggggatcg cgatcgcttc ggaogccccg gttctcgcog gcctgatcgc tgcgatcgtc
300 gggggcatcg tcggcggatg gctcggggga tcgccgctac aggtcagcgg acccgcggcc
360 gggctcaccg tcgtggtggc cgacgtggtg gccgaattcg gctgggggtg aacctgtttc
420 atcacctcgc tcgcgggagt cctgcaggtc ttggtgggat tcagcaggat cggccgcgcc
15 480 gccctggcca tctcggcctg cgtggtgcac gccatgctgg ccggtatcgg catcacgatc
540 gccctgcagc aggtgcacgt gctggtgggc gggatcatca agagttcggc ctggagcaat
600 gtcaccggcc tgccgcgca gattctcggg gcgcaccgcc cgggactggt gttgggcctg
660 ctggtgatcg cgatcctggt ggcctggcgc
20 690

<210> 6

25 <211> 688

<212> ADN

<213> *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* MI05/00483-2

30

<400> 6

35 ggggtgtggga gtagccgccc ggcattcgat gcgggcccagc atcacctcgc tgatcatggt
60 caacatggtg ctcaccatgg cgttgtggag catcgacgcg ggccgcgagat tcggtggctg
120 aatggcgaat tcgtagact tcgacggccg cggccccacc gaccaccagc tgctggccct
180 gggggcgacg gtgctgcccg cctcgttggt gggtttcctg gtggcacttc cgtgctcgtc
40 240 ggggatcgcg atcgttccg acgccccggt tctcgcggc ctgatcgcgt cgatcgtcgg
300 gggcatcgtc ggcggatggc tcgggggatc gccgctacag gtcagcggac ccgcccggg
360 gctcaccgtc gtggtggccg acgtggtagc cgaattcggc tgggggtgaa cctgtttcat
420 caccgtcgtc gcgggagtc tgcaggctt gttgggattc agcaggatcg cccgcgccgc
45 480 cctggccatc tcgcccgtcg tggtgcaogc catgctggcc ggtatcggca tcacgatcgc
540 cctgcagcag gtgcaogtgc tgttgggccc gtcaccaag agttcggcct ggagcaatgt
600 caccggcctg cccgcgcaga ttctcgggtc gcaccgcccg ggaactggtg tgggcctgct
660 ggtgatcgcg atcctggtgg cctggcgc
50 688

<210> 7

55 <211> 648

<212> ADN

<213> *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* MI05/00484-2

60

65

ES 2 357 487 B1

<400> 7

5 gaggggtgtgg gagtagccgc cgggcatgcg atgcgggcca gcatcacctg cgtgatcatg
60 gtcaacatgt tgctcacat ggcgttgtgg agcatcgacg cgggcgcgag attcgggtggc
120 tgaatggcga attcgttaga ctctgacggc cgcggcccca ccgaccacca gctgctggcc
180 ctgggggcca cgggtctgcc cgcctcgttg gtggttttcc tgggtggact tccgctgtcg
240 ctgggggatcg cgatcgcttc ggacgccccg gttctcgccg gcctgatcgc tgcgatcgtc
10 300 gggggcatcg tcggcggatg gctcggggga tcgccgctac aggtcagcgg acccgccgcc
360 gggctcaccg tcgtggtggc cgacgtggta gccgaattcg gctgggggtg aacctgtttc
420 atcaccgtcg tcgcgggagt cctgcaggtc ttgttgggat tcagcaggat cgcgccgcc
480 gccctggcca tctcgcccgt cgtggtgcac gccatgctgg ccggtatcgg catcacgac
15 540 gccctgcagc aggtgcacgt gctggtgggc gggatcatcca agagttcggc ctggagcaat
600 gtcaccggcc tgcccgcgca gattctcggg gcgcaccgcc cgggactg
648

20

<210> 8

<211> 18

<212> ADN

25 <213> *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

<400> 8

30 gcgcagcgcgag gtgaattt
18

<210> 9

<211> 20

35 <212> ADN

<213> *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

<400> 9

40 ttggccatac ctagcactcc
20

<210> 10

45 <211> 19

<212> ADN

<213> *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

50

<400> 10

gctgaccaat gtgggtgac
19

55

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

60 <213> *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

<400> 11

65 Ctcgggatcc catacctctt
20



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901635

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C12R1/325 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SENARATNE, R.H. et al., 'Mycobacterium tuberculosis strains disrupted in mce3 and mce4 operons are attenuated in mice', JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, 2008, Vol. 57, No. 2, páginas 164-170, ISSN: 0022-2615, todo el documento.	1-4
A	GIOFFRE, A. et al., 'Mutation in mce operons attenuates Mycobacterium tuberculosis virulence', MICROBES AND INFECTION, 2005, Vol. 7, No. 3, páginas 325-334, ISSN: 1286-4579, todo el documento.	1-4
A	WO 99/10475 A2 (CONNAUGHT LAB.) 04-03-1999, todo el documento.	1-4
A	JOSHI, SM. et al., 'Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping', PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, 2006, Vol.103, No. 31, páginas 11760-11765, ISSN: 0027-8424, todo el documento.	1-4
A	CASALI, N. et al., 'A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons', BMC GENOMICS, 2007, Vol. 8, página 60, ISSN: 1471-2164, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.04.2011

Examinador
J. Vizán Arroyo

Página
1/5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901635

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C12R1/325 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Li, L. et al., 'The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis', PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, 2005, Vol.102, No.35, páginas 12344-12349, ISSN: 0027-8424, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.04.2011

Examinador
J. Vizán Arroyo

Página
2/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Senaratne, R.H. et al., J. Med. Microbiol., (2008), <u>57</u> (Pt 2): 164-70.	2008
D02	Gioffre, A. et al., Microbes Infect., (2005), <u>7</u> (3): 325-34.	2005
D03	WO 99/10475 A2 (CONNAUGHT LAB.)	04.03.1999
D04	Joshi, SM. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., (2006), <u>103</u> (31): 11760-5.	2006
D05	Casali, N. et al., BMC Genomics, (2007), <u>8</u> : 60.	2007
D06	Li, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., (2005), <u>102</u> (35): 12344-9.	2005

En D1-D4 se describen diferentes estirpes atenuadas de *Mycobacterium tuberculosis*.

En D5 se analizan los operones *mce* en *Actinomycetales*.

En D6 se divulga la secuencia completa del genoma de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1

El objeto de la reivindicación 1 consiste en una cepa mutante de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* que se caracteriza básicamente porque está afectada en los genes *mce* (MAP0108-MAP0113) y *PE/PPE* (MAP0122-MAP0124).

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D6, no se ha divulgado ningún mutante atenuado de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* que comparta las mismas características técnicas del mutante de la invención. Además, la obtención de dicho mutante no se deduce de una manera obvia combinando la información contenida en D1-D6.

Sobre la base de lo expuesto anteriormente, se consideran también nuevos e inventivos los usos de las reivindicaciones 1-4.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-4 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.