



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 968**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06735261 .7**

96 Fecha de presentación : **16.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1855716**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54

Título: **Composiciones para desencadenar una respuesta inmunitaria contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.**

30

Prioridad: **16.02.2005 US 653536 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.05.2011

73

Titular/es:
CORNELL RESEARCH FOUNDATION, Inc.
Cornell Business & Technology Park
20 Thornwood Drive Suite 105
Ithaca, New York 14850, US

72

Inventor/es: **Chang, Yung-Fu**

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Composiciones para desencadenar una respuesta inmunitaria contra *mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

- La presente invención se refiere en general a la estimulación de respuestas inmunitarias, y más específicamente a composiciones y usos para estimular respuestas inmunitarias profilácticas y/o terapéuticas contra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

- La *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MPT) es el agente causante de la enfermedad de Johnes (EJ), que causa enteritis granulomatosa crónica en rumiantes. Los animales afectados clínicamente desarrollan diarrea crónica y pérdida de peso progresiva que, dado el caso, da como resultado la muerte, mientras que los animales infectados subclínicamente principalmente tienen una producción reducida de leche. La EJ es de enorme importancia económica para la industria láctea mundial, causando pérdidas importantes debido a la producción reducida y al sacrificio temprano de animales con estimaciones de un 20% de los rebaños lecheros de EE.UU. afectados y costes de 220 millones de dólares al año para la industria láctea (Wells, y col. 2000. J. Am. Vet. Med. Assoc. 216: 1450-1457). El ganado vacuno es más susceptible de infección por este organismo en los primeros 6 meses de vida, pero la enfermedad típicamente no se evidencia hasta los 3 a 5 años de edad. La infección ocurre mediante la ingestión de estiércol contaminado, calostro o leche de vacas infectadas (Sweeney, 1996. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 12: 305-312). También ocurre infección fetal, particularmente en vacas preñadas con enfermedad avanzada (Sweeney, y col. 1992. Am. J. Vet. Res. 53: 477-480). Aunque la EJ es una enfermedad infecciosa importante de los rumiantes, no existe una vacuna eficaz contra esta enfermedad. La única vacuna disponible actualmente en los Estados Unidos consiste en *M. avium* subespecie *paratuberculosis* inactivada en un coadyuvante oleoso (Kormendy, B. 1992. Acta Vet. Hung. 40: 171-184; Larsen, y col., 1978. Am. J. Vet. Res. 39: 65-69). Sin embargo, dichos programas de vacunación han generado graves problemas de salud pública. Por ejemplo, al menos un veterinario se inoculó accidentalmente en la mano durante la vacunación de animales (Patterson, y col., (1988) J. Am. Vet. Med. Assoc. 192: 1197-1199). Adicionalmente, los estudios han demostrado que hay una fuerte reacción en los sitios de inyección después de la vacunación con esta bacteria inactivada (Kormendy, B. 1992. Acta Vet. Hung. 40: 171-184; Larsen, y col., 1978, Am. J. Vet. Res. 39: 65-69). Otra desventaja de esta vacuna es que los animales vacunados se vuelven positivos en la prueba cutánea de tuberculina (Kormendy, B. 1992. Acta Vet. Hung. 40: 171-184; Larsen, y col., 1978. Am. J. Vet. Res. 39: 65-69). Por tanto, existe la necesidad de desarrollar vacunas más eficaces contra la EJ que puedan usarse como composiciones profilácticas y/o terapéuticas seguras y eficaces para infección por MPT.

El documento WO 03/076898 describe diagnósticos de micobacterias.

Velaz-Faircloth y col. Infection and Immunity, vol. 67(8), agosto de 1999, páginas 4243-4250, describen la protección frente a *M. avium* por vacunas de ADN que expresan antígenos micobacterianos en forma de proteínas de fusión con GFP.

- Uzonza J.E. y col., Vaccine, vol. 21, 2003, páginas 3101-3109, describen la eficacia de vacunaciones con la cepa comercial y de campo *M. paratuberculosis* con IL-12 recombinante en un modelo de infección experimental bovina.

Mullerad J. y col., Med. Microbiol. Immunol., vol.190, 2002, páginas 179-187, describen la inmunogenicidad del antígeno 85B de *M. paratuberculosis*.

- Shin y col. J. Vet. Sci. vol. 5(2), 2004, páginas 111-117, describen la respuesta de anticuerpos comparativa de cinco antígenos recombinantes con relación a los niveles de excreción bacteriana y el desarrollo de diagnóstico serológico basado en el antígeno de 25 kDa de *M. avium* subespecie *paratuberculosis*.

Shin y col., Infect. Immun. vol. 73(8), agosto de 2005, páginas 5074-5085, describen las respuestas inmunitarias celulares *in vitro* ante antígenos recombinantes de *M. avium* subespecie *paratuberculosis*.

- Dheenadhayalan y col., DNA Sequence, vol. 13(5), 2002, páginas 287-294, describen la clonación y caracterización de los genes que codifican los antígenos 85A, 85B y 85C de *M. avium* subespecie *paratuberculosis*.

- La presente invención proporciona usos para estimular una respuesta inmunitaria en rumiantes contra *M. paratuberculosis* (MPT), como se define en las reivindicaciones. Las composiciones comprenden componentes inmunitarios, que son polinucleótidos que codifican antígenos de MPT, como se define en la reivindicación. Las composiciones comprenden al menos cinco componentes inmunogénicos recombinantes: los antígenos de MPT 85A, 85B, 85C, de 35kDa y superóxido dismutasa (SOD). Son otros antígenos de MPT ejemplares MptC, MptD y proteína similar a ESAT-6.

El uso es para estimular una respuesta inmunitaria en un rumiante contra bacterias MPT.

- Las composiciones que comprenden antígenos proteicos de MPT recombinantes, polinucleótidos de ADN que codifican antígenos de MPT o combinaciones de los mismos, pueden formularse con portadores farmacéuticos estándar y pueden ser para administración mediante cualquiera de una variedad de vías convencionales. Las

composiciones pueden ser para administración en cualquier momento a un rumiante susceptible de contraer infección por MPT o a un animal que esté infectado por MPT. Sin embargo, es preferible que las composiciones de la invención sean para administración antes de la infección por MPT, tal como para administración a rumiantes preñadas que pueden transferir componentes inmunogénicos profilácticos a sus crías mediante el calostro, o para administración durante el periodo de una a cinco semanas después del nacimiento.

La Fig. 1 es una representación gráfica de los datos del análisis de respuestas proliferativas de células mononucleares de sangre periférica de vacas infectadas y sanas de control estimuladas *in vitro* con 5 proteínas recombinantes de MPT. Los resultados se expresan como un índice de estimulación y las barras de error representan la desviación estándar de la media. No se observó una proliferación significativa ante ningún antígeno por PBMC de vacas no infectadas ($P>0,05$). Mostraron la mayor actividad proliferativa 85A y la proteína de 35 kDa en animales de excreción baja y media, respectivamente.

La Fig. 2. es una representación gráfica de los datos del análisis de la producción de interferón γ en respuesta ante antígenos individuales con relación a los niveles de excreción de MPT. Los resultados se dan como valores de DO en pocillos estimulados—valores de DO en pocillos de control (IFN- γ producido naturalmente). Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias. 85A y 85B eran los antígenos más inducibles a producir IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica bovina a partir de animales con ambos tipos de excreción.

La Fig. 3. es una representación gráfica de los datos del análisis de las respuestas de anticuerpo ante antígenos individuales con relación a los valores de excreción de MPT. Las barras representan los valores medios de DO a 405 nm. Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias. Todos los antígenos recombinante mostraron aumentos de las respuestas de anticuerpo según los niveles de excreción y las respuestas de anticuerpo ante la proteína de 35 kDa estaban positivamente separados entre las vacas sanas no infectadas y con ambos tipos de excreción ($P<0,01$).

Las Fig. 4A-4D son representaciones gráficas de los datos del análisis de los cambios en la distribución de subconjuntos de linfocitos T en linfocitos de sangre periférica bovina después de estimulación con antígenos recombinantes, como se determina mediante análisis por FACS. Fig. 4A. CD4; Ag 85A y Ag 85B inducían una mayor proporción de linfocitos T CD4⁺ en animales de excreción media en comparación con animales de excreción baja, mientras que el porcentaje de linfocitos CD4⁺ no cambiaba en el ganado vacuno de control no infectado. Fig. 4B. CDB; Ag 85A aumentaba la proporción de linfocitos T CD8⁺ en animales de excreción media, mientras que el porcentaje aumentado de linfocitos CD8⁺ era muy bajo en ganado vacuno no infectado. Fig. 4C. CD25; Ag 85A y Ag85B aumentaban la proporción de linfocitos T CD25⁺ en ambos grupos de excreción, mientras que tenían poco efecto en ganado vacuno no infectado. En contraposición, Ag 85C y la proteína de 35 kDa aumentaban significativamente la proporción de linfocitos T CD25⁺ solo en animales con excreción media ($P<0,05$). Fig. 4D. linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺; todos los antígenos dieron como resultado aumentos significativamente menores en todos los subconjuntos celulares en ambos grupos de excreción baja y media, excepto SOD para linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ en animales de excreción media.

La Fig. 5 es una representación gráfica de los datos del análisis de los cambios diferenciales de linfocitos T CD3⁺ en respuesta a la estimulación con proteínas recombinantes y dos controles (ConA y PPD). Los datos se expresan como la media de células que se teñían positivamente por CD3 (1 error estándar de la media) en respuesta a cada antígeno recombinante respecto al nivel de excreción.

La Fig. 6 es una representación gráfica de los datos del análisis de subconjuntos de linfocitos B CD21⁺ aumentados en linfocitos de sangre periférica bovina después de la estimulación con antígenos recombinantes, determinado mediante análisis de FACS. Los resultados se notifican como el aumento porcentual medio de células con tinción positiva y las barras de error representan 1 error estándar de la media (EEM). La proteína recombinante de 35 kDa inducía el mayor aumento de linfocitos B CD21⁺ en animales con excreción media. No se observó un aumento significativo en la proporción de linfocitos B en respuesta a los demás antígenos independientemente de los niveles de excreción bacteriana ($P>0,05$).

La Fig. 7 es una representación gráfica de los datos del análisis de los perfiles de IL-2 de PBMC bovinas de ganado vacuno no infectado, animales con excreción baja y media después de la estimulación con antígenos recombinantes durante 24 horas. Los resultados representan los aumentos medios en veces de IL-4 frente a las PBMC no estimuladas, que servían como calibradores. Los Ag 85A y B estimulaban más fuertemente a los animales con excreción media, mientras que la proteína de 35 kDa y SOD tenían menores efectos ($p < 0,05$).

Las Fig. 8A-8C son representaciones gráficas de los datos del análisis de comparación de los perfiles de ARNm de citocina para IFN- γ (Fig. 8A), IL-12p40 (Fig. 8B) y TNF- α (Fig. 8C) de PBMC bovinas de ganado vacuno no infectado, animales con excreción baja y media después de la estimulación con antígenos recombinantes durante 24 horas. Los resultados representan el aumento medio en veces frente a las PBMC no estimuladas, que servían como calibradores. Los resultados son similares, con los Ag 85A y B estimulando más fuertemente los animales con excreción media, mientras que la proteína de 35 kDa y SOD tenían menores

efectos.

La Fig. 9 es una representación gráfica de los datos del análisis de los perfiles de ARNm de IL-4 de PBMC bovinas de ganado vacuno no infectado, animales con excreción baja y media después de la estimulación con antígenos recombinantes durante 24 horas. Los resultados representan el aumento medio en veces de IL-4 frente a PBMC no estimuladas, que servían como calibradores. La proteína de 35 kDa estimulaba fuertemente la expresión de ARNm de IL-4 tanto en animales con excreción baja como media.

La Fig. 10 es una representación gráfica de la recuperación bacteriana del bazo e hígado después de la administración de las construcciones de ADN indicadas y controles y la posterior aplicación de la infección con MPT.

La Fig. 11 es una representación gráfica del número medio de granulomas en bazo e hígado después de la administración de las construcciones de ADN indicadas y controles y la posterior aplicación de la infección con MPT.

Las Fig. 12A y 12B son representaciones fotográficas de la tinción de Ziehl-Neelsen de tejidos que revelan numerosos bacilos acidorresistentes (Fig. 12A). En contraposición, la infección era mucho menos grave en los ratones vacunados con construcciones de ADN de MPT que codifican los cinco antígenos (Fig. 12B).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona usos, como se definen en las reivindicaciones, para estimular una respuesta inmunitaria contra *M. paratuberculosis* (MPT) en un rumiante. Las composiciones comprenden al menos 5 polinucleótidos de ADN que codifican antígenos de MPT. La administración de la composición a un rumiante estimula una respuesta inmunitaria contra bacterias MPT.

Como se usa en la presente memoria, un "componente inmunitario" es un componente de la composición que puede estimular directa o indirectamente una respuesta inmunitaria. En consecuencia, cuando se introducen en un rumiante, los vectores de expresión que comprenden polinucleótidos de ADN que codifican antígenos de MPT entran en las células del rumiante y expresan antígenos de MPT. Los antígenos de MPT expresados estimulan a su vez una respuesta inmunitaria. Por tanto, un polinucleótido de ADN que codifica un antígeno de MPT se considera un componente inmunogénico que estimula indirectamente una respuesta inmunitaria. Con respecto a un antígeno de proteína de MPT administrado, puesto que el antígeno es reconocido directamente por el sistema inmunitario, se considera al antígeno un componente inmunogénico que estimula directamente una respuesta inmunitaria.

El uso puede proporcionar beneficios a cualquier rumiante susceptible de infección por MPT, en que infección se considera que significa colonización de la mucosa intestinal del rumiante por MPT. La invención es particularmente bien adecuada para la profilaxis o terapia de infección por MPT en rumiantes incluyendo, pero sin limitación, ganado vacuno, ovejas, cabras, ciervos, alces, antílopes y búfalos.

Por tanto, las composiciones pueden ser para administración a cualquier rumiante infectado por MPT o no infectado. El uso de las composiciones para rumiantes infectados según la invención se considera que estimula una respuesta inmunitaria terapéutica. Sin embargo, es preferible que las composiciones sean para administración antes de la infección por MPT, para estimular una respuesta profiláctica. Por ejemplo, las composiciones pueden ser para administración a un rumiante preñado que puede transferir componentes inmunitarios profilácticos a sus crías no infectadas mediante el calostro. Como alternativa, las composiciones pueden ser para administración durante el periodo de una a cinco semanas después del nacimiento para proporcionar un efecto profiláctico que pueda prevenir la infección o reducir la gravedad de la enfermedad si ocurre infección. Por tanto, en una realización, el uso de la invención es profiláctico para infección por MPT, mientras que en otra realización el uso es terapéutico para infección por MPT. El uso puede usarse también para profilaxis o terapia de la enfermedad de Johne.

Los antígenos de MPT usados en la invención incluyen al menos las proteínas de MPT 85A, 85B, 85C, 35 kDa y SOD. Son otros antígenos de MPT MptC, MptD y proteína similar a ESAT-6. Los antígenos de proteína de MPT pueden obtenerse para uso en la invención mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como mediante procedimientos de clonación recombinante convencional. Son conocidos procedimientos de clonación de ADN adecuados para expresar y purificar proteínas recombinantes. (Véase, por ejemplo, Sambrook y col. 2001, "Molecular cloning: a laboratory manual", 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, NY). Generalmente, para obtener antígenos de proteína de MPT recombinantes, puede obtenerse ADN genómico de MPT a partir de un cultivo de MPT según procedimientos estándar, tales como mediante el bien conocido procedimiento de lisis alcalina. El ADN que codifica los antígenos puede amplificarse, tal como mediante la reacción en cadena de la polimerasa, a partir del ADN genómico y los productos de amplificación pueden clonarse individualmente o en diversas combinaciones en uno o más vectores de expresión adecuados. Las células hospedadoras apropiadas pueden transfectarse con el vector de expresión y las células transfectadas pueden cultivarse en condiciones apropiadas para la expresión de los antígenos. Los antígenos pueden extraerse posteriormente y purificarse del cultivo según técnicas estándar.

Para administración a animales, los antígenos de MPT recombinantes adecuadamente purificados pueden

combinarse con portadores farmacéuticos estándar. Se describen portadores farmacéuticos estándar para uso con proteínas en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (18ª edición, A. R. Gennaro y col. Eds., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990). Además, los antígenos pueden proporcionarse en formulaciones liposómicas o microsómicas convencionales.

- 5 Las composiciones que comprenden los antígenos de MPT para uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria pueden administrarse mediante cualquier vía aceptable. Las vías de administración adecuadas incluyen oral, por mucosa y parenteral (por ejemplo, inyección intravascular, intramuscular y subcutánea). Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad de antígenos administrada a un animal particular dependerá de una serie de factores tales como la vía de administración y el tamaño, estado físico y estado de MPT del animal. Las cantidades relativas de cada antígeno en una formulación pueden ajustarse según parámetros conocidos, de modo que proporcionen equivalentes molares u otras relaciones de los antígenos. Adicionalmente, las composiciones pueden usarse en una administración única o en una serie de administraciones como recuerdo de la respuesta inmunitaria a los antígenos de MPT. Generalmente, puede administrarse una dosificación total de entre 10-200 µg de proteína. Cuando se administra ADN que codifica antígenos de MPT, pueden administrarse generalmente entre 30-500 µg de ADN.
- 10
- 15 Como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona el uso de polinucleótidos que codifican al menos cinco antígenos de MPT recombinantes. Los polinucleótidos que codifican los antígenos de MPT antígeno de 85A, 85B, 85C, 35 kDa y superóxido dismutasa (SOD) pueden administrarse en una formulación única. 85A, 85B y 85C son proteínas de unión a fibronectina; las proteínas de 35 kDa y SOD son proteínas de superficie externa. La secuencia de ADN que codifica el gen de 85A de MTP y la secuencia aminoacídica del gen de 85A se proporcionan en el nº de acceso de GenBank AF280067 (10 de octubre de 2003, entrada). La secuencia de ADN que codifica el gen de 85B de MTP y la secuencia aminoacídica del gen de 85B se proporcionan en el nº de acceso a GenBank AF219121 (21 de noviembre de 2002, entrada). La secuencia de ADN que codifica el gen 85C de MTP y la secuencia aminoacídica del gen de 85C se proporcionan en el nº de acceso de GenBank AF280068 (21 de noviembre de 2002, entrada). La secuencia de ADN que codifica el gen de SOD de MTP y la secuencia aminoacídica del gen de SOD se proporcionan en el nº de acceso a GenBank AF180816 (30 de noviembre de 2001, entrada). La secuencia de ADN que codifica la proteína de 35 kDa se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO:1. La secuencia aminoacídica de la proteína de 35 kDa se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO:2. Antígenos de MPT adicionales incluyen MptC, MptD y proteína similar a ESAT-6. La secuencia de ADN que codifica la proteína MptC se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 3. La secuencia aminoacídica de la proteína MptC se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO:4. La secuencia de ADN que codifica la proteína similar a ESAT-6 se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO:5. La secuencia aminoacídica de la proteína similar a ES AT-6 se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO:6. La secuencia de ADN que codifica la secuencia de MptD se proporciona en la presente memoria como SEQ ID NO: 7. La secuencia de ADN que codifica la secuencia aminoacídica de MptD se proporciona en la presente memoria como
- 20
- 25
- 30
- 35

Las secuencias de ADN de los cebadores usados para amplificar ADN que codifica los antígenos de MPT usados en la presente memoria a partir de ADN genómico de MPT se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre de gen/cebador	SEQ ID NO:	Secuencia de cebador (5'→3')	Longitud del producto de ADN (pb)	Nº de acceso del producto de amplificación mc y de la secuencia aminoacídica del antígeno
85A pVR85AF pVR85AR	9 10	CGGGATCCATGATGACGCTTGTGACA CGGGATCCTTAGGTGCCCTGG	1050	AF280067
85B pVR85BF pVR85BR	11 12	CGGGATCCATGACAGATCTG CGGGATCCTTATCCGCCGCC	1000	AF219121
85C pVR85CF pVR85CR	13 14	CGGGATCCATGTGCTTCATCGAA CGGGATCCTCAGGTGGCGGGC	1100	AF280068
SOD pVRSODF pVRSODR	15 16	GGATCCTGGGACTATGCAGC AGATCTTCAGCCGAAGATCAGGC	590	AF180816
35kDa (MAP2121c) pVR35KDF pVR35KDR	17 18	GGATCCCCCACTTGGTGATCT AGATCTTCACTTGTACTCATGGA	910	
MptC (MAP 3734) pVRMPTCF pVRMPTCR	19 20	GGATCCCGCGGTCGGCGT AGATCTTCATGGTCGAGGTGCCT	1750	
MptD (MAP 3733) pVRMPTDF pVRMPTDR	21 22	GGATCCCGCCGCATCGAC AGATCTTCAAGCTAGGCCGGC	600	
Similar a ESAT 6 (MAP 0161) pVRESATF pVRESATR	23 24	GGATCCCGGGCGCGGTG AGATCTTCAGAACAGGCCG	270	

- En otra realización, pueden prepararse composiciones que comprenden polinucleótidos de ADN que codifican cinco o más antígenos de MPT. Las secuencias que codifican antígeno de MPT pueden obtenerse mediante amplificación de ADN genómico de MPT usando cebadores apropiados e insertando los productos de amplificación en vectores de expresión de la misma manera que se describe para la preparación de proteínas de antígeno recombinantes.
- Los vectores de expresión adecuados contienen señales de transcripción y traducción eucarióticas apropiadas, y pueden contener elementos adicionales tales como señales de poliadenilación y/o de tráfico de proteínas. Es un ejemplo de un vector de expresión adecuado pVR1020 (disponible en Vical, Inc., San Diego, Calif.), que contiene un promotor inmediato-temprano de citomegalovirus para promover una expresión eficaz en un hospedador eucariótico, así como una señal de secreción de activador de plasminógeno para facilitar la secreción de los antígenos a partir de las células del hospedador eucariótico.
- Se reconocerá por los expertos en la técnica que se usarán en la invención uno o más vectores de expresión distintos, distinguidos entre sí por los antígenos de MPT que codifican y/o por sus elementos reguladores u otros, tales como sitios de policlonación. Por tanto, puede usarse en la presente invención un solo vector de expresión que codifica al menos cinco antígenos de MPT, o al menos cinco vectores de expresión que codifican cada uno un antígeno de MPT diferente, o combinaciones de vectores de expresión que codifican cada uno al menos un antígeno de MPT, para suministrar polinucleótidos que codifican al menos cinco antígenos de MPT, como se define en las reivindicaciones.
- En una realización, pueden proporcionarse secuencias polinucleotídicas de ADN que codifican los antígenos de MPT 85A, 85B, 85C, SOD, MptC, MptD, 35kDa y proteína similar a ESAT6 en vectores de expresión separados que pueden usarse para la expresión y purificación de proteína y para la administración en diversas combinaciones a rumiantes para estimular una respuesta inmunitaria.
- Los vectores de expresión que codifican los antígenos de MPT pueden formularse en cualquier preparación farmacéuticamente eficaz para administración a rumiantes. Dichas formulaciones pueden ser, por ejemplo, una disolución salina tal como disolución salina tamponada con fosfato (BPS). Se prefiere utilizar formulaciones farmacéuticamente aceptables que proporcionen también estabilidad a largo plazo al ARN. Por tanto, es preferible retirar y/o quelar los iones de metal traza de los tampones de formulación o de los viales y cierres en que se almacena el ADN para estabilizar y proteger al ADN durante el almacenamiento. Además, la inclusión de secuestrantes de radicales libres no reductores, tales como etanol o glicerol, es útil para evitar el daño del ADN por la producción de radicales libres que puede aún ocurrir, incluso en disoluciones aparentemente desmetalizadas.

Además, el ADN puede proporcionarse en formulaciones liposómicas o microsómicas convencionales.

No hay límites a la vía por la que pueden suministrarse polinucleótidos de ADN de la invención, a condición de que su suministro estimule una respuesta inmunitaria contra MPT en los rumiantes receptores. En consecuencia, los polinucleótidos de ADN usados en la presente invención pueden ser para administración al rumiante mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como por vías entérica y parenteral. Estas vías de suministro incluyen, pero sin limitación, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección intravenosa y suministro oral. Es una vía preferida la intramuscular.

La composición para uso en la invención comprende al menos cinco componentes inmunogénicos que se proporcionan como polinucleótidos de ADN que codifican antígenos de MPT. Dichas composiciones pueden obtenerse combinando los vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos que codifican proteínas de MPT descritas en la presente memoria. A este respecto, las secuencias polinucleotídicas pueden estar presentes en uno o más vectores de expresión. Las composiciones que comprenden polinucleótidos que codifican antígenos de MPT pueden combinarse con portadores farmacéuticos convencionales y administrarse como se describe en la presente memoria y/o según técnicas estándar. Pueden proporcionarse preparaciones liposómicas o microsómicas convencionales de los polinucleótidos que codifican antígenos de MPT. Adicionalmente, y como se reconocerá por los expertos en la técnica, las composiciones para uso en la invención pueden comprender adicionalmente un coadyuvante adecuado.

Por tanto, y sin pretender ligarse a teoría particular alguna, la administración de polinucleótidos que codifican antígenos recombinantes según el uso de la invención, se cree que estimula una respuesta inmunitaria que puede ser profiláctica o terapéutica con respecto a la infección por MPT.

Los siguientes ejemplos describen las diversas realizaciones de esta invención. Estos ejemplos son ilustrativos y no se pretende que sean restrictivos.

Ejemplo 1

Este ejemplo proporciona una comparación de distintos efectos de linfoproliferación en respuesta ante la estimulación con antígenos individuales.

Para examinar las respuestas linfoproliferativas, se analizó en cinco antígenos recombinantes de MPT, 85A, 85B, 85C, antígeno de 35 kDa y superóxido dismutasa (SOD) su capacidad de desencadenar respuestas proliferativas en PBMC obtenidas de vacas con distintos niveles de excreción de MPT. Para este y otros ejemplos como se indican en la presente memoria, se dividieron un total de 38 vacas Holstein de 2 a 3 años de edad en 3 grupos. Los controles sanos (n= 18) eran negativos de infección por MPT, determinado mediante un cultivo fecal negativo y un ensayo PCR IS900 negativo. Los controles sanos provenían de una granja que ha sido negativa de cultivo fecal y negativa de PCR IS900 durante los últimos 10 años. Se subdividieron los animales positivos en animales con excreción baja (n=16) y con excreción media basándose en el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/g de heces (n= 4). Se consideran animales con excreción baja los animales con entre 1-30 UFC/g de heces. Se consideran animales con excreción media los animales con entre 31-300 UFC/g de heces. Los animales con excreción alta (>300 UFC/g de heces) no estaban disponibles, puesto que se sacrifican inmediatamente en las granjas una vez se identifican. Se efectuaron los cultivos fecales y el ensayo PCR IS900 para determinar el estado de infección por MPT como se describe anteriormente (Shin y col., (2004) J. Vet. Diagn. Invest. 16: 116-120).

Para uso en ensayos de linfoproliferación, se clonaron y expresaron los antígenos recombinantes 85A, 85B, 85C, el antígeno de 35 kDa y SOD usando técnicas estándar y como se describen anteriormente (Dheenadhayalan y col., (2002) DNA Seq. 13: 287-294; Shin y col., (2004) J. Vet. Sci. 5: 111-117), y se purificaron como se describe anteriormente (Skeiky y col., (1998) J. Immunol. 161: 6171-6179). Los antígenos usados en estos ejemplos tenían una endotoxina despreciable (10 pg/ml) en un ensayo de amebocito de *Limulus*.

Para el aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica bovina, se recogió sangre periférica (20 ml) de todas las vacas de la vena de la cola con tubos de vacío heparinizados.

Se efectuó el aislamiento de linfocitos de la sangre heparinizada mediante centrifugación diferencial usando Histopaque 1.077 (Sigma). Se dispusieron 20 ml de sangre completa heparinizada sobre 15 ml de Histopaque en un tubo de polipropileno estéril de 50 ml (Falcon), y se centrifugó entonces a 1000 x durante 30 min a temperatura ambiente. Se desechó la capa de plasma, se recogió cuidadosamente la capa de células mononucleares y se lavó tres veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.2). Se lisaron los eritrocitos contaminantes con tampón de KCl con 0,87% de amonio invirtiendo durante 2 min a temperatura ambiente, y añadiendo entonces inmediatamente 30 ml de PBS.

Se suspendieron los sedimentos celulares lavados en PBS y se contaron usando un hemacitómetro y azul de tripano para determinar el porcentaje de viabilidad. Los recuentos celulares diferenciales mostraron consistentemente más de un 96% de linfocitos, 1% de monocitos y menos de 3% de granulocitos en la suspensión celular.

Se suspendieron los linfocitos a 2×10^6 /ml en RPMI 1640 que contenía FCS al 10% exento de endotoxinas (Cellec

Gold; ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA), L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml (Sigma) y se añadieron 250 µl a placas de fondo redondeado de 96 pocillos o placas de fondo plano, dependiendo de los fines del experimento.

- Para investigar la proliferación de linfocitos en respuesta a antígenos individuales, se efectuó un ensayo de blastogénesis. Brevemente, se incubaron inicialmente PBMC en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos durante 3 días a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Se estimularon entonces los cultivos con ConA (10 µg/ml) y se añadieron a cada pocillo derivado de proteína purificado (PPD) (cada control positivo) (10 µg/ml) o cada proteína recombinante purificada (10 µg/ml) y 40 µl (1,0 µCi) de metil-³H-timidina (PerkinElmer Life Science Inc, MA, EE.UU.) en medio de cultivo. Se incubaron las células durante 18 h adicionales en las mismas condiciones y se recogieron entonces las células usando un recolector celular semiautomático (Skatronas Liter Norway). Se registró la actividad blastogénica como cuentas por minutos (cpm) de radiactividad basada en el recuento de centello líquido. Los resultados se expresaron como índices de estimulación (IE) calculados como sigue:

$$IE \text{ (índice de estimulación)} = \frac{(CPM \text{ de cultivo positivo estimulado con antígeno}) - (CPM \text{ de fondo})}{(CPM \text{ de cultivo de control o negativo}) - (CPM \text{ de fondo})}$$

- Para este y otros ejemplos de la presente memoria, se efectuó el análisis estadístico de los datos en Excel y el paquete de software GraPad Prism versión 2.0. Se analizaron las diferencias entre grupos individuales, antígenos y expresión de gen de citocina con la prueba de t de Student. Las diferencias se consideraron significativas si se obtenían valores de probabilidad P<0,0.

- Como se demuestra en la Fig. 1, las actividades proliferativas de PBMC bovinas de vacas con excreción media eran mayores que en otros grupos en respuesta a todas las proteínas recombinantes y dos controles positivos (P<0,05), aunque había variación entre las vacas individuales. Las PBMC de vacas con excreción media tratadas con los antígenos de 85A, 85B y de proteína de 35 kDa mostraron un índice de estimulación (IE) significativamente mayor (P<0,005) que el de PBMC tratadas con otros antígenos recombinantes. Además, las respuestas proliferativas a la proteína de 35 kDa en animales con baja excreción eran aún mayores que las de los animales con excreción media en respuesta a 85C y SOD (Fig. 1). Por tanto, este ejemplo indica que los antígenos de 85A, 85B y de proteína de 35 kDa pueden ser importantes para afectar a la proliferación de linfocitos en animales expuestos anteriormente a MPT.

Ejemplo 2

- Este ejemplo demuestra los efectos de antígenos recombinantes sobre la producción de IFN-γ. Para analizar la producción de IFN-γ, se midieron los niveles de IFN-γ en sobrenadantes de cultivo usando un kit comercial específico de IFN-γ bovino siguiendo las instrucciones del fabricante (Biosource Int. Camarillo, CA). Se leyeron las placas a 450 nm en un lector ELISA Bio-Tek 312E (BioTEK Instruments, Inc, Winooski, VT 05404-0998), usando cualquier filtro de referencia de 630 nm a 750 nm. Se calcularon los resultados basándose en la comparación de la densidad óptica (DO) de control negativo y positivo. Los resultados se determinaron como negativos (<DO que el control positivo) o positivos (>DO que el control positivo) respecto al valor de corte según las instrucciones del fabricante.

Se midió la producción de IFN-γ después de la estimulación con los cinco antígenos recombinantes o dos controles positivos en PBMC de vacas infectadas y de control no infectadas. Los resultados se presentan en la Fig. 2 como valores de DO corregida (DO de estimulado con antígeno menos DO de control) que representan la elevación de la producción de IFN-γ por los diversos antígenos.

- Como puede observarse en la Fig. 2, todos los antígenos recombinantes ensayados inducían una liberación significativa de IFN-γ en cultivos de PBMC bovinas de ganado vacuno infectado en comparación con controles no infectados (P<0,05), y los niveles de IFN-γ eran consistentemente mayores en animales con excreción media que en animales con excreción baja (P<0,05). Los antígenos recombinantes 85A y 85B inducían niveles significativamente mayores de IFN-γ en los animales con baja excreción que los demás antígenos recombinantes ensayados y en comparación con los dos controles positivos (P<0,05). Por tanto, este ejemplo indica que los antígenos recombinantes 85A y 85B pueden ser importantes en la estimulación de una respuesta mediada por célula contra MPT.

Ejemplo 3

- Este ejemplo proporciona una comparación de anticuerpos en sueros aislados de vacas no infectadas e infectadas que reconocen los antígenos recombinantes de la invención.

- Se efectuaron ensayos de enzimo-inmunsorcción (ELISA) para evaluar la reactividad sérica de los antígenos recombinantes siguiendo las etapas descritas anteriormente (Shin, y col., (2004) *J. Vet. Sci.* 5: 111-117). Brevemente, se optimizó un ELISA indirecto usando 2,5, 5 o 10 µg/ml de cada antígeno y suero diluido 1:100 mediante titulación en damero. Se recubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp, Nunc, Dinamarca) con 100 µl de cada antígeno en tampón carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃ 14,2 mM, NaHCO₃ 34,9 mM, NaN₃ 3,1 mM,

pH 9,5) a 4°C durante una noche, seguido de lavado tres veces con PBS que contiene 0,05% de Tween 20 (PBST, tampón de lavado) usando un lavador de placa de micropocillos Bio-Tek ELx405 (BioTEK Instruments, Inc, Winooski, VT). Los sitios no recubiertos en los pocillos se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBST a 37°C durante 1 h. Se lavaron las placas dos veces con PBST y se añadieron 100 µl de anticuerpo dirigido contra IgG-HRP bovina conjugada diluido óptimamente (1:25.000) (Sigma) a todos los pocillos y se incubó a 37°C durante 1 h. Se lavaron las placas tres veces con PBST y se añadieron 200 µl de ácido 2,2'-azinobistiazolin-6-sulfónico (Sigma) a cada pocillo. Se incubaron las placas a 37°C en la oscuridad. Después de 30 min de incubación, se añadió disolución de terminación (HCl 1 M) y se leyeron las placas 3 veces a 405 nm a intervalos de 2 minutos en un lector ELISA Bio-Tek 312 (BioTEK Instruments, Inc, Winooski, VT 05404-0998). Se incluyeron en cada placa sueros positivos y negativos y controles de antígeno y anticuerpo.

Se representan en la Fig. 3 los resultados de medir los niveles de anticuerpos de IgG ante los antígenos recombinantes en sueros de ambos grupos de excreción y controles sanos. Aunque había una amplia variación en el contenido de anticuerpo en los sueros de vacas individuales, las respuestas de anticuerpo de IgG medias contra todos los antígenos recombinantes aumentaron significativamente en ambos grupos de excreción baja y media. No se observaron diferencias significativas entre los niveles medios de anticuerpo del grupo de baja excreción ante ninguno de los antígenos ensayados (Fig. 3). Sorprendentemente, las respuestas de anticuerpo ante la proteína de 35 kDa eran significativamente mayores en el grupo de excreción media que las de los demás antígenos ($P < 0,05$), lo que puede ser importante porque la proteína de 35 kDa es también eficaz para estimular la proliferación de linfocitos, y por tanto puede estimular ambas respuestas inmunitarias mediadas por célula y humoral.

20 Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra los cambios en la distribución de subconjuntos de linfocitos en PBMC obtenidas de vacas no infectadas, con excreción baja y con excreción media en respuesta a la estimulación con los antígenos recombinantes.

Para efectuar este análisis, se efectuó un análisis citométrico de flujo monocolor con anticuerpos monoclonales contra marcadores linfocíticos bovinos (Tabla 2). Brevemente, se lavaron las células tres veces con tampón FACS, se incubaron con el primer anticuerpo (Tabla 1) durante 30 min a 4°C, se lavaron tres veces, se incubaron posteriormente con un anticuerpo de caballo dirigido contra inmunoglobulina de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (Vector) durante 30 min a 4°C, se lavaron dos veces y se recogieron en 200 µl de tampón de fijación FACS antes del análisis. Se realizó el análisis en un citómetro de flujo (FACSCalibur; Becton Dickson). Se usó una adquisición selectiva con dispersión frontal-dispersión lateral para medir de 5.000 a 10.000 linfocitos por muestra. Basándose en los datos de fluorescencia de los linfocitos, se expresaron los resultados como el porcentaje de células con tinción positiva respecto a una muestra teñida con un anticuerpo de control de isotipo irrelevante.

Tabla 2

Anticuerpo monoclonal	Isotipo	Antígeno identificado	Referencia de Ab
IL-A11	IgG2a	CD4	(Brodersen, y col., 1998. <u>Vet. Immunol. Immunopathol.</u> 64: 1-13)
CACT80C	IgG1	CD8α	(Davis, y col. 1989. <u>Am. Fish. Soc. Symp.</u> 7: 521-540.)
MM1A	IgG1	CD3	(Rhodes, y col. 2001. <u>J. Immunol.</u> 166: 5604-5610)
BAQ15A	IgM	Linfocitos B CD21	(Mukwede, y col. 1993. <u>Vet. Immunol. Immunopathol.</u> 39: 177-186)
CACT116A	IgG1	CD25 (IL-2Ra)	(Naessens y col. 1992. <u>Immunology</u> 76: 305-309.)
CACT63A	IgG1	Linfocitos T γδ	(Davis, y col. 1996. <u>Vet. Immunol. Immunopathol.</u> 52: 301-311)

Como se representa en las Fig. 4A-4D, se examinaron en los subconjuntos de linfocitos T y/o linfocitos B estimulados con antígeno mediante citometría monocolor las diferencias en el porcentaje de subconjuntos de linfocitos CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺ (CD3⁺ se representa en la Fig. 5), CD21⁺ y CD25⁺, así como de linfocitos γδ⁺ en cultivos de PBMC de ambos grupos de excreción y controles sanos después de la estimulación con cada antígeno recombinante (Fig. 4 y 5). Todos los subconjuntos de linfocitos investigados en este estudio aumentaron pero, dependiendo de los niveles de excreción bacteriana, hubo ligeras diferencias ($P < 0,05$) entre ganado vacuno no infectado y animales con excreción baja según los antígenos recombinantes.

CD3 es un panmarcador de linfocitos T que se expresa por células CD4⁺ y CD8⁺ así como linfocitos T γδ⁺. La proporción de linfocitos T CD25⁺ aumentaba en el cultivo independientemente del antígeno recombinante usado ($P < 0,05$) (Fig. 4C). Estos resultados sugieren que todos los antígenos usados en este estudio son capaces de estimular linfocitos T sensibilizados.

Aunque todos los antígenos recombinantes ensayados aumentaban la proporción de células CD4⁺ en cultivos de PBMC bovinas de ganado vacuno infectado en comparación con controles no infectados ($P < 0,05$), 85A y 85B aumentaban la proporción de linfocitos T CD4⁺ a niveles significativamente mayores que 85C, la proteína de 35 kDa y SOD ($P < 0,05$) (Fig. 4A). La proporción de linfocitos T CD4⁺ era también mayor en los cultivos tratados con 85A y 85B entre las PBMC de animales con excreción media que de animales con excreción baja ($P < 0,05$) (Fig. 4A). Adicionalmente, 85A y 85B no aumentaban los linfocitos T CD4⁺ en ganado vacuno no infectado. Aun sin pretender limitarse a teoría particular alguna, estos resultados pueden indicar que los antígenos de 85A y 85B inducen linfocitos T CD4⁺ sensibilizados específicamente por MTP y proporcionan inmunidad protectora frente a infección por MTP al mantener poblaciones de linfocitos T CD4⁺ en circulación en la fase infecciosa temprana, concretamente, en el momento en que ocurre por primera vez la colonización mucosa por MPT.

En contraposición con el aumento de células CD4⁺ inducido por todos los antígenos respecto a los controles no infectados, se encontró un aumento significativo en la proporción de linfocitos T CD8⁺ solo en cultivos tratados con 85A, 85B y 85C, y la proporción de células CD8⁺ era también mayor en cultivos tratados con 85A y 85B entre las PBMC de animales con excreción media que de animales con excreción baja ($P < 0,05$) (Fig. 4B). Por tanto, estos antígenos pueden estimular preferiblemente las respuestas mediadas por células.

Solo SOD fue capaz de aumentar significativamente la proporción de linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ en los cultivos de animales con excreción media ($P < 0,05$) (Fig. 4D). Sin embargo, SOD estimulaba linfocitos en un menor grado que los demás antígenos ensayados, excepto por los linfocitos $\gamma\delta$ ⁺, ya que el número de linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ era significativamente mayor en cultivos de PBMC tratados con SOD en ganado vacuno no infectado, así como en ambos grupos de excreción (Fig. 4D). Por tanto, SOD puede estimular preferiblemente linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ en comparación con los demás antígenos. Adicionalmente, debido a que los linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ son numerosos en los tejidos de mucosa, que son el punto de entrada de patógenos micobacterianos, el antígeno de SOD puede ser importante en las etapas más tempranas de la infección mediante su estimulación preferida de linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺.

Todos los antígenos recombinantes ensayados aumentaban significativamente la proporción de linfocitos B CD21⁺ en cultivos de PBMC bovinas de animales con excreción baja y media en comparación con controles no infectados ($P < 0,05$) (Fig. 6). De forma interesante, la proporción de linfocitos B CD21⁺ era significativamente mayor en cultivos de PBMC bovinas de animales con excreción media que de los demás antígenos recombinantes ensayados ($P < 0,05$).

Ejemplo 5

Este ejemplo proporciona una comparación de la estimulación de la producción de ARNm de citocina en PBMC bovinas después de la estimulación con antígenos recombinantes.

Para la preparación de ARN y el tratamiento con ADNasa I de las células, se obtuvieron sedimentos celulares de PBMC y se lavaron dos veces con 50 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS), se sedimentaron y se lisaron 5×10^6 células con 350 μ l de tampón de lisis según las recomendaciones del fabricante (RNeasy mini kit, Qiagen, CA), y se mantuvieron a -80°C hasta la extracción de ARN y la síntesis de ADN complementario (ADNc). Se extrajo el ARN total (ARNt) de las células lisadas o PMBC usando el RNeasy mini kit (Qiagen). Se trató el ARNt extraído con 10 U/ μ l de ADNasa I exenta de ARNasa a 37°C durante 10 min, seguido de inactivación térmica a 95°C durante 5 min y se enfrió entonces en hielo.

Para la síntesis de ADNc, se efectuó una transcripción inversa (TI) en un volumen final de 20 μ l que contenía 1,6 μ l de ARN total, 200 U de TI Superscript II (GibcoBRL), Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 0,01 M y dNTP 0,5 mM. Se sometió la mezcla de reacción a 42°C durante 50 min y se inactivó a 70°C durante 15 min. Se analizó el ADNc inmediatamente o se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para efectuar un análisis cuantitativo instantáneo (PCR-TI), se transcribieron de forma inversa aproximadamente 1 a 5 μ g de ARN total de cada grupo de tratamiento usando la transcriptasa inversa Superscript, hexámeros aleatorios y reactivos de transcriptasa inversa (Gibco BRL). Se diseñaron los cebadores y sondas instantáneos mediante el software Primer Express (Applied Biosystems) usando las secuencias de GAPDH bovina, citocinas y factores de crecimiento obtenidos de Genbank. Se marcaron las sondas internas con el tinte informador fluorescente 5-carboxifluoroscéina (FAM) en el extremo 5' y el tinte inactivador N',N',N',N' -tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA) en el extremo 3'. La mezcla de PCR consistía en cebadores 400 nM, sonda Taqman 80 nM y PCR Mastermix disponible comercialmente (TaqMan Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems) que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, trifosfatos de desoxinucleótidos 2,5 mM, 0,625 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold por reacción, 0,25 U de AmpErasw UNG por reacción y 10 μ l de muestra de ADNc diluida en un volumen final de 25 μ l. Se dispusieron las muestras en placas de 96 pocillos y se amplificaron en un fluorómetro automatizado (ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación eran 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Se realizó la cuantificación final usando el procedimiento de umbral de ciclo comparativo (U_c) y se notifica como la transcripción relativa o la diferencia en nº de veces respecto a un ADNc calibrador.

Como puede observarse en la Fig. 7, todos los antígenos recombinantes estimulaban altos niveles de ARNm de IL-2

a partir de PBMC de animales con excreción media, teniendo el complejo antigénico 85 mayor efecto que la proteína de 35 kDa o SOD ($P<0,05$) (Fig. 7). 85A inducía también un alto nivel de ARNm de IFN- γ , IL-12p40 y TNF- α (Fig. 8A, B y C, respectivamente) en animales de excreción media ($P<0,05$). Sorprendentemente, las PBMC estimuladas con el antígeno de proteína de 35 kDa expresaban en gran medida ARNm de IL-4 tanto en animales de excreción baja como media ($P<0,05$) (Fig. 9). Esta inducción del ARNm de IL-4 por la proteína de 35 kDa aumentaba significativamente dependiendo de los niveles de excreción ($P<0,001$). En contraposición, no se observaron diferencias significativas entre los demás antígenos ($P>0,05$). Estos estudios están de acuerdo con los resultados presentados en el Ejemplo 3, que indican que las respuestas inmunitarias ante la proteína de 35 kDa pueden ser más importantes en la etapa tardía de la enfermedad, puesto que el análisis de citometría de flujo mostró que la proteína de 35 kDa inducía fuertemente la proliferación de linfocitos B, especialmente en animales con excreción media (Fig. 3). Por tanto, este ejemplo demuestra que todos los antígenos recombinantes ensayados pueden estimular una respuesta inmunitaria mediada por célula.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra el efecto de vacunar ratones con polinucleótidos de ADN que codifican antígenos de MPT y aplicar infección con WIT posteriormente.

Para demostrar el efecto de las construcciones de ADN, se obtuvieron ratones C57/BL6 hembra exentos de patógenos específicos de Harlan Sprague Dawley Inc (Indianápolis, IN). Los ratones eran de 8 semanas de edad en el momento de la vacunación. Había cinco grupos de ratones y cada grupo de vacuna consistió en 25 animales durante este experimento. Se alimentaron los animales con pienso de ratones comercial y agua a voluntad, y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas.

Se usó el plásmido de expresión eucariótica comercialmente disponible pVR1020 (Vical, Inc., San Diego, Calif.) para la vacuna de ADN. Este plásmido contiene un promotor de citomegalovirus inmediato-temprano para asegurar una expresión eficaz en un hospedador eucariótico, así como la señal de secreción de activador de plasminógeno de tejido humano (hTPA) para facilitar la secreción del antígeno diana de la célula eucariótica (Brandt, y col. 2000. *Infect. Immun.* 68: 791-795). Se amplificó ADN que codifica los genes de MPT 85A, 85B, 85C, SOD, 35kDa, 35kDa(Li), MptC, MptD y similar a ESAT-6 mediante reacción en cadena de la polimerasa a partir de ADN genómico de MPT usando los cebadores específicos de gen enumerados en la Tabla 1. Brevemente, los cebadores usados para la amplificación de las secuencias de codificación de MPT 85A, 85B y 85C incluían cada uno un sitio BamHI. Un cebador para la amplificación de secuencias de codificación de SOD, MptC, MptD, 35kDa y similar a ESAT6 incluía un sitio BamHI, mientras que el otro incluía un sitio BglII. Se digirieron los productos de amplificación usando las enzimas de restricción indicadas y se clonaron en el vector de clonación pCR2.1 TOPO comercialmente disponible (Invitrogen, CA) usando técnicas estándar. Se subclonaron entonces los genes de MPT en dirección 3' de la señal de secreción de activador de plasminógeno de tejido humano (hTPA) en el plásmido pVR1020 (Vical, Inc., San Diego, Calif.) usando técnicas estándar y esencialmente como se describe anteriormente (Dheenadhayalan y col., (2002) *DNA Seq.* 13: 287-294; Shin y col., (2004) *J. Vet. Sci.* 5: 111-117) (Skeiky y col., (1998) *J. Immunol.* 161: 6171-6179). Se transfectaron estas construcciones recombinantes en células HEK-293 (riñón embrionario humano) usando el reactivo de transfección Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, CA) y se confirmó la expresión del antígeno a nivel de transcripción usando PCR-TI.

Para inmunización y aplicación de la infección por MPT, se dividieron los ratones en cinco grupos diferentes (Tabla 3). Se administró a los ratones 50 μ g de cada ADN en 50 μ l de PBS por dosis mediante inyección intramuscular. Se inmunizaron los ratones tres veces a intervalos de 3 semanas. Se inyectaron adicionalmente genes de IL-12 como se indica en la Tabla 3. Tres semanas después de los segundos recuerdos, se aplicó la infección a los animales mediante la inyección intraperitoneal de 10^9 unidades UFC de MPT. Se sacrificaron 6 animales de cada grupo en la 4^a, 8^a, 12^a y 16^a semanas después de la aplicación de la infección y se enumeró la recuperación de bacterias de órganos (hígado, bazo, nódulo linfático mesentérico, pulmón) en agar inclinado en yema de huevo de Herrold (HEY) suplementado con micobactina J y antibióticos como se describe anteriormente (Kamath, y col. *Infect. Immun.* 67: 1702-1707). Después de la aplicación de la infección, se recogieron también las heces cada semana de las jaulas de los ratones y se cultivaron usando el mismo agar. Se fijaron los cultivos, incluyendo hígado, bazo, pulmón, intestino y nódulo linfático mesentérico, mediante inmersión en formalina tamponada al 10% y se procesaron para examen histopatológico usando técnicas de histotecnología estándar. Se valoró la presencia de MPT (bacterias acidorresistentes) en el hígado y bazo de cada ratón mediante tinción de Ziehl-Neelsen.

Tabla 3

Grupos	1	2	3	4	5
Vacuna de ADN	85A, 85B 85C, 35kDa y SOD	Grupo 1 + IL-2	MptC, MptD similar a ESAT61 y 35kDa(Li)	Grupo 3 + IL-12	Control de vector (pVR1020)

La Fig. 10 muestra la carga micobacteriana reducida en los hígados y bazos de ratones vacunados respecto a los

controles a las 4, 8 y 12 semanas después de la aplicación de la infección, y muestra una reducción de aproximadamente un 90% (1 log 10) de la carga bacteriana en los bazo y hígados de ratones vacunados con el cóctel de vacuna de ADN de MPT en comparación con los controles no inmunizados. Los datos de histopatología relativos a hígado y bazo a las 4, 8 y 12 semanas después de la aplicación de la infección eran análogos a los resultados de crecimiento bacteriano. Se observaron diferencias sustanciales en tejidos de hígado y bazo tomados de animales inmunizados con el cóctel de plásmido en comparación con ratones no inmunizados (Fig. 11). Los controles no vacunados infectados por MPT tenían numerosos granulomas dispersados aleatoriamente con macrófagos epitelioides centrales rodeados por linfocitos pequeños. La tinción de Ziehl-Neelsen reveló que se observaban numerosos bacilos acidorresistentes (Fig. 12A e inserto). En contraposición, la infección era mucho menos grave en ratones vacunados con el cóctel de vacuna de ADN de MPT (Fig. 12B).

Por tanto, este ejemplo demuestra que la administración de vectores de expresión de ADN que codifican al menos cinco antígenos de MPT puede proporcionar una protección significativa frente a infección por MPT.

Listado de secuencias

<110>	Chang, Y.F.
15 <120>	COMPOSICIONES PARA DESENCADENAR UNA RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA MYCOBACTERIUM AVIUM SUBESPECIE PARATUBERCULOSIS
<130>	018617.00120
<150>	US 60/653.536
<151>	16-02-2005
20 <160>	24
<210>	1
<211>	828
<212>	ADN
<213>	<i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>
25 <220>	
<223>	Secuencia de codificación de ADN de proteína de 35 kDa de MPT
<400>	1

atggccaatccgttcgtcaaggcgtggaagtacctgatggcgaagttcaacgccacgatac 60
gacgagcgcgcgcgaccccaaggtgcagatccaacaggccatcgaggaagcccagcgcacc 120
caccaggcgcgtgacccagcaggccgctcaggtcatcggaaccagcgccaactcgagatg 180
cggctcaaccgccagctcgccgacgtggagaagctgcaggtcaacgtgcgtcaggcgcctg 240
acgctggccgaccaggccaccgccgcccggcgacaccgccaaggccaccgagtacaacaac 300
gccgcccaggcgttcgccgcccagctgggtcaccgccgagcaaagcgtcgaagacctcaag 360
acgctgcacgaccaggcgcgtcaacgccgcccgcgaggccaagaaggcggtcgagcagaac 420
gcatggtgctgcagcagaagatcgccgagcgcaccaagctgctcagccagctcgaacag 480
gccaagatgcaggaacaggctcagcgcctcactgcagtcgatgagcgagctggccgcccc 540
ggcaacgtgcccagcctggacgaggtgcgcgacaagatcgagcggcgctacgccaacgcg 600
atcggggcccgcgaactggcacagggtccgtgcagggcaggatgctcgaggctcagcag 660
gccggcgtgcagatggccgggcattcccggctcgagcagatccgcgcctcgatgcggggac 720
gaggcgttgccgaccggaggcacaccggccgcccggcgccaccaggccgcccccgcgccc 780
ggccagggcgccggcgacgcgggtcagcgagaaaccacttggtcagtag 828

<210> 2

<211> 275

<212> PRT

5 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de la proteína de 35 kDa

<400> 2

Met	Ala	Asn	Pro	Phe	Val	Lys	Ala	Trp	Lys	Tyr	Leu	Met	Ala	Lys
				5					10					15
Phe	Asn	Ala	Thr	Ile	Asp	Glu	Arg	Ala	Asp	Pro	Lys	Val	Gln	Ile
				20					25					30
Gln	Gln	Ala	Ile	Glu	Glu	Ala	Gln	Arg	Thr	His	Gln	Ala	Leu	Thr
				35					40					45

Gln	Gln	Ala	Ala	Gln	Val	Ile	Gly	Asn	Gln	Arg	Gln	Leu	Glu	Met
				50					55					60
Arg	Leu	Asn	Arg	Gln	Leu	Ala	Asp	Val	Glu	Lys	Leu	Gln	Val	Asn
				65					70					75
Val	Arg	Gln	Ala	Leu	Thr	Leu	Ala	Asp	Gln	Ala	Thr	Ala	Ala	Gly
				80					85					90
Asp	Thr	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	Tyr	Asn	Asn	Ala	Ala	Glu	Ala	Phe
				95					100					105
Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Thr	Ala	Glu	Gln	Ser	Val	Glu	Asp	Leu	Lys
				110					115					120
Thr	Leu	His	Asp	Gln	Ala	Leu	Asn	Ala	Ala	Ala	Gln	Ala	Lys	Lys
				125					130					135
Ala	Val	Glu	Gln	Asn	Ala	Met	Val	Leu	Gln	Gln	Lys	Ile	Ala	Glu
				140					145					150
Arg	Thr	Lys	Leu	Leu	Ser	Gln	Leu	Glu	Gln	Ala	Lys	Met	Gln	Glu
				155					160					165
Gln	Val	Ser	Ala	Ser	Leu	Gln	Ser	Met	Ser	Glu	Leu	Ala	Ala	Pro
				170					175					180
Gly	Asn	Val	Pro	Ser	Leu	Asp	Glu	Val	Arg	Asp	Lys	Ile	Glu	Arg
				185					190					195
Arg	Tyr	Ala	Asn	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Gln	Gly	Ser
				200					205					210
Val	Gln	Gly	Arg	Met	Leu	Glu	Val	Glu	Gln	Ala	Gly	Val	Gln	Met
				215					220					225
Ala	Gly	His	Ser	Arg	Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Ala	Ser	Met	Arg	Asp
				230					235					240
Glu	Ala	Leu	Pro	Thr	Gly	Gly	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Gln
				245					250					255
Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Ala	Gly	Asp	Ala	Val	Ser	Glu
				260					265					270
Lys	Pro	Leu	Gly	Gln										
				275										

<210> 3

<211> 1782

<212> ADN

5 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

<220>

<223> Secuencia de ADN que codifica la proteína MptC

<400> 3

atgagcacgatgattcgttatttgcttgaattacttgacgaacgcggtcggcggtcacctt 60
 cgcgatgatgcttgcccttgaagccgcacaggggaattctgcagggactcggtttccttttc 120
 gtcgtaccgctgatgggtgtgctcatccacaagccggttgatacgcacgccctttgggtgc 180
 tggattgtggcgatcgccgtcgctgtcgctcgctcaccacggactgcttgctggagcacc 240
 tcgctgggttacctggtcggcacagatgtgctgaccagctttcacacccgcacggcaac 300
 catctcgccacgctgccaatcggctgggttcgcaccgatcgacccggaccgatcgggctg 360
 ctgctcagcaaggggaccatggacgtcgcgaccttcccgcgcacctgctgcggcatgtc 420
 atcgtgggtgtagccgcgctgccaccatgatcatcggaagctatgtgctggactggcgg 480
 gtcgggctcgcatcaccgcggcgcgctgctatgcgcactgacgcttcgactactcatg 540
 gtcgtcatccaccgcaacgacgaccagtagatcacgacatcgagtgaccgcgtcacgc 600
 atcgtcgagtacgcccgtcagcagccgacactgcgtgcatacggcgctcctgaaccggccc 660
 ggactgggaacgctagaggaatcgcttgctcgggaacagacttcgcagtcccgcttgacc 720

attcgcggcgcgtgggcgctcatcggattcttcggaaccgtccaactgggtggtgaccgcc 780
 atcatcgcgctcaccgtcgctctcgcagtaagcggcagccttgcgctttcgacgatggtc 840
 gggttgctgatcatcaccttgcgcatgatcgacccgatttctcagctcggcgatctcgcc 900
 ggccatgtccaggtcaacgcccagccatccgcccagtgctgaactgttgacgggtaccc 960
 ccgttgcccgaaccacccatccaggtcaagccacgggtgcccacatcgaattgcagggg 1020
 gttcgtttcgcttacgacggaggtcaaccacccatcgatgggtatcgacgccgtctttcca 1080
 caaggtagcctgactgccgtcgctcgccccgtctggcgcgggaaaaagcacgctgctcaa 1140
 ctaatcgggcgggttcttcgacgtcgacgaaggcagcatcaccatcggcgggtgcgacatc 1200
 cgccaactcggcaccgcccggctctcacatctcacggcgcaagttttccaagacgtgtac 1260
 ctctttgaaggcacaattgccgacaacctgcggatggccgatccgcaagccaccgatgat 1320
 gatctccgccacgtcgccacgatcagtcgcctcgacgaggtagtcgatcgcttcccaat 1380
 ggggtgggaaacccgcgttggtgaggcggggtcgacgctgtccggcggggaaaagcagcgt 1440
 gtctccatagcgcgcgcccctgctcaaagacgcaccggtagtactgctggacgaggcgacc 1500
 gcggcgctggatgccgccaatgagaccgccgtttccgacgctatccacgaactagcgcgt 1560
 gaccgcacagtcatcgttgctgcacaccgcctttcgaccgtggcggccgccgatcagata 1620
 ctgggtgctcgacggcggccggatcaccgagcgtggccggccacgacacactgggtgggtgcg 1680
 ggcggcacctacgcccgttctgggaagaacgaactcgcgcgaggggtggcaactgcgc 1740
 caaattgcgcccactcctgaactgcaggcacctcgaccatga 1782

<211> 593

<212> PRT

<213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

<220>

5 <223> Secuencia aminoacídica de la proteína MptC

<400> 4

Met	Ser	Thr	Met	Ile	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Glu	Arg
				5					10					15
Gly	Arg	Arg	His	Leu	Arg	Val	Met	Leu	Ala	Leu	Gln	Ala	Ala	Gln
				20					25					30
Gly	Ile	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Phe	Leu	Phe	Val	Val	Pro	Leu	Met
				35					40					45
Gly	Val	Leu	Ile	His	Lys	Pro	Val	Asp	Thr	His	Ala	Leu	Trp	Cys
				50					55					60
Trp	Ile	Val	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Val	Val	Ala	His	His	Gly	Leu
				65					70					75
Leu	Ala	Trp	Ser	Thr	Ser	Leu	Gly	Tyr	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Val
				80					85					90
Leu	Thr	Ser	Phe	His	Thr	Arg	Ile	Gly	Asn	His	Leu	Ala	Thr	Leu
				95					100					105
Pro	Ile	Gly	Trp	Phe	Arg	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Pro	Ile	Gly	Arg
				110					115					120
Leu	Leu	Ser	Lys	Gly	Thr	Met	Asp	Val	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	His
				125					130					135
Leu	Leu	Arg	His	Val	Ile	Val	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ala	Thr	Met
				140					145					150
Ile	Ile	Gly	Ser	Tyr	Val	Leu	Asp	Trp	Arg	Val	Gly	Leu	Ala	Phe
				155					160					165

Thr	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Thr	Leu	Arg	Leu	Leu	Met
Val	Val	Ile	His	Arg	Asn	Asp	Asp	Gln	Tyr	Asp	His	Asp	Ile	Gly
Val	Thr	Ala	Ser	Arg	Ile	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gln	Pro	Thr
Leu	Arg	Ala	Tyr	Gly	Val	Leu	Asn	Arg	Pro	Gly	Leu	Gly	Thr	Leu
Glu	Glu	Ser	Leu	Val	Arg	Gln	Gln	Thr	Ser	Gln	Ser	Arg	Leu	Thr
Ile	Arg	Gly	Ala	Trp	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Gly	Thr	Val	Val	Gln
Leu	Val	Val	Thr	Ala	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Val
Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Thr	Met	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Ile
Thr	Leu	Arg	Met	Ile	Asp	Pro	Ile	Ser	Gln	Leu	Gly	Asp	Leu	Ala
Gly	His	Val	Gln	Val	Asn	Ala	Asp	Ala	Ile	Arg	Arg	Val	Arg	Glu
Leu	Leu	Thr	Val	Pro	Pro	Leu	Pro	Glu	Pro	Thr	His	Pro	Gly	Gln
Ala	Thr	Gly	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Gln	Gly	Val	Arg	Phe	Ala	Tyr
Asp	Gly	Gly	Gln	Pro	Thr	Ile	Asp	Gly	Ile	Asp	Ala	Val	Phe	Pro
Gln	Gly	Ser	Leu	Thr	Ala	Val	Val	Gly	Pro	Ser	Gly	Ala	Gly	Lys
Ser	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu	Ile	Gly	Arg	Phe	Phe	Asp	Val	Asp	Glu
Gly	Ser	Ile	Thr	Ile	Gly	Gly	Cys	Asp	Ile	Arg	Gln	Leu	Gly	Thr
Ala	Gly	Val	Ser	His	Leu	Thr	Ala	Gln	Val	Phe	Gln	Asp	Val	Tyr
Leu	Phe	Glu	Gly	Thr	Ile	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Met	Ala	Asp	Pro
Gln	Ala	Thr	Asp	Asp	Asp	Leu	Arg	His	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Arg
Leu	Asp	Glu	Val	Val	Asp	Arg	Leu	Pro	Asn	Gly	Trp	Glu	Thr	Arg
Val	Gly	Glu	Ala	Gly	Ser	Thr	Leu	Ser	Gly	Gly	Glu	Lys	Gln	Arg
Val	Ser	Ile	Ala	Arg	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Pro	Val	Val	Leu
Leu	Asp	Glu	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Asn	Glu	Thr	Ala
Val	Ser	Asp	Ala	Ile	His	Glu	Leu	Ala	Arg	Asp	Arg	Thr	Val	Ile
Val	Val	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Asp	Gln	Ile
Leu	Val	Leu	Asp	Gly	Gly	Arg	Ile	Thr	Glu	Arg	Gly	Arg	His	Asp
Thr	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr	Tyr	Ala	Arg	Phe	Trp	Glu	Glu
Arg	Thr	Arg	Ala	Arg	Gly	Trp	Gln	Leu	Arg	Gln	Ile	Ala	Pro	Thr
Pro	Glu	Leu	Gln	Ala	Pro	Arg	Pro		580					585

<210> 5

<211> 288

<212> ADN

5 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

<220>

<223> Secuencia de ADN que codifica la proteína similar a ESAT-6

<400> 5

atgtccgacccgatcacttacaacccgggcgcggtggccgacttcgccaccgacgtcgcc 60
 tcccgcgcggccagttgcagtccattttcgacgacacctccaaccgcacgcacgccctg 120
 caggaattcttcgccgggcacggcgcgctcgggctttttcgaggcgcaggcccagatgctg 180
 tccgggctgcaggggctcatcgacacgatccgccagcacgggcagaccacctcgacgtg 240
 ctggacagcgcgatcagcacggaccagcacatcgccggcctgttctga 288

<210> 6

<211> 95

5 <212> PRT

<213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de la proteína similar a ESAT-6

<400> 6

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

10

<210> 7

<211> 627

<212> ADN

<213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

15 <220>

<223> Secuencia de ADN que codifica la proteína MptD

<400> 7

atgacggccactagctcgacgacccagtcagtcgccgcatcgacgtccggatgagcgcc 60
 agggatctcatcaacatcggggtcttcggcgctctctacatcgccactgtgttcgcgatc 120
 aacgtgttcgctttcatcaatccgctcgatgttggtcgccctggcggtcagcatgatc 180
 gccggcggtgcccgttcatgttggtcctcaccgggtgacatgcgggcatggtgacg 240
 gtgtttgagattatcacggccggactgctcgactgaccgggcacccccgatctgcttc 300
 gtgatcacagttgctgctggtggccgaagtcgtcctgtggctgggacgctatcgc 360
 tcccgacccatgggtgtactggcgtagcaatctacggcggtgttacatcgggccgctg 420
 ctgccatcttctacgctcgcatgaatatttctccagtcgccggcatggcacagatgggt 480
 ccgctacctcgaagagatggaacgggtgtgtgctgccagccgtgctaatacgcatcgcac 540
 ctgtccacgggtggtattcgggctgatcgccggactgctcggagtaagggtgctgcgcaag 600
 cttttcagagggccggcctagcttga 627

<210> 8

<211> 208

<212> PRT

5 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de MptD

<400> 8

Met	Thr	Ala	Thr	Ser ₅	Ser	Thr	Thr	Gln	Ser ₁₀	Ser	Arg	Arg	Ile	Asp ₁₅
Val	Arg	Met	Ser	Ala ₂₀	Arg	Asp	Leu	Ile	Asn ₂₅	Ile	Gly	Val	Phe	Gly ₃₀
Ala	Leu	Tyr	Ile	Ala ₃₅	Thr	Val	Phe	Ala	Ile ₄₀	Asn	Val	Phe	Ala	Phe ₄₅
Ile	Asn	Pro	Leu	Val ₅₀	Met	Leu	Val	Ala	Leu ₅₅	Ala	Val	Ser	Met	Ile ₆₀
Ala	Gly	Gly	Val	Pro ₆₅	Phe	Met	Leu	Phe	Leu ₇₀	Thr	Arg	Val	Arg	His ₇₅
Ala	Gly	Met	Val	Thr ₈₀	Val	Phe	Ala	Ile	Ile ₈₅	Thr	Ala	Gly	Leu	Leu ₉₀
Ala	Leu	Thr	Gly	His ₉₅	Pro	Pro	Ile	Cys	Phe ₁₀₀	Val	Ile	Thr	Val	Ala ₁₀₅
Cys	Ala	Leu	Val	Ala ₁₁₀	Glu	Val	Val	Leu	Trp ₁₁₅	Leu	Gly	Arg	Tyr	Arg ₁₂₀
Ser	Arg	Thr	Met	Gly ₁₂₅	Val	Leu	Ala	Tyr	Ala ₁₃₀	Ile	Tyr	Ala	Ala	Trp ₁₃₅
Tyr	Ile	Gly	Pro	Leu ₁₄₀	Leu	Pro	Ile	Phe	Tyr ₁₄₅	Ala	Arg	Asp	Glu	Tyr ₁₅₀
Phe	Ser	Ser	Pro	Gly ₁₅₅	Met	Ala	Gln	Met	Gly ₁₆₀	Pro	Arg	Tyr	Leu	Glu ₁₆₅
Glu	Met	Glu	Arg	Leu ₁₇₀	Leu	Ser	Pro	Ala	Val ₁₇₅	Leu	Ile	Ala	Phe	Asp ₁₈₀
Leu	Ser	Thr	Val	Val ₁₈₅	Phe	Gly	Leu	Ile	Gly ₁₉₀	Gly	Leu	Leu	Gly	Val ₁₉₅
Arg	Leu	Leu	Arg	Lys ₂₀₀	His	Phe	Gln	Arg	Ala ₂₀₅	Gly	Leu	Ala ₂₀₈		

<210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 5 <220>
 <223> Cebador directo de 85A
 <400> 9
 cgggatccatgatgaagcttgtcgaca 27
 <210> 10
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador inverso de 85A
 15 <400> 10
 cgggatcccttaggtgccctgg 21
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador directo de 85B
 <400> 11
 cgggatccatgacagatctg 20
 25 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 30 <223> Cebador inverso de 85B
 <400> 12
 cgggatcccttatccgcgcgcc 20
 <210> 13
 <211> 23
 35 <212> ADN

<213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador directo de 85C
 <400> 13
 5 cgggatccatgtcgttcacgaa 23
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 10 <220>
 <223> Cebador inverso de 85C
 <400> 14
 cgggatcctcaggtggcgggc 21
 <210> 15
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador directo de SOD
 20 <400> 15
 ggatcctgggactatgcagc 20
 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador inverso de SOD
 <400> 16
 agatctcagccgaagatcaggc 23
 30 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 35 <223> Cebador directo de 35 kDa

<400> 17
 cgggatcctatccgcgcc 20
 <210> 18
 <211> 26
 5 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador inverso de SOD
 <400> 18
 10 agatctcactgtactcatggaact 26
 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 15 <220>
 <223> Cebador directo de MptC
 <400> 19
 ggatcccgccggtcggcgt 18
 <210> 20
 20 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador inverso de MptC
 25 <400> 20
 agatcttcacgtcgaggtgcct 23
 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador directo de MptD
 <400> 21
 ggatcccgccgcacgcac 18
 35 <210> 22

<211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 5 <223> Cebador inverso de MptD
 <400> 22
 agatctcaagctaggccggc 21
 <210> 23
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 <220>
 <223> Cebador directo de similar a ESAT6
 <400> 23
 15 ggatccccgggccccggg 18
 <210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
 20 <220>
 <223> Cebador inverso de similar a ESAT6
 <400> 24
 agatcttcagaacaggccg 19

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende uno o más vectores de expresión para la fabricación de un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria en un rumiante contra *M. paratuberculosis*;
 en el que el uno o más vectores de expresión comprenden al menos cinco secuencias polinucleotídicas aisladas que codifican antígenos de *M. paratuberculosis*, y en el que los vectores de expresión son capaces de expresar dichos antígenos de *M. paratuberculosis*; y
 en el que los antígenos de *M. paratuberculosis* son los antígenos de *M. paratuberculosis* 85A, 85B, 85C, proteína de 35 kDa de *M. paratuberculosis* y superóxido dismutasa (SOD).
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el rumiante es un animal bovino, una oveja, una cabra, un ciervo o un alce.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que el rumiante es animal bovino.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el rumiante no está infectado por *M. paratuberculosis*.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el rumiante está infectado por *M. paratuberculosis*.
6. Uso según la reivindicación 3, en el que el animal bovino tiene la enfermedad de John.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el animal está preñado.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que la composición comprende adicionalmente un coadyuvante.
10. Una composición que comprende uno o más vectores de expresión para uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria contra *M. paratuberculosis* en un rumiante;
 en la que el uno o más vectores de expresión comprenden al menos cinco secuencias polinucleotídicas aisladas que codifican antígenos de *M. paratuberculosis*, en la que los vectores de expresión son capaces de expresar dichos antígenos de *M. paratuberculosis*; y
 en la que los antígenos de *M. paratuberculosis* son los antígenos de *M. paratuberculosis* 85A, 85B, 85C, proteína de 35 kDa de *M. paratuberculosis* y superóxido dismutasa (SOD).
11. La composición de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
12. La composición de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente un coadyuvante.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o de una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que la composición comprende un vector de expresión que comprende dichas al menos cinco secuencias polinucleotídicas aisladas, en el que dicho vector de expresión es capaz de expresar dichos al menos cinco antígenos de *M. paratuberculosis*.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o de una composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que la composición comprende al menos cinco vectores de expresión, en el que cada uno de dichos al menos cinco vectores de expresión comprende una diferente de dichas al menos cinco secuencias polinucleotídicas aisladas, y en el que cada uno de dichos al menos cinco vectores de expresión es capaz de expresar uno diferente de dichos al menos cinco antígenos de *M. paratuberculosis*.

Fig. 1

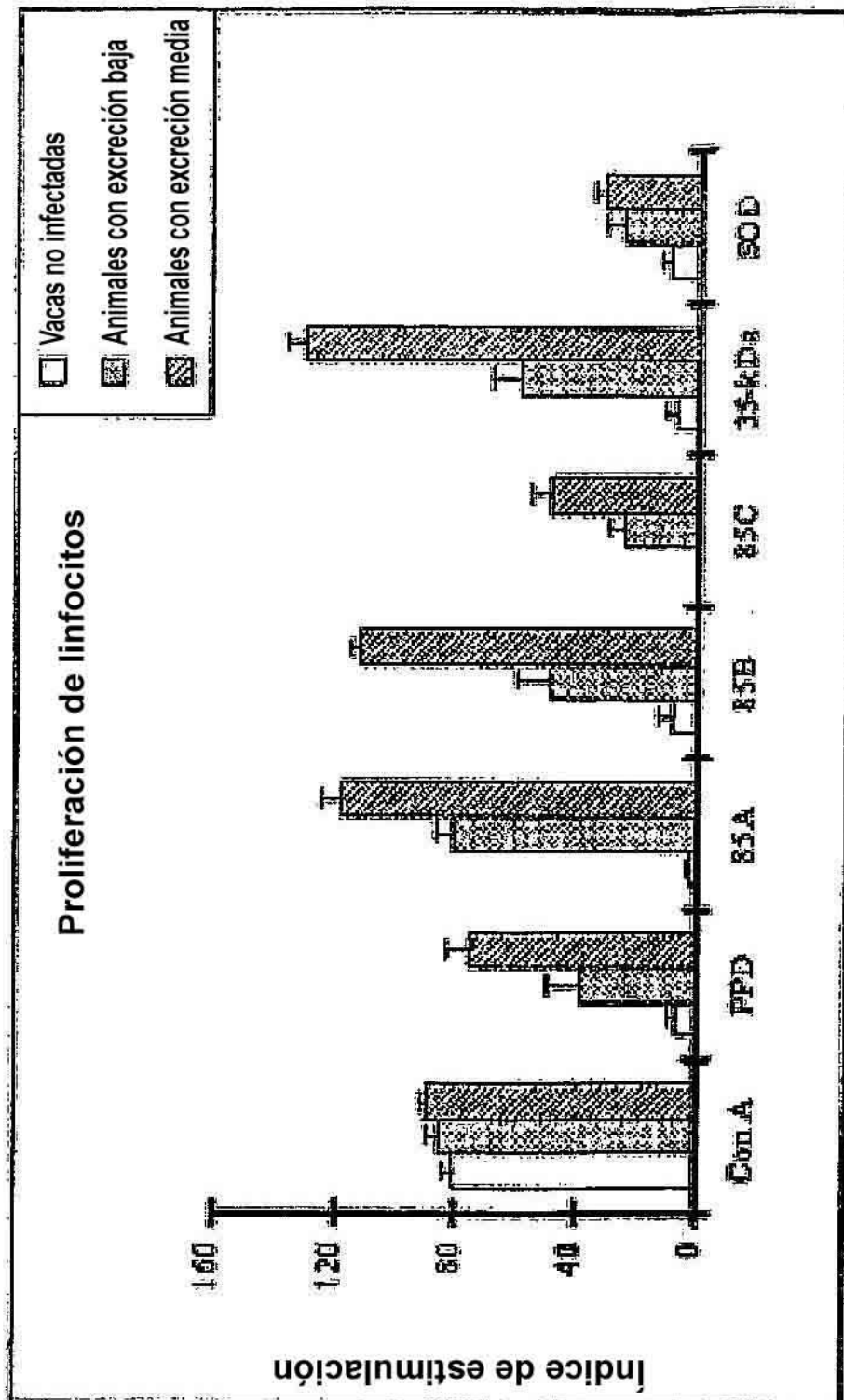


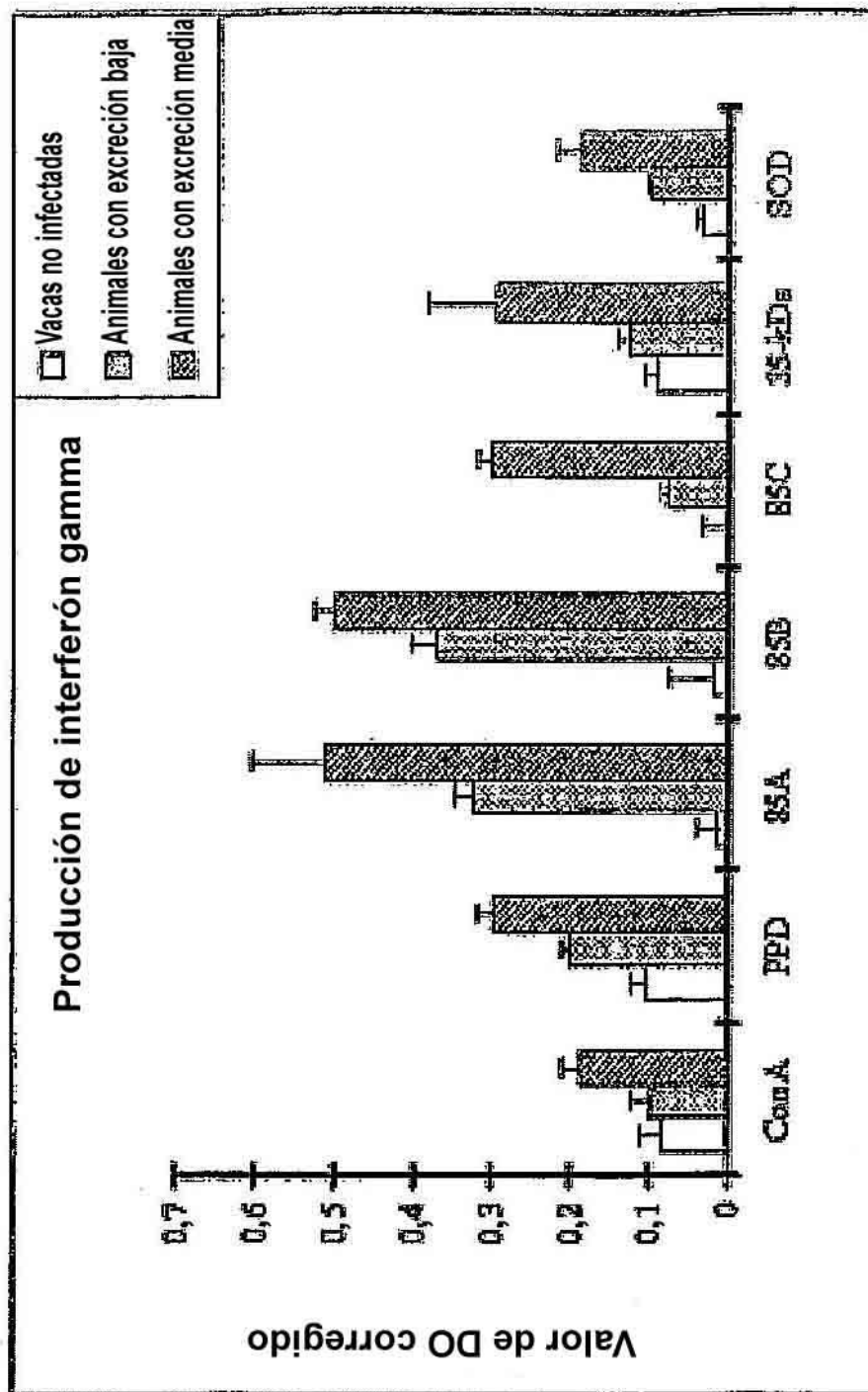
Fig. 2

Fig. 3

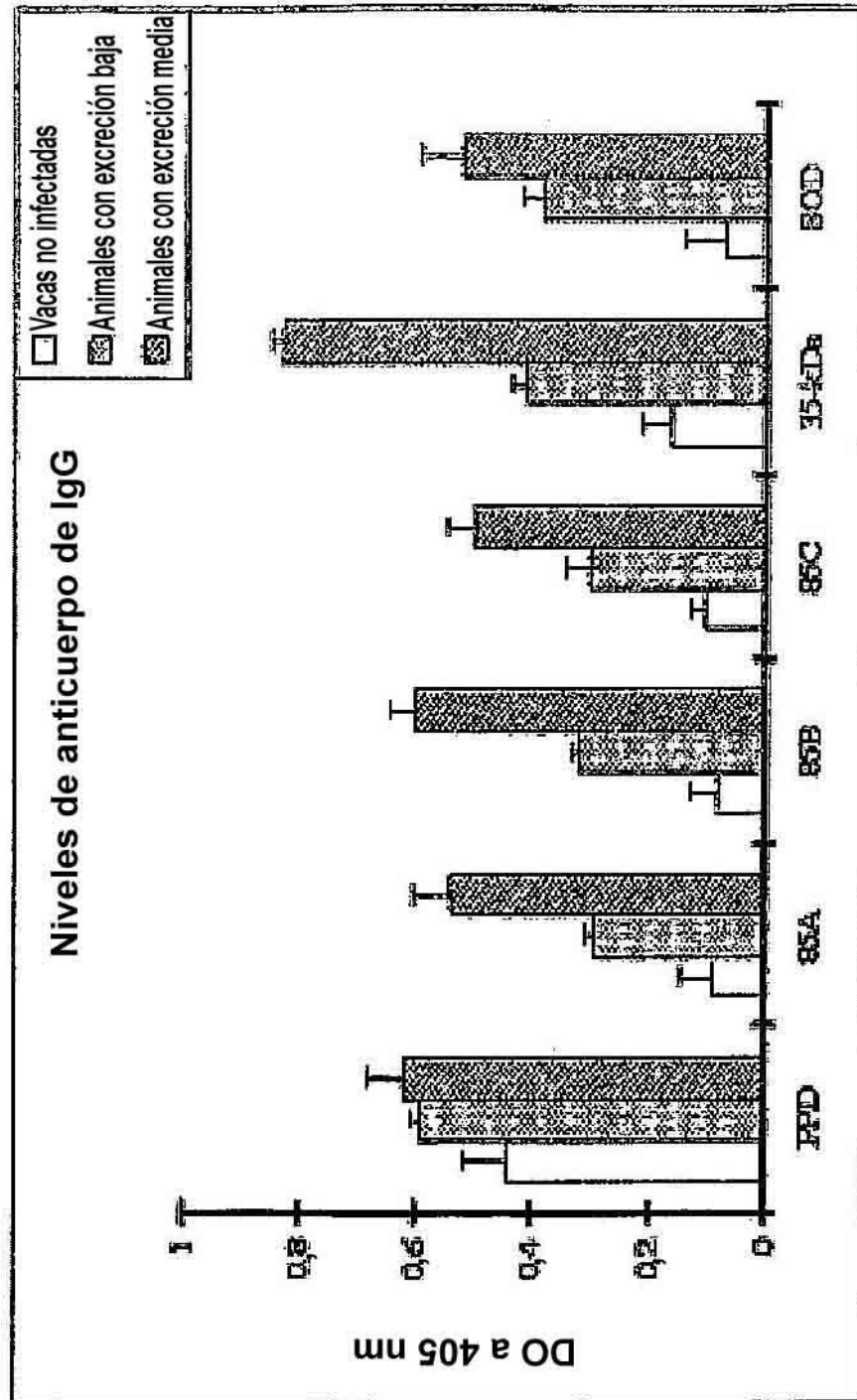


Fig. 4A

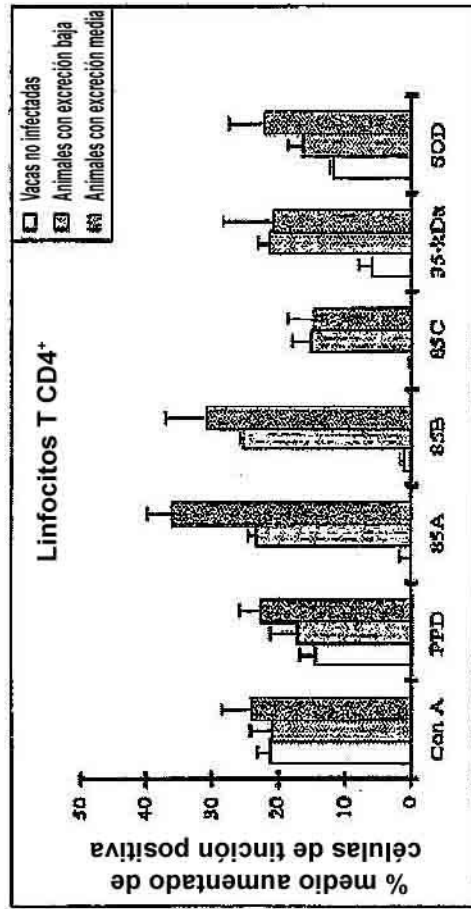


Fig. 4B

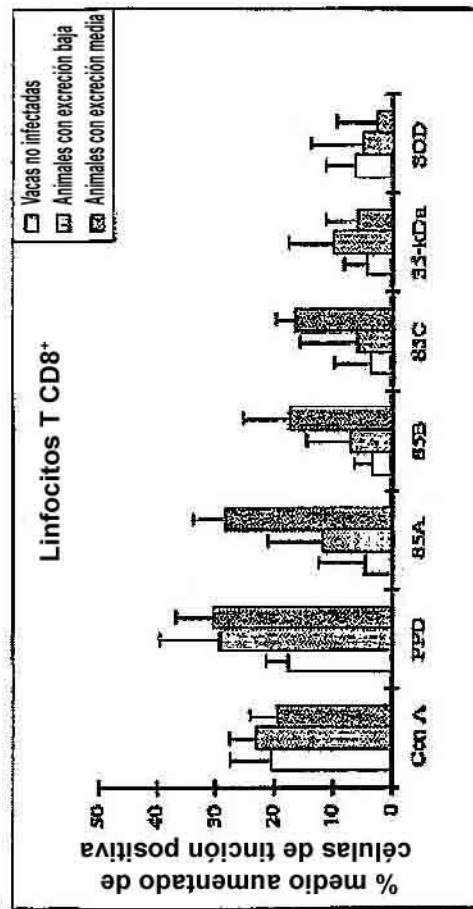


Fig. 4C

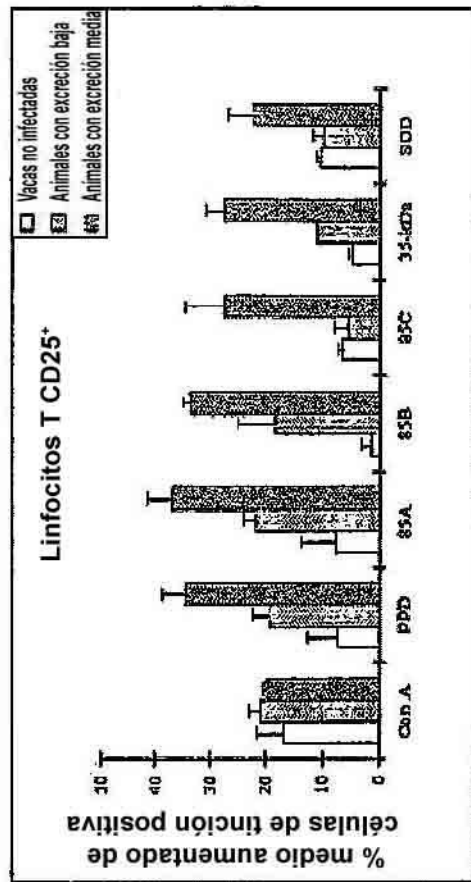


Fig. 4D

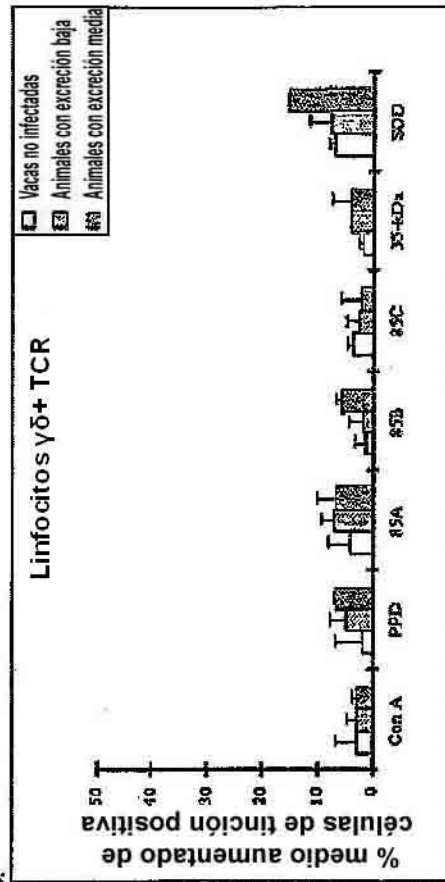


FIG. 4—Continuación

Fig. 5

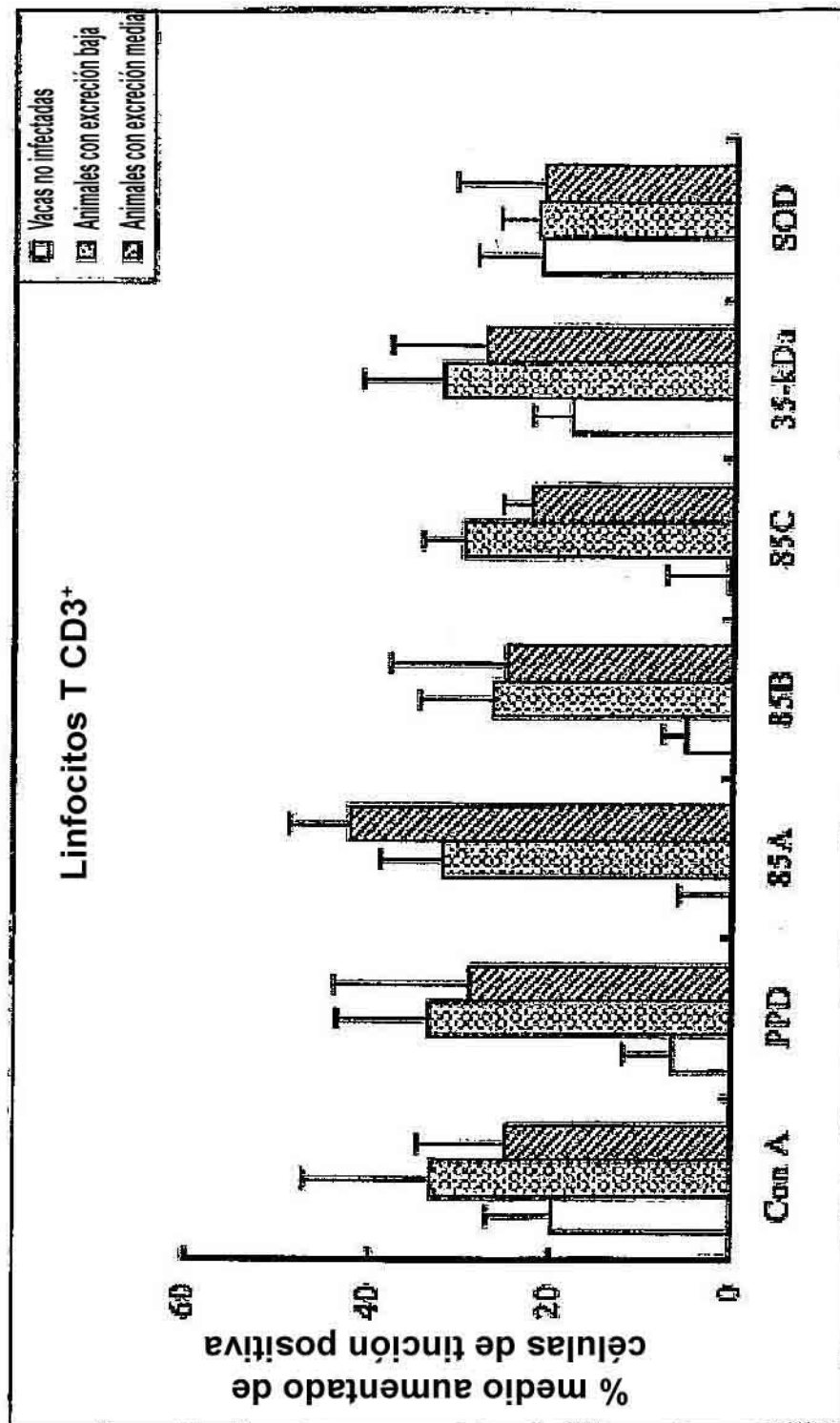


Fig. 6

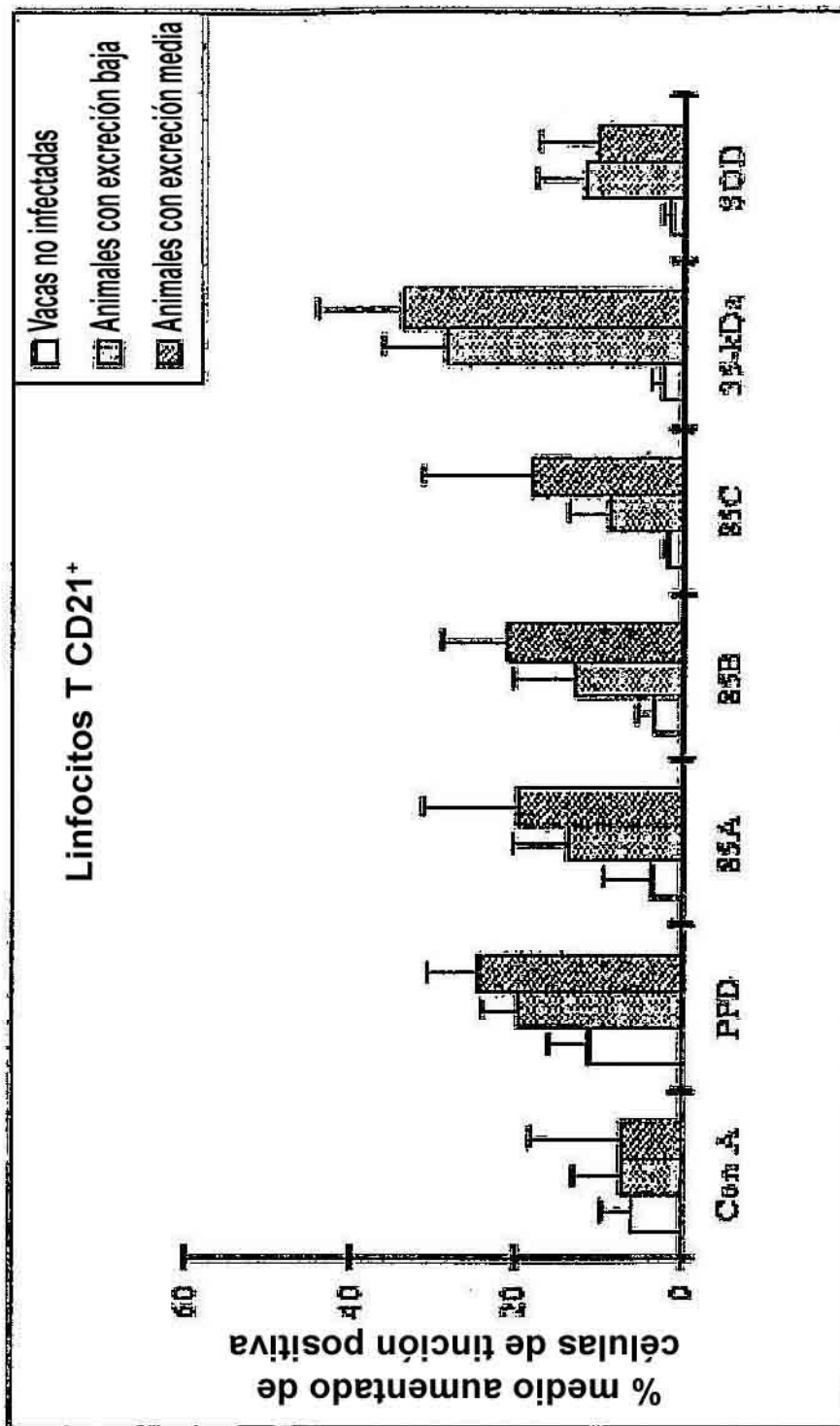


Fig. 7

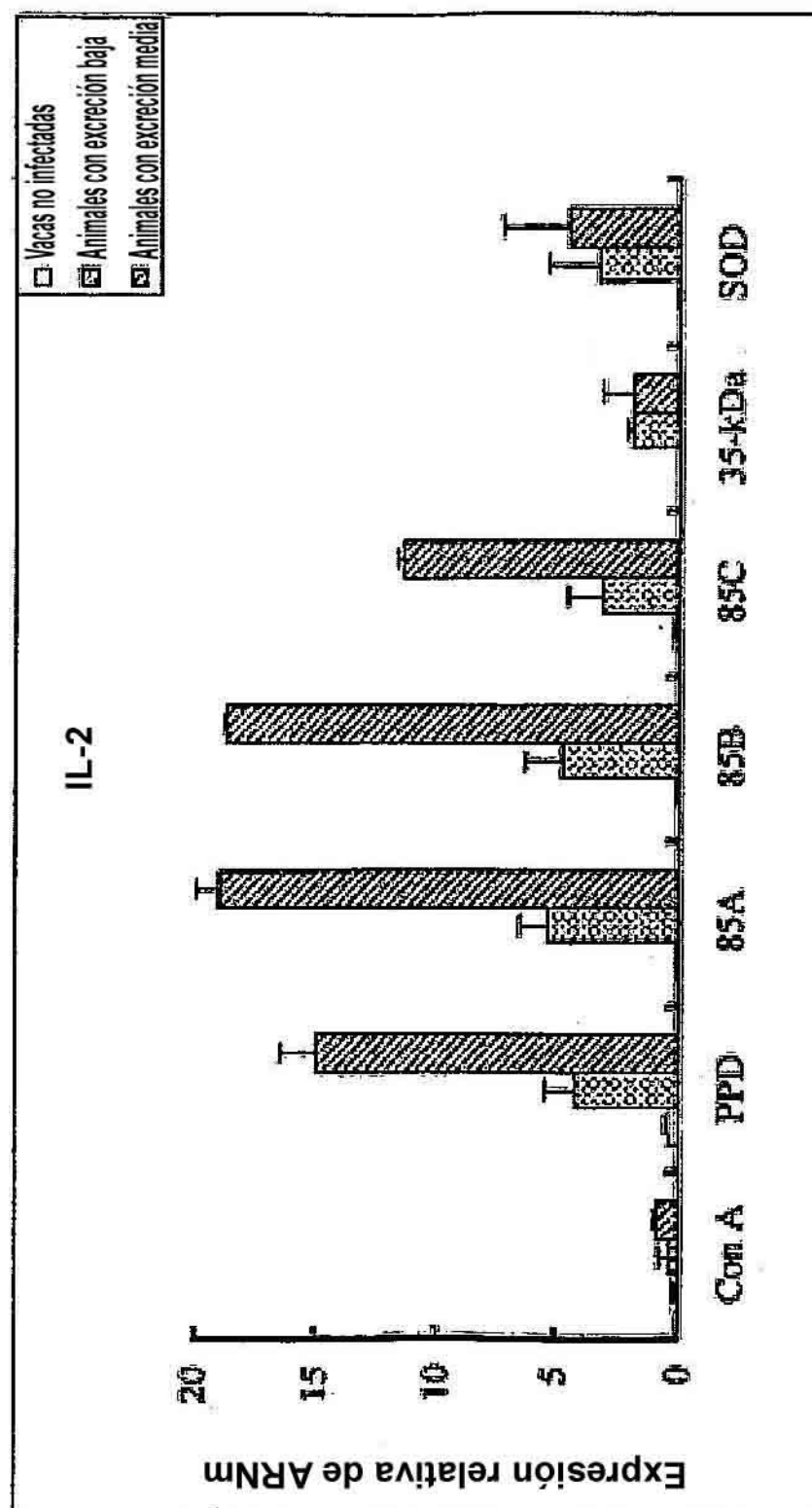


Fig. 9

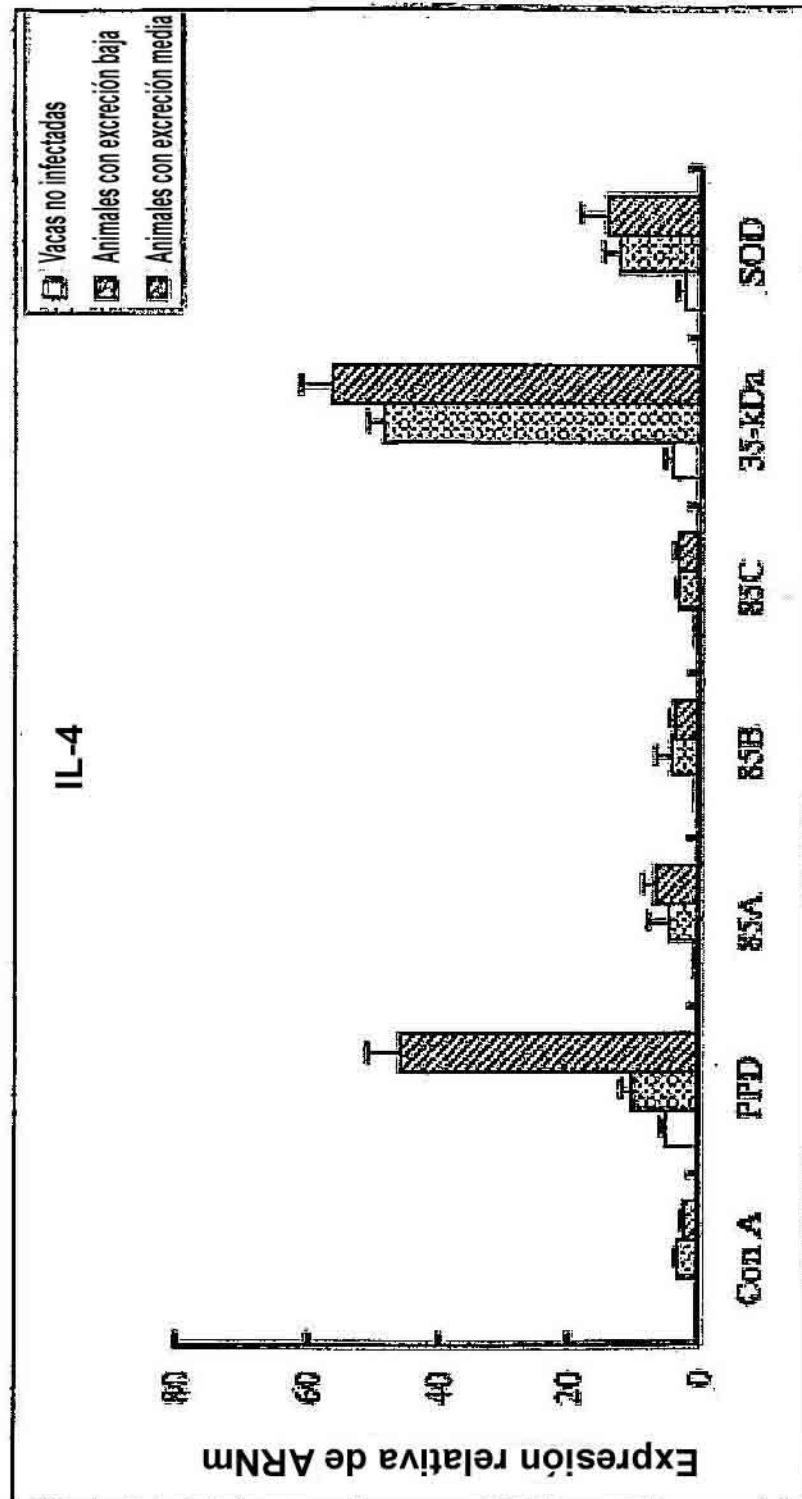


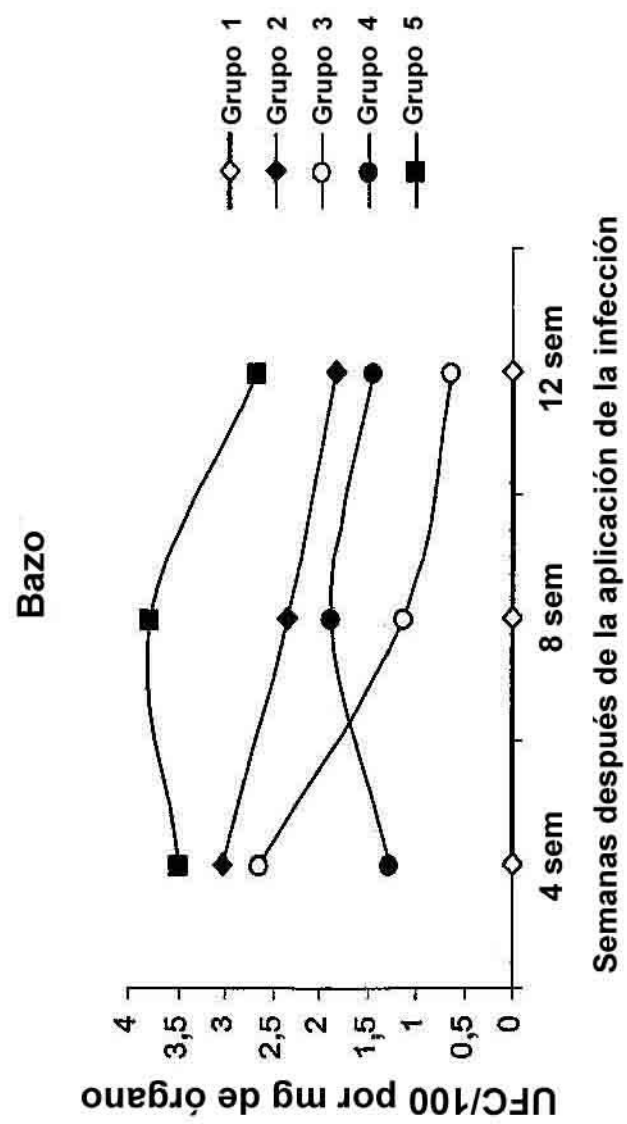
Fig. 10A

Fig. 10B

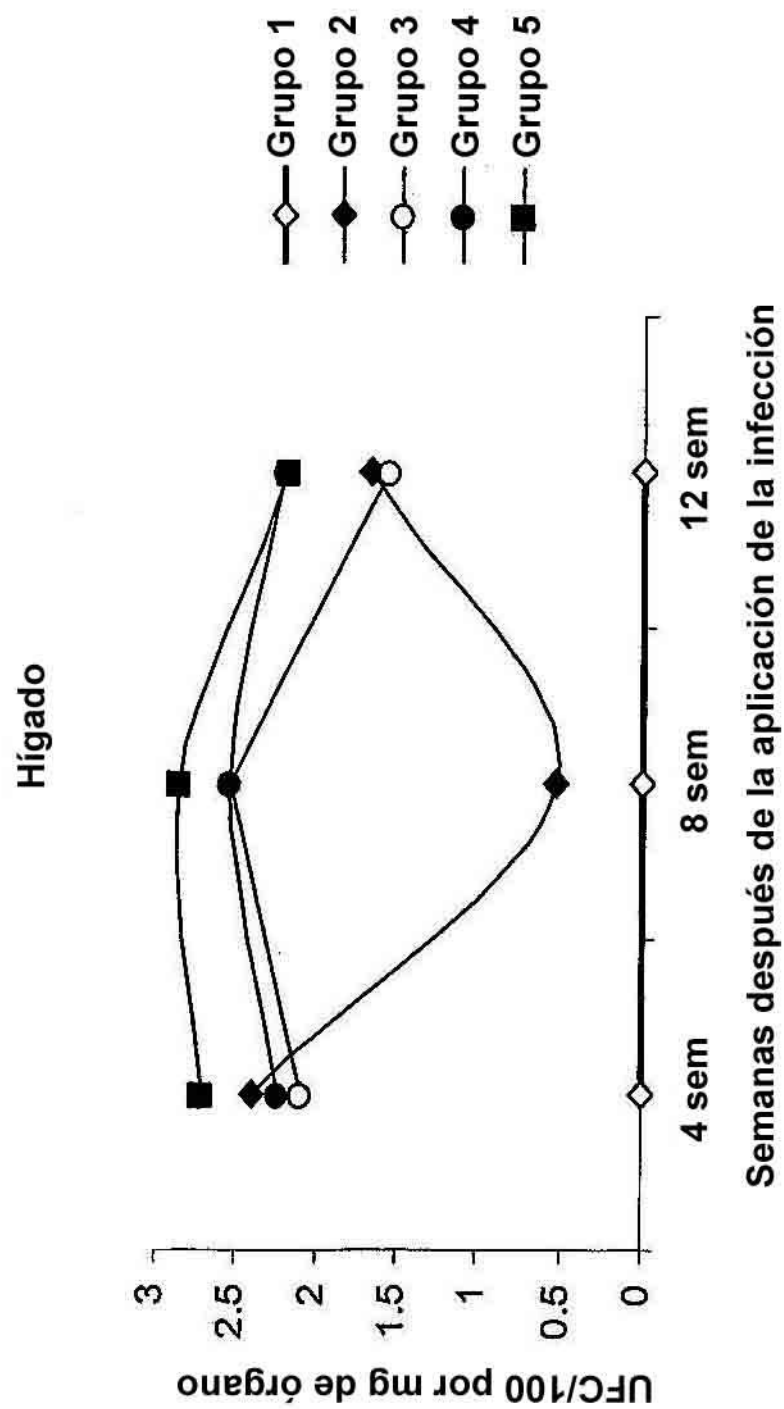


Fig. 11A

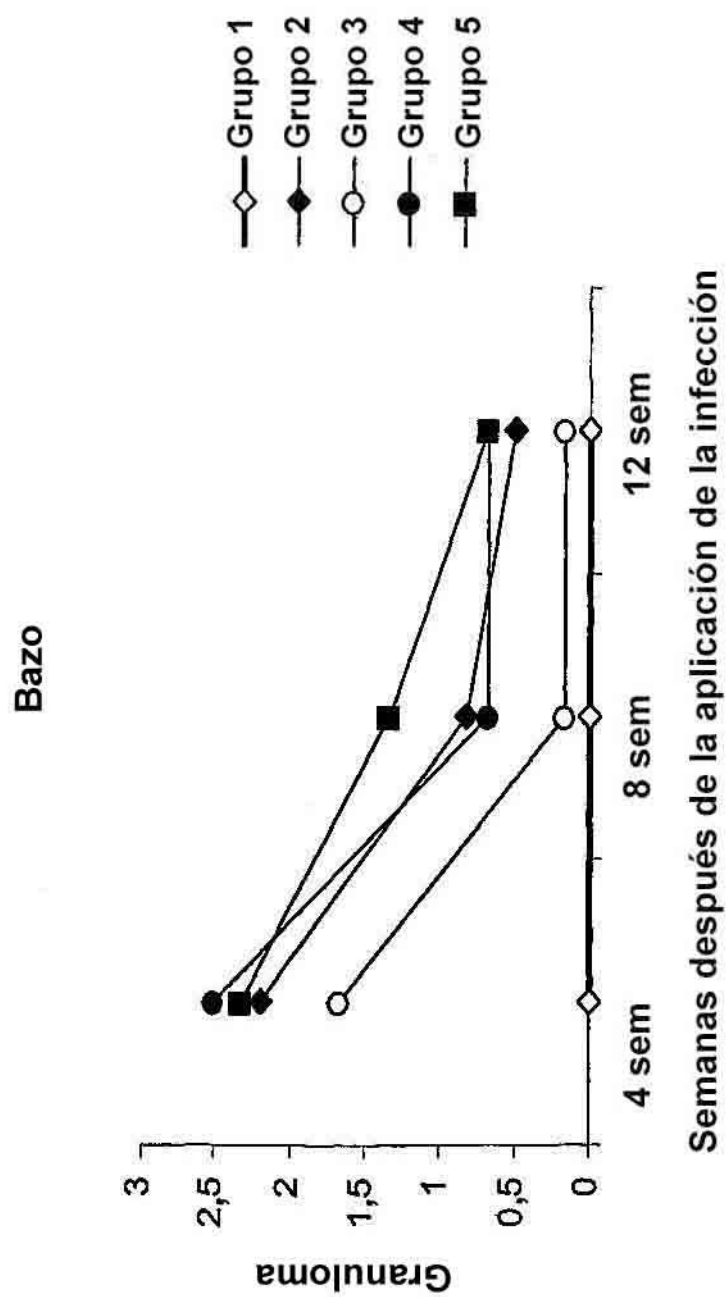
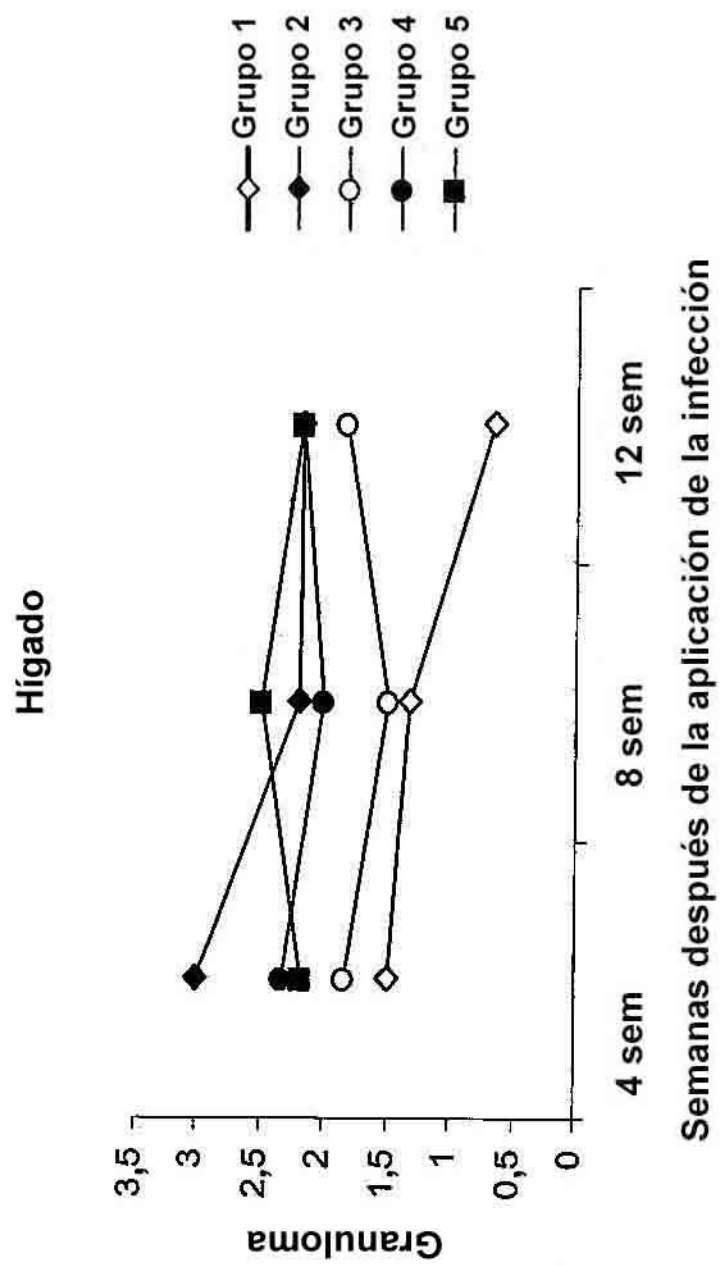
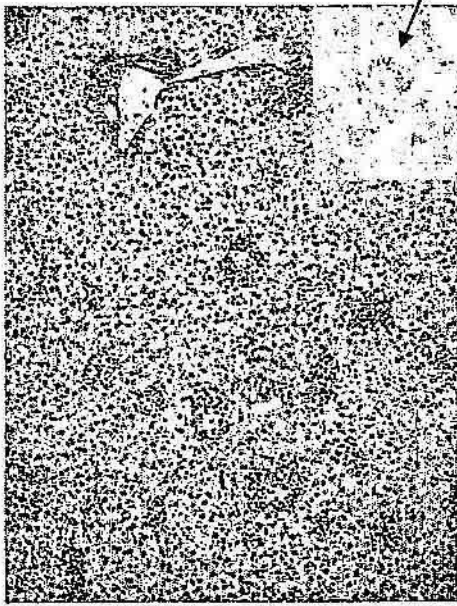


Fig. 11B





Bacteria
acidorresistente
ampliada

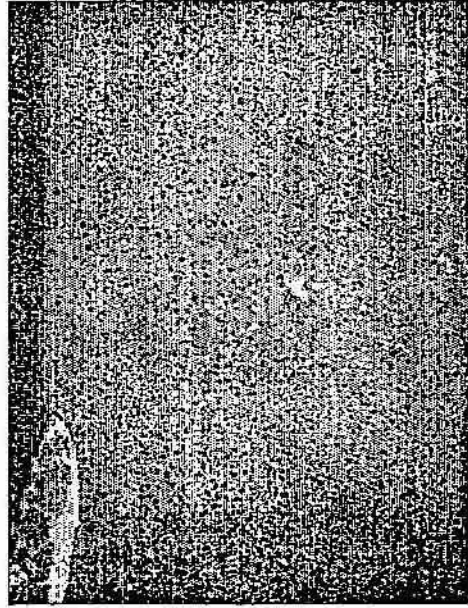


Fig. 12A

Fig. 12B