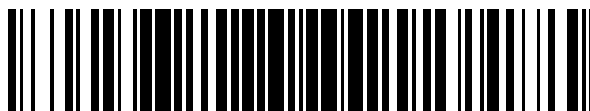


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 996**

51 Int. Cl.:
A61K 39/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08837410 .3**
96 Fecha de presentación: **09.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2200641**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Composiciones para producir una respuesta inmunitaria contra mycobacterium avium subespecie para tuberculosis**

30 Prioridad:
13.10.2007 US 979822 P
05.09.2008 US 94552 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.11.2012

73 Titular/es:
CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
395 PINE TREE ROAD SUITE 310
ITHACA, NY 14850, US

72 Inventor/es:
CHANG, YUNG-FU

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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).

ES 2 390 996 T3

DESCRIPCIÓN

Composiciones para producir una respuesta inmunitaria contra *Mycobacterium avium* subespecie para tuberculosis.

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) es el agente causal de la enfermedad de John (JD), que provoca enteritis granulomatosa crónica en rumiantes. Los animales afectados clínicamente desarrollan diarrea crónica y pérdida de peso progresiva que da como resultado inevitablemente la muerte, en tanto que los animales infectados sub-clínicamente presentan una disminución de la producción de leche. La JD tiene una importancia económica extraordinaria en la industria láctea mundial, provocando importantes pérdidas debido a la disminución de la producción y defectos prematuros en los animales con estimaciones de 20% de los rebaños lácteos estadounidenses afectados y costes de 220 millones de dólares al año para la industria láctea (Wells, et al. 2000. J. Am. Vet. Med. Assoc. 216: 1450-1457). El ganado es muy susceptible a infección con este organismo en los primeros 6 meses de vida, pero la enfermedad comúnmente no se vuelve evidente hasta los 3 a 5 años de edad. La infección ocurre por ingestión de estiercol, calostro o leche contaminada de vacas infectadas (Sweeney, 1996. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 12:305-312). La infección fetal también ocurre, particularmente en vacas preñadas con enfermedad avanzada (Sweeney, et al. 1992. Am. J. Vet. Res. 53:477—480). Además, la trascendencia de MAP se ha incrementado significativamente debido de su papel potencial como agente causante de la enfermedad de Crohn en personas (Chamberlin, et al. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15(3):337-46; Naser SA, et al., Mol Cell Probes 2002; 16(1):41-8).

La vacuna para JD aprobada actualmente para su uso en el campo es una suspensión oleosa de una cepa muerta de MAP, que tiene limitaciones significativas. Principalmente, la eficacia de esta vacuna es cuestionable con resultados variables en diferentes pruebas de vacunación. Otra preocupación es la interferencia de bacterinas de célula completa con las pruebas de diagnóstico, puesto que los animales vacunados tienen reacciones positivas falsas para tuberculosis y para-tuberculosis. Así, está aumentando la demanda de vacunas mejoradas, pero se necesita que sean potentes y al mismo tiempo no deben interferir con la diagnosis de la tuberculosis y la JD. Para lograr este objetivo, se han intentando varios procedimientos, que incluyen vacunas recombinantes, vacunas de ADN y vacunas de sub-unidades (13; Shin SJ, et al. Infect Immun 2005; 73(8):5074-85). Sin embargo, todavía existe la necesidad de desarrollar vacunas para MAP mejoradas.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 7.074.559 82 describe moléculas de ácido nucleico específicas de *Mycobacterium paratuberculosis* que comprenden una secuencia concreta, polipéptidos codificados por estas moléculas de ácido nucleico específicas de *M. paratuberculosis*, y anticuerpos que tienen una afinidad de unión específica por los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico específicas de *M. paratuberculosis*. También se describen los métodos de detección de *M. paratuberculosis* en una muestra utilizando las moléculas de ácido nucleico, los polipéptidos, y los anticuerpos descritos y describe los métodos para prevenir una infección por *M. paratuberculosis* basados en las moléculas de ácido nucleico, los polipéptidos, y los anticuerpos descritos.

La publicación de Li et al., "The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*", PNAS, Vol. 102, núm. 35, 30 de Agosto de 2005, págs. 12344-12349 se refiere a la provisión de un ensayo diagnóstico para la Enfermedad de John bovina. Ésta describe la secuencia genómica de un clon común de MAP así como secuencias específicas de MAP que es probable que sirvan como dianas potenciales para ensayos diagnósticos moleculares e inmunogénicos sensibles y específicos.

Finalmente, la publicación de de la solicitud de patente de los Estados Unidos Núm. 2007/0134274 A1 describe numerosos identificadores genómicos como dianas potenciales para vacunas y otros fármacos contra la enfermedad de John. Se describen métodos que se pueden utilizar para liberar un compuesto inmunizante en un mamífero y proporcionar una respuesta inmunitaria contra la enfermedad de John o de Crohn en el mamífero.

Compendio de la Invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos para estimular una respuesta inmunológica en mamíferos contra MAP. Las composiciones comprenden un nuevo polipéptido recombinante de 79 kDa referido en la presente memoria como "Map74F". Map74F fue generado al enlazar un fragmento C-terminal de ~17,6-kDa de la proteína Map3527 a un fragmento de la proteína Map1519, seguido en el extremo C durante una porción N-terminal de 14,6-kDa de la proteína Map3527.

Además de Map74F, las composiciones de la invención pueden también comprender otras proteínas de MAP, tales como proteínas de MAP 85A, 85B, 85C, 35kDa, SOD, MptC, MptD y proteína de tipo ESAT-6 y combinaciones de las mismas.

El método comprende administrar la composición a un mamífero en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunológica contra bacterias MAP. Se espera que el método sea beneficioso para cualquier mamífero susceptible de infección por MAP, pero es particularmente beneficioso para los ruminantes.

Las composiciones pueden ser formuladas con portadores farmacéuticos convencionales y pueden ser administradas vía cualquiera de una variedad de rutas convencionales. Las composiciones pueden ser administradas en cualquier momento a un animal susceptible a contraer infección por MAP o a un animal que está infectado con MAP. Sin embargo, es preferible administrar las composiciones antes de la infección por MAP, por ejemplo mediante administración a animales preñados que pueden transferir componentes inmunológicos profilácticos a sus neonatos vía calostro, o mediante administración durante el período de una a cinco semanas después del nacimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A proporciona una representación esquemática de un constructo de Map74F. El Map74F fue generado mediante la unión sucesiva desde su extremo N a su extremo C de los ORF que codifican un fragmento C-terminal de la proteína Map3527 unido a un ORF que codifica los aminoácidos 1-460 de la proteína de Map 1519, y que terminan con un ORF que codifica un fragmento N-terminal de Map3527. El ORF que codifica Map74F tiene 2397 nucleótidos (nt) y codifica un polipéptido de 799 aa con una masa molecular pronosticada de ~79 kDa.

La Figura 1B proporciona una representación fotográfica de SDS-PAGE al 10% teñida con azul de Coomassie de productos lisados de *E. coli* de *E. coli* (BL21/pLysE) transformados con un vector de expresión que codifica Map74F. Las células fueron cultivadas e inducidas con IPTG 1 mM. Las calles ilustran los productos lisados antes (calle UI) o 3 horas después (calle I) de la inducción con IPTG. El Map74F recombinante purificado es mostrado en la calle P junto con el marcador de masa molecular (calle M).

Las Figuras 2A - 2D proporcionan representaciones gráficas de datos obtenidos de ratones sacrificados 3 semanas después de la vacuna de refuerzo. Las células de bazo de ratones, a los que se había administrado Map74F+ monofosforil lípido A (MPL) y MPL solo fueron estimuladas por 2 días con 10 µg/ml de Map74F, ConA y medio. Para los datos presentados en la Figura 2A, los sobrenadantes de cultivo fueron analizados para determinar los niveles de IFN-γ mediante ELISA. Para los datos presentados en la Figura 2B, se realizó el análisis ELISpot para determinar los números relativos de células que expresan IFN-γ en suspensiones de bazo unicelulares de ratones inmunizados y ratones de control estimulados con y sin antígenos. En la Figura 2C, se presentan los datos del análisis FACS de células de bazo para determinar las poblaciones de subconjuntos de linfocitos recolectadas de los animales vacunados (Map74F+MPL) y animales de control (MPL, ConA-MPL) después de la estimulación con antígenos recombinantes y antígenos de control. En la Figura 2D, se presentan datos para expresión de ARNm de citocina en respuesta a Map74F normalizado al gen de mantenimiento GAPDH. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Las Figuras 3A y 3B presentan datos obtenidos de sueros recolectados de animales vacunados y animales de control en diferentes momentos (pre-vacunación/vacunación primaria (PV), vacunación de refuerzo (B), antes de la sensibilización (BC), 4, 8, 12 y 16 semanas después de la sensibilización) y verificados para determinar la respuesta de anticuerpos. Los datos presentados en la Figura 3A son de sueros sometidos a ensayo para determinar anticuerpos específicos de Map74F. La Figura 3B presenta datos de ensayo para las proporciones de IgG1:IgG2 mediante ELISA. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Las Figuras 4A y 4B proporcionan ilustraciones gráficas de datos que muestran la expresión de inmunidad protectora en bazo (Figura 4A), hígado (Figura 4B) y nodo linfático mesentérico (MLN) (Figura 4C) conferida por vacunación con Map74F+MPL. Map74F redujo significativamente la carga de MAP en el bazo (8-16 semanas después de la sensibilización), hígado (12-16 semanas después de la sensibilización) y MLN (8-16 semanas después de la sensibilización). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Las Figuras 5A-5D proporcionan representaciones fotográficas del examen histopatológico de tejidos de ratón vacunados y tejidos de ratón sin vacunar. La Figura 5A es representativa del hígado de un ratón de control sin vacunar. Numerosos granulomas grandes están dispersados aleatoriamente en todo el hígado. Hematoxilina y Eosina. Barra = 100 nm. Recuadro: vista con mayor aumento de un granuloma que demuestra numerosos bacilos resistentes a ácido. Tinción de Ziehl-Neelsen. La Figura 5B es representativa del hígado de un ratón vacunado con Map74F. Solamente están presentes escasos números de pequeños agregados linfoides acompañados por unos pocos macrófagos. La Figura 5C es representativa del bazo de un ratón de control sin vacunar que muestra granulomas ocasionales en la pulpa blanca. La Figura 5D es representativa del bazo de un ratón vacunado con Map74F. La pulpa blanca y pulpa roja están desprovistas de granulomas. Tinción de hematoxilina y eosina. Barra = 100 nm. Recuadro: vista con mayor aumento de un granuloma que demuestra la ausencia de bacilos resistentes a ácido. Tinción de Ziehl-Neelsen.

Las Figuras 6A-6C proporcionan ilustraciones gráficas de datos que muestran respuestas linfoproliferativas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de animales inmunizados (grupo I y II) y de control (grupo III) a

los antígenos recombinantes (85A, 85B, Map74F y SOD), ConA y PPD. Los resultados son expresados como índice de estimulación (SI), y las barras de error indican desviación estándar de la media.

Las Figuras 7A-7C proporcionan ilustraciones gráficas de datos que muestran la respuesta de IFN- γ específicas de antígeno de PBMC de animales inmunizados (grupo I y II) y de control (grupo III). Los resultados son expresados como valores de OD y las barras de error indican desviación estándar de la media.

Las Figuras 8A - 8F proporcionan ilustraciones gráficas de datos que muestran la expresión de sub-conjuntos de linfocitos de PBMC recolectadas de los grupos inmunizados (I y II) y el grupo de control (III) en tiempos especificados después de estimulación con los antígenos recombinantes y de control tal como son analizados mediante citometría de flujo. Los resultados son expresados como porcentaje de células con tinción positiva en relación con la muestra sin inducir (cultivada con medio). Las barras de error indican desviación estándar de la media.

Las Figuras 9A y 9B proporcionan ilustraciones gráficas de datos que muestran la expresión de ARNm de gen de citocina en respuesta a antígenos recombinantes en los grupos inmunizados (I y II) y grupo de control (III). Los resultados son expresados como las veces de incremento promedio con respecto a PBMC sin estimular, que sirvieron como calibradores. Las barras de error indican desviación estándar de la media.

Figura 10. Respuestas de anticuerpo a antígenos recombinantes individuales en los animales del grupo I y II vacunados y los animales del grupo III de control. Las barras de error representan desviación estándar de la media.

La Figura 11 proporciona un resumen tabular de resultados de cultivo de MAP (CPU) medidos en varios tejidos recolectados en la necropsia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y métodos para estimular una respuesta inmunitaria contra MAP en un animal. Las composiciones comprenden un polipéptido recombinante referido en la presente memoria como Map74F. El marco de lectura abierto (ORF) que codifica Map74F es de 2397 nucleótidos de longitud y codifica un polipéptido de 799 aminoácidos. La secuencia de la proteína de Map74F se proporciona en el SEQ ID NO: 1. Map74F tiene una masa molecular calculada en base a su composición de aminoácidos de 79 kDa, a pesar de su masa molecular aparente de aproximadamente 74 kDa estimada mediante análisis de SDS-PAGE. La secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 1 es mostrada sin una etiqueta de purificación opcional, tal como una etiqueta de histidina.

Map74F fue construido uniendo desde el extremo N al extremo C un fragmento C-terminal de ~17,6 kDa de la proteína de Map3527, un fragmento de 46,8 kDa de la proteína de Map 1519, seguido de un fragmento N-terminal de ~14,6 kDa de la proteína de Map3527. Una representación esquemática de Map74F se proporciona en la Figura 1.

Las secuencias de aminoácidos completas de Map3527 y Map 1519 se proporcionan en el SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente. El fragmento C-terminal de 17,6 kDa de la proteína Map3527 presente en Map74F está representado por los aminoácidos 183 - 361 de SEQ ID NO: 2. El fragmento de 46,8 kDa de la proteína de Map1519 presente en Map74F está representado por los aminoácidos 1 - 460 de SEQ ID NO: 3. El fragmento N-terminal de 14,6 kDa de Map3527 presente en Map74F está representado por los aminoácidos 33 - 180 de SEQ ID NO: 2. Se espera que fragmentos más largos de Map1519 y de los extremos N y C de Map3527 puedan estar incluidos en una proteína recombinante que sería útil en el método de la invención.

Además de MAP74F, las composiciones de la invención pueden comprender otros agentes que pueden estimular una respuesta inmunitaria contra bacteria de MAP. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender una o más de otras proteínas de MAP, tales como proteínas de MAP 85A, 85B, 85C, 35kDa, superóxido dismutasa (SOD), MptC, MptD y proteína de tipo ESAT-6 y combinaciones de las mismas. Estas proteínas son descritas en la solicitud de patente de los Estados Unidos Núm. 11/816,365.

En una realización, la composición comprende MAP74F y una o más de las proteínas de MAP 85A, 85B o SOD. La secuencia de ADN que codifica el gen de MAP 85A y la secuencia de aminoácidos del gen 85A se proporcionan en GenBank No. de acceso AF280067 (entrada, 10 de Octubre, 2003). La secuencia de ADN que codifica el gen de MAP 85B y la secuencia de aminoácidos del gen 85A se proporcionan en GenBank No. de acceso AF219121 gen 85B (entrada, 21 de Noviembre de 2002). La secuencia de ADN que codifica el gen de MAP 85C y la secuencia de aminoácidos del gen de 85C se proporcionan en GenBank Núm. de acceso AP280068 (entrada, 21 de Noviembre de 2002). La secuencia de ADN que codifica el gen de MAP SOD y la secuencia de aminoácidos del gen de SOD se proporcionan en GenBank Núm. de acceso AF 180816 (entrada, 30 de noviembre de 2001).

El método de la invención comprende administrar una composición que comprende Map74F a un mamífero en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria contra MAP. La respuesta inmunitaria estimulada puede comprender estimulación de cualquier componente del sistema inmunitario, incluyendo pero no limitados a la

generación de anticuerpos reactivos a antígenos de MAP, estimulación de proliferación de linfocitos, producción de citocinas asociadas con Th1, tales como IFN- γ , y combinaciones de los anteriores.

Map74F puede ser administrado a un animal en forma de un vector. Por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que codifican Map74F pueden ser clonadas en el genoma de una bacteria (por ejemplo, Salmonella) o un virus (por ejemplo, virus de herpes bovino-1 (BHV-1)), y la bacteria o virus recombinante resultante puede ser administrado a animales. Así, la presente invención también incluye vectores bacterianos y virales que expresan Map74F. También están contempladas en el alcance de esta invención metodologías de vacuna de ADN en las que se administran directamente a animales moléculas de ácido nucleico que codifican Map74F, ya sea solas o combinadas con un coadyuvante o un agente que facilita la transfección.

El método puede proporcionar beneficio a cualquiera animal susceptible de infección por MAP. Las composiciones y métodos son particularmente apropiados para la profilaxis o la terapia para infección por MAP de ruminantes, incluyendo pero no limitados a ganado vacuno, ovejas, cabras, venados y alces, antílopes, y búfalos. En una realización, el método puede ser usado para la profilaxis o la terapia de la enfermedad de John.

Las composiciones pueden ser administradas a cualquier animal infectado con MAP o no infectado. La administración de las composiciones a animales infectados de acuerdo con el método de la invención es considerada para estimular una respuesta inmunológica terapéutica. Sin embargo, la invención también incluye la administración de las composiciones antes de infección por MAP para estimular una respuesta profiláctica. Por ejemplo, las composiciones pueden ser administradas a un animal preñado que puede transferir componentes inmunológicos profilácticos a sus neonatos no infectados vía calostro o leche durante la lactancia. Alternativamente, las composiciones pueden ser administradas durante el período de una a cinco semanas antes del nacimiento para proporcionar un efecto profiláctico que puede impedir la infección por MAP o reducir la gravedad de la enfermedad si se presenta la infección.

Así, en una realización, el método de la invención es profiláctico para la infección por MAP, mientras que en otra realización, el método es terapéutico para la infección por MAP.

Las composiciones pueden ser formuladas con portadores farmacéuticos convencionales y pueden ser administradas vía cualquiera de una variedad de rutas convencionales. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticos aceptables para su uso con proteínas son descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a Edición, A. R. Gennaro et al. Eds., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990).

Las composiciones usadas en el método de la invención pueden también comprender coadyuvantes. Se puede usar cualquier coadyuvante convencional. En una realización, el coadyuvante puede ser un monofosforil lípido A (MPL), que puede ser proporcionado combinado con dicorinomicolato de trehalosa sintético. En otra realización, el adyuvante puede ser bromuro de dimetildiioctadecil amonio (DDA).

Las composiciones de la invención pueden ser administradas mediante cualquiera ruta aceptable. Las rutas de administración apropiadas incluyen oral, mucosal y parenteral (por ejemplo, inyección intravascular, intramuscular y subcutánea). Las composiciones pueden ser administradas en cualquier momento a un animal susceptible de contraer una infección por MAP o a un animal que está infectado con MAP.

Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad de MAP74F y cualquier otro agente antigénico en la composición administrada a un animal particular dependerá de una diversidad de factores, tales como la ruta de administración, y la talla, condición física y el estatus con respecto a MAP del animal, y puede ser ajustada por los expertos en la técnica para obtener un resultado deseado. Las composiciones pueden ser usadas en una sola administración o en una serie de administraciones para reforzar la respuesta inmunológica. En general, se puede administrar una dosificación total de entre 10-200 μ g de proteína.

Los siguientes ejemplos describen las diversas realizaciones de esta invención. Estos ejemplos son ilustrativos y no pretenden ser restrictivos.

Ejemplo 1

Este ejemplo proporciona una descripción de la clonación, expresión y purificación de Map74F.

Generación de un ORF unido en tándem que codifica Map74F

Map74F fue generado mediante la unión sucesiva en tándem de los ORF del fragmento C-terminal de ~17,6 kDa de un Map3527 a un ORF que codifica una Proteína que tiene una masa molecular de 46,8 kDa, seguido en el extremo C de una porción N-terminal de ~14,6 kDa de Map3527.

Generación del constructo de Map3527c desprovisto de un codón de parada.

Los oligonucleótidos 5' y 3' con respecto a la porción C-terminal de Map3527 (Map3527c) fueron designados como sigue: 5' (TA CATATG CAT CAT CAT CAT CAT CTC AAC CAG AGC GTC TCG GC 3' (SEQ ID NO: 4)) y (5' TA GAATTC GGC CGG CGG CCC CTC CGC C 3' (SEQ ID NO: 5)). El oligonucleótido 5' contenía un sitio de

restricción de *NdeI* que precedía a un codón de inicio de ATG, seguido de secuencias de nucleótidos que codifican seis residuos de histidina (cursiva). El oligonucleótido 3' contenía un sitio de restricción de *EcoRI*. Estos oligos fueron usados para amplificar Map3527c, la porción de 540-nt de carboxilo (residuos de 180 aa de 14,6 kDa) de Map3527 y el producto amplificado mediante PCR resultante fue ligado a un vector Topo de PCR2.1. El ADN del plásmido con el inserto correcto fue sometido a digestión con *NdeI* y *EcoRI*, y ligado al vector de expresión pET17b cortado con las mismas enzimas. Los productos ligados fueron transformados en células de *Escherichia coli* DH5α y un transformante con el inserto correcto (Map3527c) fue identificado mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

Amplificación por PCR de las secuencias codificantes completas de Map 1519 y ligación al plásmido de Map3527c-pET.

Los oligos 5' y 3' de Map1519 contenían las siguientes secuencias: 5'(5'-CTA ATC GAATTC ATG TTC TAT GGG GCC TTT C-3' SEQ ID NO: 6)) y 3'(5'-TA ATC GATATC CAG GAC CTT GGA CTT GTC-3' SEQ ID NO: 7)). El oligonucleótido 5' contenía un sitio de restricción de *EcoRI*. El oligonucleótido 3' tenía un sitio de restricción *EcoRV*, seguido inmediatamente de secuencias que comprenden los seis residuos de aminoácidos C-terminales y desprovistos de un codón de parada. La amplificación de la secuencia codificante de Map1519 (1380 pb; un tramo de 460-aa con un tamaño pronosticado de ~46,8 kDa), y el producto amplificado mediante PCR resultante fue ligado al vector Topo de PCR2.1 cortado con las mismas enzimas. El clon con el inserto correcto fue sometido a digestión con *EcoRI* y *EcoRV* y ligado al plásmido de Map3527c-pET pre-digerido con *EcoRI/EcoRV*. Los productos ligados fueron luego transformados en células de *E. coli* DH5α, y un transformante con el inserto correcto (Map3527c-Map1519) fue identificado mediante digestión con enzimas de restricción y verificado mediante secuenciación de ADN.

Clonación del fragmento N-terminal de Map3527 en el constructo de Map3527-C-Map1519.

Los oligonucleótidos 5' y 3' del fragmento N-terminal de Map3527 fueron diseñados como se describe a continuación: 5'(5'-AT CATATC GGG CTG GCG CCG GCG TCC-3' SEQ ID NO: 8)) y 3'(5'-AT CTCGAG TCA CGC GAC CTT GCC GGC-3' SEQ ID NO:9)). El oligonucleótido 5' contenía un sitio de restricción de *EcoRV*. El oligonucleótido 3' contenía un sitio de restricción de *XhoI*. Fueron diseñados para amplificar la porción N-terminal de 447 pares de bases (149 residuos de aminoácidos) de Map3527. El producto amplificado por PCR resultante fue sometido a digestión con *EcoRV* y *XhoI*, y ligado al plásmido pET de fusión de Map3527c-Map1519 sometido a digestión con *EcoRV* y *XhoI*. La mezcla de ligación fue usada para transformar células de *E. coli* DH5α y los clones positivos fueron identificados mediante digestión con enzimas de restricción y verificados mediante secuenciación de ADN. El constructo final, codifica una poliproteína de 74 kDa (Map 74F), que comprende un solo ORF organizado en el orden lineal, Map3527C-Map1519-Map3527N.

Expresión y purificación de proteína recombinante de Map74F

El constructo de ADN del plásmido fue transformado en células de *E. coli* BL21 (DE3 pLysE). Las células de *E. coli* transformadas fueron depositadas sobre agar LB con un suplemento de ampicilina (100 µg/ml). Una sola colonia fue inoculada en 10 ml de caldo LB con ampicilina (100 µg/ml), y cultivada a 37°C durante toda la noche con sacudimiento. El cultivo fue diluido 1:100 en el caldo LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) y cultivado a 37°C con sacudimiento. Después de una inducción de 3 horas con IPTG 1 mM (Invitrogen Co, Carlsbad, CA), las células fueron cosechadas mediante centrifugación (5000Xg) y lavadas una vez en PBS. Las células fueron suspendidas en tampón A (Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0) y sometidas a lisis en una prensa de células French o disruptor celular. Después de la centrifugación de los cuerpos de inclusión, los sedimentos fueron lavados tres veces con tampón de lavado de cuerpo de inclusión (Tampón A + Triton X-100 al 1%) y dos veces con tampón CHAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (CHAPS al 1% en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) con el fin de eliminar el lipopolisacárido (LPS). Los cuerpos de inclusión fueron disueltos en tampón B (fosfato de sodio 100 mM, Tris-HCl 10 mM, urea 8M, PMSF 2 mM (Sigma) y 20 µg/ml de leupeptina (Sigma), pH 8,0) y purificados con columna de agarosa de Ni-NTA (Invitrogen). Las fracciones eluidas fueron verificadas mediante SDS-PAGE y las fracciones que contenían la proteína recombinante fueron acumuladas y sometidas a diálisis contra Tris-HCl 10 mM (pH 7,8) durante toda la noche a 4°C dos veces. La proteína se hizo pasar a través del gel de eliminación de endotoxina Detoxi-Gel™ (Pierce, Rockford, IL) y a proteína purificada fue verificada para determinar niveles de endotoxina mediante el análisis de amebocito de *Limulus*. La proteína purificada tuvo niveles despreciables (10 pg/ml) de endotoxina.

Una representación esquemática de Map74F que muestra la organización y sitios de enzima de restricción usados para construir la poliproteína se muestra en la Figura 1. El ORF de Map74F es de 2397 nt de largo, que codifica un polipéptido de 799 aminoácidos (Figura 1B) con una masa molecular pronosticada de ~79 kDa. El diseño y construcción del ORF dieron como resultado la introducción de dos secuencias bisagra (*EcoRI* y *EcoRV*) de seis nucleótidos, que codificaban dos aminoácidos en cada uno de los sitios de unión que conectan los tres. Además, el ORF fue diseñado para tener seis residuos de histidina en el extremo N para la purificación utilizando la matriz Ni-NTA. Después de la expresión en *E. coli*, la proteína recombinante fue purificada de cuerpos de inclusión y analizada mediante SDS-PAGE (Figura 1B) con rendimientos que fluctúan de alrededor de 1,5-2,0 mg de proteína purificada de un litro de cultivo inducido.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra el uso de Map74F para estimular una respuesta inmunitaria contra MAP en un modelo de ratón.

Se ha encontrado que los ratones son un modelo apropiado para estudios de infección por MAP. La carga bacteriana y patología de órganos específicos son buenos indicadores del estatus infeccioso de ratones después de la sensibilización con MAP. En ratones, el hígado, el bazo y los nodos linfáticos mesentéricos son los órganos de elección para determinar la carga bacteriana después de la sensibilización con MAP. En este Ejemplo, se determinó la carga de MAP en estos órganos para calibrar la eficacia protectora de Map74F después de la sensibilización. Es evidente a partir de los resultados presentados a continuación que los animales inmunizados con Map74F fueron aptos ya sea para exterminar o inhibir la proliferación de MAP durante un curso de una infección de 16 semanas. En el bazo, el hígado y los MLN, el número de CFU disminuyó a las 8 semanas después de la sensibilización, sugiriendo la eliminación de MAP. Además de la carga bacteriana, el número reducido de granulomas y menos organismos resistentes a ácido observados en el hígado y bazo de animales vacunados indicaron la eficacia protectora de la poliproteína. La carga de MAP sustancialmente reducida en los órganos y la mejor patología de hígado y bazo indican que la inmunización con 74F protegía a los ratones contra infección por MAP al disminuir o eliminar rápidamente la carga de MAP. Map74F también produce altos niveles de IFN- γ . Map74F indujo una buena respuesta de Th1.

Los siguientes materiales y métodos fueron usados en este ejemplo.

Animales

Los experimentos fueron efectuados utilizando ratones C57/BL6 hembra de 6-8 semanas de edad (Harlan Sprague, Indianapolis, Indiana). Los animales fueron mantenidos en una instalación de nivel de bioseguridad II y tuvieron libre acceso a alimento y agua. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo en cumplimiento con las regulaciones, políticas, y principios del Acta de Bienestar Animal, Política de Servicio de Salud Pública sobre Cuidado y Uso Humano de Animales de Laboratorio utilizados en pruebas, investigación y entrenamiento, la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y el Departamento de Salud Pública del Estado de Nueva York.

Cepa bacteriana

Un producto aislado de MAP de una vaca infectada, designado MAP 66115-98, fue usado para sensibilizar los ratones y para el aislamiento del ADN genómico. MAP 66115-98 fue cultivado en medio 7H9 con un suplemento de ácido oleico -albúmina-dextrosa-catalasa al 10% (Becton, Dickinson y Co, Sparks, MD) y micobactina J (Allied Monitor, Inc, Fayette, MO). Después de cultivo durante 6-8 semanas, los organismos fueron cosechados mediante centrifugación a 10.000 X g y lavados dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2). Los organismos fueron diluidos en PBS a la concentración requerida y usados para sensibilizar los ratones.

Inmunización de Ratones

Los ratones fueron divididos en dos grupos con 36 animales en cada grupo. Los animales del Grupo I fueron inmunizados dos veces, con un intervalo tres semanas con 50 μ g/animal, de la proteína de fusión formulada con Emulsión de MPL+TDM (Ribi Adjuvant Systems, Corixa, Hamilton, MT) en un volumen total de 100 μ l por dosis vía inyección subcutánea en el dorso. Los animales del Grupo II fueron mantenidos como controles sin vacunar y se les administró la Emulsión de MPL+TDM sola. Tres semanas después de la segunda inmunización, 12 animales en cada grupo, designados para estudios de inmunogenicidad, fueron sacrificados y las células del bazo fueron obtenidas mediante procedimientos convencionales. Las células de bazo fueron cultivadas en el medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) que contenía FBS al 10% (Gibco) a 37°C en CO₂ al 5%. Los experimentos de inmunización fueron repetidos dos veces con la misma dosis y horario.

Sensibilización de ratones con MAP

Tres semanas después de la segunda inmunización, 24 animales de cada uno de los Grupos I y II fueron tratados mediante inyección intraperitoneal de 10⁹ unidades CTU de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis. Seis animales de cada uno de los dos grupos fueron sometidos a eutanasia a las 4, 8, 12 y 16 semanas después de la sensibilización y el bazo, el hígado y los nodos linfáticos mesentéricos (MLN) fueron recolectados y divididos en dos partes. Un conjunto de tejidos fue homogeneizado en PBS (100 mg/ml) y 100 μ l de productos homogeneizados de tejido individuales fueron inoculados sobre cultivos inclinados de yema de huevo de Herald (HEY) (Becton, Dickinson and Co, Sparks, MD) que contenían micobactina J. con el fin de estimar la carga bacteriana. Los cultivos inclinados fueron verificados para determinar crecimiento bacteriano mediante recuento de colonias a las 8-12 semanas de la inoculación. El otro conjunto de tejidos fue usado para el examen histopatológico.

Examen histopatológico

Porciones de bazo, hígado y MLN se fijaron mediante inmersión en formación tamponada neutra al 10%, embebida en cera de parafina, seccionadas a 4 µm y teñidas con eosina y tinción de Ziehl-Neelsen mediante métodos histológicos convencionales y examinadas mediante microscopio óptico.

ELISA para determinar la respuesta de anticuerpo

- 5 Se midió la respuesta de la IgG específica del antígeno mediante ELISA convencional. Las placas de ELISA (Nunc-immuno module, Nunc, Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con 200 ng/pocillo de proteína recombinante e incubaron a 4°C durante toda la noche. Después del lavado una vez con PBST (Tween 20 al 0,05% en PBS), se agregaron 300 µl de tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBST) y se incubaron a 25°C durante 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces con PBST y se añadieron a los pocillos 100 µl de muestras diluidas de suero y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Para la respuesta de IgG total, después del lavado, se agregaron 50 ng de IgG de anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (KPL, Gaithersburg, MD) a los pocillos y se incubaron a 25°C durante 30 minutos. Después del lavado, se agregaron 50 µl de sustrato BluePhos (KPL) y se incubaron durante 10 minutos. Las placas se leyeron en un lector de microplacas ELx 808 Ultra (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, VT) a 630 nm después de agregar 50 µl de solución de parada (KPL). Para la respuesta de isotipo, después del lavado, se añadieron a los pocillos 25 ng de IgG1 o IgG2a de anti-ratón de cabra conjugada con biotina (Southern Biotech, Birmingham, AL) y se incubaron a 25°C durante 30 minutos. Después del lavado, se agregaron 0,2 µg/ml de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (KPL) y se incubaron a 25°C durante 30 minutos. Después del lavado, se agregaron 50 µl de 3,3', 5, 5' - tetrametilbencidina (TMB) a los pocillos y se incubaron durante 15 minutos. Las placas fueron leídas en un lector de microplacas ELx 808 Ultra (Bio-Tek Instruments) mediante el método del criterio de valoración a 450 nm después de agregar 50 µl de H₂SO₄ 1 N como solución de parada.

Análisis de IFN-γ

- Las células de bazo obtenidas mediante procedimientos convencionales se depositaron en placa por duplicado a 5 X 10⁵ células/pocillo y se cultivaron con y sin el antígeno recombinante durante 48 horas. Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon y se analizaron para determinar IFN-γ utilizando un kit de ELISA sándwich en fase sólida (Biosource, Camarillo, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se añadieron 50 µl de los sobrenadantes de cultivo a los pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal específico para IFN-γ de ratón. Después de co-incubación de 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo policlonal biotinilado, se lavaron los pocillos y se agregó estreptavidina-peroxidasa. Después de una incubación de 30 minutos y lavado, se agregó una solución de tetrametilbencidina (TMB) a los pocillos y los resultados se leyeron a 450 nm en el lector de microplacas ELx 808 Ultra (Bio-Tek Instruments).

Análisis ELISpot

- Se utilizó un kit de ELISpot (KPL) para determinar el número relativo de células que expresan IFN-γ en las suspensiones de bazo unicelulares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se aplicó un recubrimiento de 10 µg/ml de Ab de captura de IFN-γ (BD Biosciences, San Jose, CA) sobre la placa de filtro de 96 pocillos MultiScreen (Millipore, Bedford, MA) durante toda la noche a 4°C. Después del lavado con solución de lavado 1x, las placas fueron bloqueadas mediante solución de BSA 1x durante 1 hora a 25°C y lavadas otra vez. Las células de bazo se depositaron en placa por duplicado a 5 X 10⁵ células/pocillo y se cultivaron con y sin el antígeno durante 48 horas a 37°C. Las placas se lavaron con solución de lavado 1x y se incubaron durante 1 hora a 25°C con 5 µg/ml de Ab secundario de IFN-γ anti-ratón de rata conjugado con biotina (BD Biosciences). Las placas se lavaron e incubaron durante 30 minutos a 25°C con 0,2 µg/ml de HRP-estreptavidina. Los filtros se revelaron mediante el sustrato de TureBlue durante 15 minutos, se secaron en la oscuridad y se contaron los puntos.

Análisis FACS para determinar los marcadores de superficie celular

- Las células de bazo se depositaron por duplicado en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a 1 X 10⁶ células/pocillo y se cultivaron durante 24 horas. El análisis de FACS fue efectuado después de estimular las células del bazo con 74F y concanavalina A con células de control sin estimular apropiadas. Después de lavar tres veces en tampón FACS (BSA al 1% y azida de sodio al 0,05% en PBS), las células se suspendieron en 50 µl de tampón de FACS y se mezclaron con 0,5 µg de anticuerpos CD3, CD4 y CD8 conjugados con FITC o PE (eBioscience, San Diego, CA) y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron con tampón FACS dos veces y se suspendieron en 100 µl de formaldehído al 3% en PBS y se transfirieron a tubos de FACS que contenían 500 µl de PBS. Se recogieron los datos de 10.000 eventos utilizando un citómetro de flujo calibrador de FACS (Becton-Dickinson, San Jose, CA) y se analizaron utilizando los elementos de programación de Cellquest. Los resultados se expresaron como el porcentaje promedio incrementado de células con tinción positiva en respecto al de la muestra sin inducir teñida con el mismo anticuerpo.

RT-PCR de tiempo real para determinar la expresión de ARNm de citocina

El ARN total se aisló de tejidos esplénicos de ratones inmunizados utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). El ARN mensajero se sometió a transcripción inversa utilizando Superscript™ II (Invitrogen) y se utilizó como ADNc molde. Los detalles de las secuencias de cebador y sonda usadas son presentados en la Tabla 1. Las siguientes anotaciones son usadas en la Tabla 1: FW, cebador directo; RV, cebador inverso; TP, sonda TaqMan, doble-marcada con 5'FAM y 3'TAMRA; ^a Longitud de Amplicon en pares de bases, ^b número de acceso de Genbank de ADNc y gen correspondiente. ^c Sonda antisentido.

Las sondas se marcaron con el colorante informador fluorescente, 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y el colorante extintor, N', N',N',N',N'-6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3'. La reacción se efectuó por duplicado en volúmenes de 25 µl que contenían 2 µl de cebadores directos o inversos 10 pM, 2 µl de sonda 2 pM, 12,5 µl de mezcla maestra de PCR TaqMan y 9,5 µl de ADNc diluido, utilizando las siguientes condiciones: 10 minutos a 94°C, seguido por un total de 40 ciclos de dos temperaturas (15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C), en un fluorómetro automático (7700 Sequence detector, Applied Biosystems, Foster City, CA). La cuantificación se realizó utilizando el método de umbral de ciclo comparativo (C₁) y se refirió como transcripción relativa o la diferencia de n-veces con respecto a un ADNc calibrador.

Tabla 1

Gen	Secuencia (5' → 3')	Longitud (bp) ^a	No. de acceso. *
IL-2	FW CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA (SEQ ID NO: 10)	141	X017722
	RV TCCAGAACATGCCGCAGAG (SEQ ID NO: 11)		M16760
	TP CCCAAGCAGGCCACAGAATTGAAAG (SEQ ID NO: 12)		AF195956
IL-12p40	FW GGAAGCACGGCAGCAGAATA (SEQ ID NO: 13)	180	M866712
	RV AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG (SEQ ID NO: 14)		S82420-6
	TP CATCATCAAACCAGACCCGCCCAA (SEQ ID NO: 15)		
TNF-α	FW CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA (SEQ ID NO: 16)	175	M130492
	RV TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC (SEQ ID NO: 17)		Y00467
	TP CACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGGA (SEQ ID NO: 18)		
IFN-γ	FW TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA (SEQ ID NO: 19)	92	K00832
	RV TGGCTCTGCAGGATTTTCATG (SEQ ID NO: 20)		M74466
	TP ^c TCACCATCCTTTTGCCAGTTCCTCCAG (SEQ ID NO: 21)		M28381
GAPDH	FW TCACCACCATGGAGAAGGC (SEQ ID NO: 22)	168	M325991
	RV GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA (SEQ ID NO: 23)		
	TP ATGCCCCCATGTTTGTGATGGGTGT (SEQ ID NO: 24)		

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente con elementos de programación de Excel. Las diferencias entre grupos y antígenos individuales fueron analizadas con análisis unidireccional de varianza seguido de comparación múltiple de Tukey-Kramer o la prueba t de Student. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando se obtuvo un valor de probabilidad de <0,05.

Los siguientes resultados fueron obtenidos utilizando los materiales y métodos resumidos en este ejemplo.

Respuesta inmunitaria en ratones inmunizados con proteína Map 74F

Tres semanas después de la vacuna de refuerzo, se sacrificaron cuatro ratones de cada grupo, y se evaluaron la respuesta de anticuerpos y la respuesta de células T anti-Map74F. Los ratones inmunizados con Map 74F tuvieron una respuesta de IgG1 significativamente más fuerte (P < 0,01) contra Map 74F pero no IgG2a. En contraste, no se detectaron anticuerpos específicos para Map 74F en el grupo de control.

Las respuestas de IFN- γ fueron determinadas mediante ELISA de IFN- γ del sobrenadante de cultivo y el análisis de ELISPOT de IFN- γ . La respuesta de IFN- γ específica del antígeno fue significativamente más alta ($P < 0,05$) en ratones inmunizados con Map 74F en comparación con los animales de control que recibieron MPL solo (Figura 2A). El resultado de ELISPOT de IFN- γ fue también comparable al resultado de ELISA de IFN- γ (Figura 2B), que confirmó además la respuesta de IFN- γ incrementada en los animales vacunados. El grupo vacunado tuvo colonias formadoras de una célula promedio (SFC) de 20, en contraste con 7 en el grupo de control. La distribución de células T CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$, y CD8 $^{+}$ específicas del antígeno en células de bazo fue evaluada mediante FACS. Las células T de CD3 $^{+}$ y CD4 $^{+}$ fueron significativamente más altas ($P < 0,01$) en ratones inmunizados con Map 74F (Figura 2C) que los animales de control. En contraste, no se observó ninguna diferencia significativa en poblaciones de células T de CD8 $^{+}$ entre animales vacunados y animales de control. Los niveles de expresión genética de citocina fueron evaluados mediante PCR en tiempo real. No se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los niveles de expresión de los genes de citocina IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ entre los animales vacunados y los animales de control (Figura 2D).

Map 74F protege los ratones C57/BL6 contra la infección por MAP

En base a las respuestas inmunitarias obtenidas en ratones vacunados, se planeó determinar la eficacia protectora de la proteína Map 74F contra la infección por MAP en ratones. Los sueros recolectados en diferentes momentos fueron sometidos a ensayo mediante ELISA para determinar respuesta de IgG total (Figura 3A) y la proporción de IgG1/IgG2a (Figura 3B). Los ratones inmunizados con 74F mostraron un incremento significativo ($P < 0,01$) en la respuesta de anticuerpo específica de 74F a 3 y 7 semanas (4 semanas después de la sensibilización) después de la vacunación de refuerzo en comparación con los animales de control. Aunque los niveles de anticuerpo se incrementaron en los animales de control después de la sensibilización, la respuesta fue más alta en los animales vacunados a las 8, 12 y 16 semanas después de la sensibilización. Se detectaron diferencias significativas en las proporciones de IgG1/IgG2a de los animales vacunados y los animales de control en torno a las tres semanas después de la vacunación de refuerzo. En los animales vacunados, las proporciones de IgG1/IgG2a se incrementaron después de la vacunación de refuerzo hasta 4 semanas después de la sensibilización. Después de esto, se notó una caída en las proporciones de IgG1/IgG2a en los animales vacunados hasta el final del período de observación 16 semanas post-sensibilización.

Para determinar la eficacia protectora de 74F, el bazo, el hígado y los MLN fueron cultivados para determinar MAP en diferentes momentos después de la sensibilización con MAP. En el bazo, la carga de MAP fue significativamente más baja ($P < 0,01$) en los animales vacunados en comparación con los animales de control 8, 12 y 16 semanas después de la sensibilización (Figura 4A). En el hígado, los animales vacunados tuvieron una carga de MAP más baja que los animales de control y la carga fue significativamente más baja ($P < 0,01$) 12 semanas después de la sensibilización (Figura 4B). En los animales vacunados, la carga de MAP en los MLN fue significativamente más baja a partir de 8 semanas después de la sensibilización (Figura 4C). El examen histopatológico del hígado (Figuras 5A y B) y bazo (Figuras 5C y D) mostró que la sensibilización intra-peritoneal de MAP dio como resultado más granulomas en los animales de control 8, 12 y 16 semanas post-sensibilización. En los animales de control sin vacunar, el hígado tuvo numerosos granulomas grandes dispersados aleatoriamente (Figura 5A) mientras que el hígado de los animales vacunados tuvo solamente un escaso número de pequeños agregados linfoides (Figura 5B). Similarmente, el bazo de los animales de control sin vacunar tuvo más granulomas (Figura 5C) que los animales vacunados (Figura 5D). Cuando los tejidos de hígado y bazo de los animales de control fueron teñidos con Ziehl-Neelsen, se observaron numerosos bacilos resistentes a ácido. En contraste, el número de granulomas y bacilos resistentes a ácido fueron menores en animales inmunizados con 74F.

Así, en este ejemplo, se usaron células de bazo de animales vacunados y animales de control para determinar el tipo de respuesta de célula T inducida por la proteína de fusión. En infecciones micobacterianas, las células Th1 son cruciales para la protección durante la fase temprana de la infección. Se considera que las estrategias de vacunación más efectivas contra patógenos intracelulares son aquellas que estimulan tanto respuestas de célula T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ para producir citocinas asociadas con Th1. En general, se considera que IFN- γ es el componente principal en la activación de los macrófagos y se considera que su producción por las células T CD4 $^{+}$ de Th1 es esencial para contener la infección por MAP. Los resultados de los autores de la presente invención indican que la vacunación con la proteína de fusión produjo una respuesta de IFN- γ significativa. Similarmente, también se encontró que la inmunización con Map74F produjo una respuesta de células T de CD3 $^{+}$ y CD4 $^{+}$ fuerte en los animales vacunados en contraste con las células T CD8 $^{+}$, indicando que el incremento de los niveles de IFN- γ podría ser debido al incremento en poblaciones de células T CD4 $^{+}$. Los resultados apoyan la conclusión de que la expresión de IFN- γ se debió predominantemente a las células T CD4 $^{+}$ activadas. El incremento de la respuesta de las células T CD4 $^{+}$ y los niveles de protección obtenidos en el estudio de los autores de la presente invención después de la sensibilización con MAP indican la eficacia protectora de Map 74F.

Los estudios de inmunogenicidad de los autores de la presente invención presentados en este ejemplo también indican que 74F con MPL indujo una buena respuesta de anticuerpo en los animales vacunados. La proporción de IgG1/IgG2a se incrementó hasta 4 semanas después de la sensibilización con MAP, indicando una respuesta específica de Th2. Sin embargo, la proporción de IgG1/IgG2a disminuyó gradualmente comenzando a las 8 semanas indicando un desplazamiento posible hacia la respuesta de Th1. Resulta evidente a partir de los resultados

presentados en este ejemplo que 74F indujo respuestas tanto Th1 como Th2 siendo la primera más pronunciada como se muestra por una respuesta de IFN- γ significativa.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra el uso de Map74F y otras proteínas de MPA seleccionadas para simular una respuesta inmunitaria contra MAP en ruminantes.

Los siguientes materiales y métodos fueron usados para obtener los datos presentados en este ejemplo.

Animales. un total de 25 cabras jóvenes, de entre 5 y 10 días de edad, de rebaños libres de MAP fueron usadas en este estudio. Las muestras fecales tomadas de las cabras antes de los experimentos de inmunización fueron negativas para MAP, tanto mediante cultivo como mediante PCR para el gen IS900. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo en cumplimiento con las regulaciones, políticas y principios del Acta de Bienestar Animal, La Política de Servicio de Salud Pública sobre Cuidado y Uso Humano de Animales de Laboratorio usados en Pruebas, Investigación y Entrenamiento, la Guía de NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y el Departamento de Salud Pública del Estado de Nueva York.

Bacterias. MAP 66115-98, un producto aislado clínico, fue usado para sensibilizar las cabras después de la inmunización. Esta cepa es positiva para IS900 y dependiente de micobactina. MAP 66115-98 fue cultivado en medio 7H9 con un suplemento de ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa al 10% (Becton Dickinson Co, Sparks, MD) y micobactina J (Allied Monitor, Inc, Fayette, MO). Después de cultivo durante 8 semanas, los organismos fueron cosechados mediante centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos y lavados dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2). Los organismos fueron diluidos en PBS a la concentración requerida y usados para sensibilizar los terneros.

Antígenos y coadyuvante. Tres antígenos de MAP recombinantes, 85A, 85B, SOD, y el polipéptido de fusión Map74F fueron clonados, expresados y purificados usando técnicas convencionales y como se resume en la solicitud de patente de los Estados Unidos Núm., 11/816.365. Las proteínas expresadas fueron purificadas utilizando columnas de agarosa de Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA). La contaminación de endotoxina fue eliminada mediante el uso del gel Affinity Pak Detoxi (Pierce, Rockford, IL) y los antígenos tuvieron niveles despreciables (10 pg/ml) de endotoxina en un análisis de amebocito de Limulus. Se mezcló DDA (Sigma, EEUU) en agua destilada estéril a una concentración de 2,5 mg/ml, se calentó a 80°C con agitación constante durante 20 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. El DDA se mezcló completamente con los antígenos recombinantes a una concentración final de 250 μ g/dosis.

Inmunización de animales. Las cabras fueron divididas en tres grupos, con ocho animales en el Grupo I y II y 9 animales en el Grupo III (puesto que tenía una cabra joven extra). Todas las cabras jóvenes permanecieron con sus madres hasta tres meses de edad. Los animales del Grupo I fueron inmunizados con 100 μ g cada uno de los cuatro antígenos (85A, 85B, SOD, y Map74F) en DDA mediante inyección subcutánea. Los animales del Grupo II fueron inmunizados con 100 μ g de cada antígeno sin DDA. El Grupo III fue mantenido como animales de control y se les administró solamente DDA. Tres semanas después de la inmunización primaria, las cabras fueron reforzadas con el mismo régimen de antígenos y coadyuvante.

Sensibilización de los animales con MAP. Tres semanas después del refuerzo, las 24 cabras fueron sensibilizadas oralmente con 5×10^8 células de MAP/animal en 10 ml de sustituto de leche durante 7 días consecutivos. Se efectuaron cultivos fecales en cada animal en los días 2, 4, 6, 8 y 10 después de cada sensibilización y luego una vez cada mes.

Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC fueron aisladas de las cabras experimentales utilizando técnicas convencionales. En resumen, se recogieron 10-15 ml de sangre periférica de la vena yugular en tubos de vacutainer de EDTA (Becton Dickinson y Co, Franklin Lakes, NJ). Los linfocitos fueron aislados mediante centrifugación diferencial utilizando Histopaque 1.077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las células mononucleares fueron lavadas tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2). Los sedimentos celulares lavados fueron suspendidos en PBS y sometidos a recuento después de la tinción con azul tripán al 0,4% para determinar la viabilidad. Los linfocitos fueron resuspendidos en un medio de RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10% (Gibco, Grand Island, NY), L-glutamina 2 mM, HEPES 100 mM, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 50 μ g/ml de gentamicina (Gibco), a una concentración final de 2×10^6 células viables/ml. Las células fueron sembradas (200 μ l/pocillo) sobre placas de fondo plano o fondo redondo de 96 pocillos, dependiendo del tipo de experimento.

Análisis de proliferación de linfocitos. Se llevaron a cabo análisis de proliferación de linfocitos utilizando técnicas convencionales. Brevemente, las PBMC, en placas de fondo plano de 96 pocillos fueron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada en CO₂ al 5% y estimuladas con cada uno de los cuatro antígenos recombinantes purificados (10 μ g/ml), concanavalina A (ConA; 10 μ g/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y derivado de proteína purificada (PPD; 10 μ g/ml, DBL, National Veterinary Services Laboratory, Ames, IA) durante 72 hr. La síntesis de ADN en células estimuladas y células de control sin estimular fue medida mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) mediante ELISA de proliferación celular, el kit colorimétrico de BrdU (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) según el

protocolo del fabricante. Brevemente, las células fueron marcadas durante 2 horas con 10 µl de solución de marcaje de BrdU. El anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa fue agregado e incubado durante 90 minutos. Esto estuvo seguido de la adición de la solución de sustrato de enzima e incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción enzimática fue detenida mediante la adición de H₂SO₄ 1 M, y la densidad óptica (DO) fue leída a 450 nm utilizando un lector de microplacas EL_x 808 Ultra (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, VT). Las pruebas fueron se realizaron por triplicado, y los resultados fueron expresados como el índice de estimulación promedio (SI), calculado como la proporción entre la DO media de células cultivadas con el antígeno y la DO media de células cultivadas sin los antígenos.

Análisis de IFN-γ. Los niveles de IFN-γ fueron medidos en los sobrenadantes de cultivo de PBMC utilizando un inmunoanálisis de enzima sándwich basado en anticuerpo monoclonal (BOVIGAM; Biocor Animal Health, Omaha, NE), según las instrucciones del fabricante. Las placas fueron leídas a 450 nm utilizando un lector de microplacas EL_x 808 Ultra (Bio-Tek Instrument, Inc). Los resultados fueron interpretados en base a una comparación de la densidad óptica de control negativa y positiva (DO). Los resultados fueron determinados ya sea como positivos (si la DO es mayor que la del control positivo) o negativo (si la DO es menor que la del control positivo), en relación con los valores de corte sugeridos por el fabricante.

Análisis citométrico de flujo de marcadores de linfocito. El análisis citométrico de flujo de un solo color fue efectuado para antígenos de diferenciación de superficie de linfocito, utilizando anticuerpos monoclonales específicos de cabra (CD2-MUC2A; CD4-17D-IgG₁; CD4-GC1A1-IgG2a; CD8-CACT80C-IgG₁; CD8-7C2B-IgG2a; CD25-CACT116A-IgG₁; CD45RO-ILA116A-IgG3; IgG2b-GB21A1 específico de cadena alfa γδTCR; ACT1-CACT7A-IgM; ACT 16-GB110A-IgM) (VMRD, Inc, Pullman, WA) de acuerdo con los protocolos convencionales. En resumen, las células fueron lavadas tres veces en tampón clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) e incubadas con el anticuerpo primario previamente titulado para determinar la reactividad óptima durante 30 min a 4°C. Después de esto, las muestras fueron lavadas tres veces e incubadas con inmunoglobulina anti-ratón de caballo marcada con isotiocinato de fluoresceína (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas dos veces con tampón FACS y suspendidas en 100 µl de formalina tamponada neutra al 3% en PBS. Finalmente, las células fueron transferidas a un tubo de FACS, y el volumen fue completado hasta 500 µl con PBS antes de la medición utilizando un citómetro de flujo calibrador de FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los datos fueron recolectados de 5.000-10.000 eventos y fueron analizados utilizando los elementos de programación de Cellquest.

PCR cuantitativa en tiempo real para la expresión genética de citocina. El aislamiento de ARN total, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa en tiempo real fueron efectuadas de acuerdo con métodos convencionales. En resumen, el ARN fue aislado de PBMC sometidas a lisis utilizando un mini kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Las muestras de ARN aisladas fueron tratadas con 10 U/µl de ADNasa-I libre de ARNasa (Qiagen) a 37°C durante 10 minutos, seguido de desactivación térmica a 95°C durante 5 minutos y luego enfriadas sobre hielo. La transcripción inversa de las muestras de ARN se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 µl (1,6 µl de ARN total, 200 U de transcriptasa inversa Superscript II de Invitrogen, Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotretol 0,01 M y dNTP 0,5 mM) a 42°C durante 50 min, seguido de desactivación a 70°C durante 15 minutos. Las sondas y cebadores para RT-PCR cuantitativa en tiempo real fueron diseñadas con los elementos de programación de Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando las secuencias genéticas de beta actina y citocina bovinas derivadas de GenBank. Los detalles de las sondas y los cebadores usados en este estudio son presentados en la Tabla 2.

Tabla 2

Citocina	Secuencia (5' → 3')	Longitud	Núm.. de acceso.
IFN-γ	FP- CAAATTCGGTGGATGATCTG (SEQ ID NO: 25)	358-378	AY603405
	RP-GCGACAGGTCATTCATCACCTT (SEQ ID NO: 26)	433-412	
	Sonda-atccagcgcaaagccataaatgaactca (SEQ ID NO: 27)	382-409	
IL-10	FP-CCAGGATGGTGA CTCTCGACTAGAC (SEQ ID NO: 28)	338-360	DQ837159
	RP- TGGCTCTGCTCTCCAGAAC (SEQ ID NO: 29)	413-394	
	Sonda-ccgcataaacctctgaaatccgaccca (SEQ ID NO: 30)	364-391	
β-actina	FP- GCCCCTCTGAACCCCAAA (SEQ ID NO: 31)	67-84	AF481159
	RP- GCAGGAGTGTTGAAAGTCTCGAA (SEQ ID NO: 32)	137-115	
	Sonda-ccaaccgtgagaagatgaccgatca (SEQ ID NO: 33)	86-112	

Las sondas fueron marcadas con el colorante informador fluorescente, 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5', y el colorante extintor, N',N',N',N',N'-6-carboxitetraetilrodamina (TAMRA) en el extremo 3'. La PCR fue efectuada en un volumen de reacción de 25 µl con 10 µl de ADNc diluido, concentraciones de 400 nM de cebadores, 80 nM de la sonda (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IO), y la mezcla maestra de PCR universal (Applied Biosystems), que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, concentraciones de 2,5 mM de desoxinucleótido trifosfatos, 0,625 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold y 0,25 U de uracil-N-glicosilasa de AmpErase por reacción. Las muestras por duplicado fueron mantenidas en placas de 96 pocillos y amplificadas en un fluorómetro automatizado (7700 Sequence Detector, Applied Biosystems). Las condiciones de PCR fueron 2 minutos a 50°C y 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. La cuantificación se hizo utilizando el método de umbral de ciclo comparativo (C_T) y referida como transcripción relativa o la diferencia de n-veces con respecto a un ADNc calibrador.

Respuestas de anticuerpo a antígenos recombinantes. Las respuestas de anticuerpo a los cuatro antígenos recombinantes, con A y PPD fueron estimadas mediante ELISA siguiendo un protocolo convencional. Un ELISA indirecto fue efectuado con placas de fondo plano de 96 pocillos recubiertas con 100 µl de cada antígeno, mantenidas a 4°C durante toda la noche, y lavadas tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST). Los sitios no unidos fueron bloqueados con leche desnatada al 5% en PBST a 37°C durante una hora y lavados dos veces con PBST. Se añadieron a los pocillos 100 µl de anti-IgG cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a 1:25.000 y se incubaron a 37°C durante una hora. Las placas fueron lavadas tres veces en PBST y se agregaron 200 µl de ácido 2,2'-azinobis-tiazolin-6-sulfónico (Sigma) a cada pocillo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos en la oscuridad seguido de la adición de la solución de parada (HCl 1 M), y leídas tres veces a 405 nm a intervalos de 2 minutos utilizando un lector de microplacas (BioTEK Instruments, Inc, Winooski, VT). Los sueros positivos y negativos apropiados y los antígeno y los controles de anticuerpo fueron incluidos en cada placa.

Cultivo fecal y de órganos de MAP. Después de la sensibilización, se hicieron intentos para aislar organismos de MAP de heces utilizando el medio de yema de huevo de Herald (HEY) (Becton, Dickinson and Co. Sparks, MD) siguiendo protocolos convencionales. Las muestras fecales fueron recolectadas de todos los animales 2, 4, 6, 8 y 10 días después de la sensibilización, y cada mes después de esto para el aislamiento de MAP. Similarmente, 23 muestras de tejido recolectadas de cada uno de los 24 animales en la necropsia fueron también sometidas a ensayo para determinar MAP mediante cultivo. Los cultivos fueron efectuados por la sección de bacteriología en el Cornell Animal Health Diagnostics Center, y que no tenía conocimiento del grupo de tratamiento.

Patología grosera y examen histopatológico. Todas las cabras fueron sometidas a eutanasia 38 semanas después de la vacunación primaria y sometidas a necropsia. Un total de 23 muestras de tejido de cada animal, que incluían bazo, amígdalas, nodos linfáticos mesentéricos (3), nodo linfático mandibular, nodo linfático ileo-cecal, nodo linfático hepático, duodeno (ascendente y descendente), yeyuno (3 sitios de intervalos aproximadamente iguales desde el extremo proximal al distal), íleo (2 sitios en el extremo proximal, 2 sitios en el íleo medio y 2 sitios en el extremo distal), orificio íleo-cecal, orificio cecocólico, cecum, y colon espiral fueron recolectados en el momento de la necropsia. Los tejidos recolectados fueron fijados mediante inmersión en formalina tamponada neutra al 10%, embebidos en cera de parafina, seccionados a 4 µm y teñidos con hematoxilina y eosina mediante métodos histológicos convencionales. Las secciones fueron examinadas por un patólogo veterinario certificado de la junta (SM), que no tenía conocimiento del grupo de tratamiento.

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados estadísticamente con los elementos de programación de Excel. Las diferencias entre grupos y antígenos individuales fueron analizadas con el análisis unidireccional de varianza seguido por comparación múltiple de Tukey-Kramer o prueba t de Student. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando se obtuvo un valor de probabilidad de <0,05.

Los siguientes resultados fueron obtenidos utilizando los materiales y métodos resumidos anteriormente en este ejemplo.

Respuestas linfoproliferativas a los antígenos: Aunque se detectaron respuestas linfoproliferativas específicas de antígeno 6 semanas después de la vacunación primaria (APV), las respuestas fueron significativamente más altas ($P < 0,05$) en ambos grupos vacunados (I y II) en comparación con el grupo de control sin vacunar (III) 10 semanas APV (Figura 6). No obstante, no se detectaron diferencias significativas en las respuestas entre los diferentes antígenos sometidos a ensayo.

Respuestas de IFN- γ (específicas de antígeno): Se detectaron diferencias significativas ($P < 0,01$) en la respuesta de IFN- γ entre los animales vacunados y los animales testigo de control a 6 y 10 semanas APV (Figura 7). En los animales vacunados, la mejor respuesta fue detectada para Map74F. Las respuestas de IFN- γ fueron significativamente más altas ($P < 0,05$) para los antígenos 85A y Map74F en los animales del grupo I que en los animales del grupo II a 10 semanas de APV. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los otros antígenos recombinantes sometidos a ensayoprobados. Aunque los niveles de IFN- γ específicos de antígeno recombinante declinaron desde la semana 18 a la semana 38 semanas APV, fueron significativamente más altos ($P < 0,05$) en los animales vacunados que en los animales testigo de control.

Distribución de sub-conjuntos de linfocitos en respuesta a antígenos recombinantes: Sub-conjuntos de linfocitos estimulados por antígeno fueron examinados para determinar diferencias en sus porcentajes mediante citometría de flujo. Hubieron incrementos significativos ($P < 0,01$) en los sub-tipos de células IgG1 CD4⁺, IgG2a CD4⁺, IgG1 CD8⁺, IgG2a CD8⁺ en los grupos inmunizados por encima del grupo de control (Figuras 8A-D). El incremento comenzó 6 semanas APV y persistió en todo el período del experimento 38 semanas APV. Las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de antígeno recombinante fueron más altas en los animales inmunizados, sin embargo la proporción de células CD4⁺ fue más alta que la de las células CD8⁺. Sin embargo, hubo un incremento, aunque no significativo, en la población de células T CD8⁺ 26 y 38 semanas APV. En tanto que todos los antígenos recombinantes sometidos a ensayo en el estudio de los autores de la presente invención incrementaron las poblaciones de células $\gamma\delta$ TCR⁺ en ambos grupos vacunados en comparación con los animales de control, el incremento fue significativamente más alto ($P < 0,05$) para los antígenos 85A y Map74F. Otra vez, como en el caso de poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺, se notó un incremento sostenido en poblaciones de células $\gamma\delta$ TCR⁺ hasta el final del período experimental (Figura 8E). En los animales inmunizados, la proporción de células T CD25⁺ específicas del antígeno fue más alta para los cuatro antígenos recombinantes sometidos a ensayo. Aunque hubieron diferencias menores en respuestas de células T CD25⁺ entre los diferentes antígenos sometidos a ensayo, éstas no fueron significativas.

Expresión de ARNm específica de gen de citocina: Se detectó un incremento significativo en la expresión de IFN- γ específica de antígeno recombinante en los animales inmunizados ($P < 0,01$) en contraste con los animales de control comenzando 6 semanas APV (Figura 9A). Aunque los niveles de expresión se mostraron picos 10 semanas APV, los niveles permanecieron significativamente más altos en los animales inmunizados en comparación con los de control hasta 38 semanas APV. En contraste, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de IL-10 entre los animales inmunizados y los animales de control en cualquier momento del estudio de los autores de la presente invención, excepto para un incremento global en los niveles de expresión de IL-10 26-38 semanas APV en los tres grupos (Figura 9B).

Respuestas de anticuerpo específicas de antígeno recombinante: Los cuatro antígenos recombinantes sometidos a ensayo en este estudio indujeron respuestas de anticuerpo robustas en ambos grupos vacunados. Las respuestas fueron significativamente más altas ($P < 0,01$) en los grupos vacunados con respecto al grupo de control de seis semanas APV a través de todo el período experimental (Figura 10). No se detectaron diferencias significativas en las respuestas de anticuerpo entre los diferentes antígenos recombinantes usados.

Histopatología de tejidos recolectados en la necropsia: El examen histopatológico de tejidos recolectados de cada animal en la necropsia indicó que 75% de los animales de control sin vacunar (Grupo III) tuvieron granulomas en por lo menos un tejido, mientras que los animales del grupo I y grupo II tuvieron granulomas en solamente 25 y 50% de animales respectivamente. Los granulomas fueron encontrados en un nodo linfático mesentérico y el yeyuno de 1 animal y el nodo linfático ileocecal de otro animal en el Grupo I. En contraste, los granulomas en los Grupos II y III estuvieron localizados principalmente en el íleo, unión ileocecal, o cecum, mientras que el nodo linfático ileocecal fue afectado en 5 animales de estos dos grupos. No se encontraron granulomas en el duodeno de ningún animal y solamente 2 animales, uno del Grupo I y 1 del Grupo III, tuvieron granulomas en el yeyuno. Otros tejidos afectados incluían la unión cecocólica y los nodos linfáticos hepáticos en dos de los animales de control sin vacunar en el Grupo III.

Carga de MAP en tejidos después de la sensibilización: La carga de MAP en 23 tejidos recolectados de cada animal en la necropsia fue determinada mediante cultivo bacteriano (Figura 11). De entre los animales vacunados, solamente un animal en el grupo I fue positivo para un cultivo con una CFU muy baja. En el Grupo II, aunque 5/8 animales fueron positivos para MAP, la carga bacteriana fue muy baja en cuatro de los cinco animales (<5) a partir de los cuales se aisló MAP. En el Grupo III sin vacunar, los nueve animales fueron positivos para MAP, teniendo la mayoría de los animales por lo menos 5 tejidos positivos para MAP con >300 CFU (demasiadas para el recuento).

Como se hace evidente a partir de lo anterior, en este ejemplo, los autores de la presente invención evaluaron la eficacia protectora de 85A, 85B, SOD y Map74F recombinantes en un modelo de cabra. Puesto que MAP es un organismo intracelular, se cree que la respuesta Th1 mediada por células T sensibilizadas y en particular células T sensibilizadas que segregan IFN- γ , juega un papel significativo en la protección. De entre las varias herramientas usadas, la medición de la respuesta de proliferación de linfocitos al antígeno específico sometido a ensayo es ampliamente usada para determinar respuestas inmunitarias celulares. Los autores de la presente invención demostraron la detección de proliferación de linfocitos específicos de antígenos recombinantes tres semanas después de la vacunación de refuerzo, que fue significativamente más alta en los grupos vacunados en comparación con los de control después de la sensibilización, lo que indica la inducción de inmunidad celular específica de antígeno.

IFN- γ es uno de los genes de citocina principales activados en respuesta a infección por MAP en ganado. Además, se cree que la células T CD8⁺ restringidas de la clase I del complejo principal de histocompatibilidad que producen citocinas tales como IFN- γ son requeridas para la resistencia a otras infecciones micobacterianas como *M. tuberculosis*. En este ejemplo, la respuesta de IFN- γ mediada por Map74F fue detectada después de la vacunación de refuerzo y la sensibilización. Sin pretender estar limitados por alguna teoría particular, se considera que los

niveles mejorados de IFN- γ podrían haber jugado un papel importante en la inmunidad protectora de las cabras después de la sensibilización con MAP vivo mediante señalización de macrófagos mediada por IFN- γ .

Los resultados presentados en este ejemplo también muestran una respuesta de las células T CD4⁺ y CD8⁺ más alta en los animales inmunizados. Los resultados de los autores de la presente invención también apoyan la contribución de la célula T CD4⁺ a los niveles de IFN- γ periféricos y respuestas proliferativas después de la inmunización con los antígenos recombinantes. CD25 es expresado por células T activadas. Los resultados de los autores de la presente invención indican claramente una expansión de células T activadas en los animales vacunados. Aunque la población de células $\gamma\delta$ TCR⁺ siguió siendo comparativamente más pequeña que la de las células T CD4⁺ y CD8⁺, fue significativamente más alta ($P < 0,05$) en los animales inmunizados que los animales de control. Los mecanismos efector de las células T CD4⁺ están asociados con la secreción de IFN- γ , que activa la actividad bactericida en macrófagos, linfotóxina, perforina y granulísina. Las células T CD8⁺ y $\gamma\delta$ T también segregan granulísina. Esto es consistente con los resultados de los experimentos de sensibilización de los autores de la presente invención y apoyan la eficacia protectora de los antígenos recombinantes de los autores de la presente invención. El aumento de los niveles de expresión del ARNm de IFN- γ indica claramente que hubo una respuesta Th1 específica de antígeno definida en los animales inmunizados lo que fue apoyado por los niveles de expresión insignificantes de la IL-10 específica de Th2.

Con la respuesta linfoproliferativa, respuesta de IFN- γ , las respuestas de las células T CD4⁺ y CD8⁺ proporcionan evidencia para una respuesta Th1 significativa en los grupos inmunizados. Se analizaron los resultados de los experimentos de sensibilización para determinar la eficacia protectora de los antígenos recombinantes en cabras. En ausencia de los signos clínicos característicos, se considera que la histopatología y carga bacteriana de tejidos recolectados en la necropsia son el mejor patrón en la evaluación de la eficacia protectora de las vacunaciones de MAP. Los autores de la presente invención recolectaron 23 tejidos de cada uno de los 15 animales y analizaron los tejidos para determinar lesiones histopatológicas y carga de MAP por cultivo. Una reducción significativa se observó en el número de animales y tejidos con lesiones en el grupo al que se habían administrado los antígenos recombinantes y DDA, indicando eficacia protectora.

El aislamiento de MAP en cultivo es un medio más sensible para detectar MAP en tejidos, en comparación con la tinción resistente a ácido o el examen microscópico, especialmente durante la fase muy temprana de infección. Sin embargo, la distribución de lesiones granulomatosas, en general reflejó los resultados del cultivo de MAP. Los resultados de cultivo de MAP presentados en este ejemplo demuestran claramente la eficacia protectora de los cuatro antígenos recombinantes usados. La protección fue casi completa cuando los antígenos fueron administrados junto con DDA. Solamente se recuperó MAP de uno de los ocho animales de este grupo (I) y este animal tuvo una carga de MAP significativamente más baja en solamente un tejido positivo, esto es íleo distal. La administración de los antígenos sin el coadyuvante mostró protección, aunque la eficacia protectora fue comparativamente menor cuando los antígenos fueron administrados sin el coadyuvante. Esto puede ser observado de los resultados de cultivo de los animales del Grupo II que recibieron antígenos sin el coadyuvante. Aunque 5/8 animales fueron positivos para MAP, la carga bacteriana fue significativamente más baja en estos animales en comparación con los animales de control del Grupo III indicando la naturaleza protectora de los antígenos aún sin el adyuvante. Números significativamente más altos de MAP fueron recuperados de todos los animales en los grupos de control sin vacunar, lo que otra vez demuestra la eficacia protectora de los antígenos. La inmunización de cabras con los antígenos recombinantes dio como resultado una respuesta de anticuerpo sostenida durante un período prolongado. Los resultados presentados en este ejemplo indican por consiguiente que los antígenos recombinantes estimularon tanto los sistemas inmunitarios mediados por células como humorales. Después de la vacunación de refuerzo, se detectó un incremento significativo en las respuesta de anticuerpo para todos los antígenos recombinantes en ambos grupos de vacuna, en comparación con el grupo de control sin vacunar. La respuesta tenía una tendencia más alta en los animales del Grupo I que recibieron los antígenos con el coadyuvante, aunque no significativamente. El inicio prematuro de reactividad de CMI seguida por seroconversión es un elemento constante de infecciones micobacterianas de ruminantes. Sin embargo, las sub-unidades de multicomponentes de los autores de la presente invención usadas en este ejemplo confirieron protección significativa en términos de reducción de carga de bacilos en órganos objetivo en comparación con las cabras inmunizadas sustitutas.

La cita de cualquier publicación es por su descripción previa a la fecha de presentación y no debe ser interpretada como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anticiparse a tal publicación en virtud de la invención previa.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chang, Yung-Fu

<120> COMPOSICIONES PARA PRODUCIR UNA RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA MYCOBACTERIUM AVIUM SUBESPECIE PARATUBERCULOSIS

5 <130> 1258_4222PCT

<150> US 61/094.552

<151> 05-09-2008

<150> US 60/979.822

<151> 13-10-2007

10 <160> 33

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 788

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de Map74F

<400> 1

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

Asn Leu Gly Gly Leu Ile Gln Ala Asp Ala Pro Ile Lys Pro Gly Asp
20 25 30

Ser Gly Gly Pro Met Val Asn Ser Ala Gly Gln Val Ile Gly Val Asp
35 40 45

Thr Ala Ala Thr Asp Ser Tyr Lys Met Ser Gly Gly Gln Gly Phe Ala
50 55 60

Ile Pro Ile Gly Arg Ala Met Ala Val Ala Asn Gln Ile Arg Ser Gly
65 70 75 80

Ala Gly Ser Asn Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu
85 90 95

Gly Val Thr Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val
100 105 110

Asn Thr Gly Pro Ala Ala Ala Ala Gly Ile Ala Pro Gly Asp Val Ile
115 120 125

Thr Gly Val Asp Thr Val Pro Ile Asn Gly Ala Thr Ser Met Thr Glu
130 135 140

Val Leu Val Pro His His Pro Gly Asp Thr Ile Ala Val His Phe Arg
145 150 155 160

Ser Val Asp Gly Gly Glu Arg Thr Ala Asn Ile Thr Leu Ala Glu Gly
165 170 175

Pro Pro Ala Met Phe Tyr Gly Ala Phe Pro Pro Glu Phe Asn Ser Gly
180 185 190

Arg Met Tyr Ser Gly Pro Gly Ala Gly Ser Phe Val Ala Ala Ala Thr
195 200 205

Ala Trp Gln Asn Leu Ala Ala Glu Leu Gln Ser Ala Ala Ala Ser Tyr
210 215 220

Ser Thr Val Leu Ser Gly Leu Thr Ala Gly Pro Trp Val Gly Pro Ser
225 230 235 240

Ser Leu Ala Met Ala Ser Ala Ala Ala Pro Tyr Val Ala Trp Met Gln
245 250 255

Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gln Ala Thr Ala Ala
260 265 270

Ala Thr Ala Tyr Glu Thr Ala Phe Ala Ala His Val Pro Pro Ala Val
275 280 285

Ile Thr Glu Asn Arg Ala Leu Leu Ala Gln Leu Val Ala Thr Asn Ile
290 295 300

Phe Gly Gln Asn Thr Ala Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Gln Tyr Gly
305 310 315 320

Glu Phe Trp Ala Gln Asp Ala Thr Ala Met Asp Thr Tyr Phe Ala Ala
325 330 335

Ser Ala Thr Ala Ala Asn Lys Leu Thr Glu Phe Gly Pro Ala Pro Lys
340 345 350

Thr Thr Asn Glu Ala Ala Gln Pro Met Gln Ala Ala Ala Val Ser Ser
355 360 365

Ala Ala Ser Thr Pro Ala Ala Asn Val Ala Gln Thr Ala Ala Ser Ala

370	375	380
Ala Ser Thr Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Pro Phe Ser Gly Pro Ala Asn 385 390 395 400		
Leu Ala Tyr Leu Tyr Gln Thr Phe Met Thr Asn Leu Phe Asn Thr Val 405 410 415		
Pro Gly Gly Ala Ser Phe Tyr Thr Ser Met Tyr Asn Ala Val Lys Val 420 425 430		
Pro Leu Gly Leu Thr Thr Gln Phe Asn Asp Val Gly Leu Leu Val Asn 435 440 445		
Phe Pro Leu Ser Gln Trp Leu Lys Phe Ala Pro Pro Ile Gly Tyr Gly 450 455 460		
Ala Leu Pro Lys Asp Ala Leu Gly Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Phe 465 470 475 480		
Gly Arg Gly Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Ser Pro Val Ala Gly Met Gly 485 490 495		
Asn Ala Gly Thr Leu Val Gly Lys Leu Ser Ile Pro Pro Ser Trp Ala 500 505 510		
Thr Ala Thr Pro Ser Ile Arg Thr Val Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala 515 520 525		
Gly Ala Glu Ala Val Pro Ala Ala Ala Leu Gly Glu Gly Ser Leu Phe 530 535 540		
Ser Ser Met Gly Leu Ala Gly Met Leu Gly Ser Ala Val Gly Ser Gly 545 550 555 560		
Gly Pro Thr Met Val Arg Gly Gly Val Arg Asn Arg Met Thr Ala Ile 565 570 575		
Lys Asp Leu Lys Asp Lys Gln Ser Pro Glu Gln Leu Lys Arg Leu Val 580 585 590		
Ala Gln Ile Ser Glu Gln Pro Glu Ser Val Gln His His Asn Val Asp 595 600 605		
Gln Glu Asn Leu Asp Ala Leu Leu Glu Gln Leu Ala Lys Lys Pro Gly 610 615 620		

Ile His Ala Val His Leu Lys Lys Gly Asp Lys Ser Lys Val Leu Gly
625 630 635 640

Leu Ala Pro Ala Ser Ala Ala Pro Ser Gly Leu Ala Leu Asp Arg Phe
645 650 655

Ala Asp Arg Pro Leu Ala Pro Ile Asp Pro Ser Ala Met Val Gly Gln
660 665 670

Val Gly Pro Gln Val Val Asn Ile Asp Thr Lys Phe Gly Tyr Asn Asn
675 680 685

Ala Val Gly Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val
690 695 700

Leu Thr Asn Asn His Val Ile Ser Gly Ala Thr Glu Ile Ser Ala Phe
705 710 715 720

Asp Val Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Ala Val Asp Val Val Gly Tyr Asp
725 730 735

Arg Thr Gln Asp Ile Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Ala Gly Leu
740 745 750

Pro Thr Ala Thr Ile Gly Gly Glu Ala Thr Val Gly Glu Pro Ile Val
755 760 765

Ala Leu Gly Asn Val Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Asn Ala Val Ala
770 775 780

Gly Lys Val Ala
785

<210> 2

<211> 361

<212> PRT

5 <213> MYCOBACTERIUM AVIUM SUBESPECIE PARATUBERCULOSIS

<400> 2

Met Ser Lys Ser His His His Arg Ser Val Trp Trp Ser Trp Leu Val
1 5 10 15

Gly Val Leu Thr Val Val Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Ser Gly Val
20 25 30

Gly Leu Ala Pro Ala Ser Ala Ala Pro Ser Gly Leu Ala Leu Asp Arg
35 40 45

Phe Ala Asp Arg Pro Leu Ala Pro Ile Asp Pro Ser Ala Met Val Gly
50 55 60

Gln Val Gly Pro Gln Val Val Asn Ile Asp Thr Lys Phe Gly Tyr Asn
65 70 75 80

Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val
85 90 95

Val Leu Thr Asn Asn His Val Ile Ser Gly Ala Thr Glu Ile Ser Ala
100 105 110

Phe Asp Val Gly Asn Gly Gln Thr Tyr Ala Val Asp Val Val Gly Tyr
115 120 125

Asp Arg Thr Gln Asp Ile Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Ala Gly
130 135 140

Leu Pro Thr Ala Thr Ile Gly Gly Glu Ala Thr Val Gly Glu Pro Ile
145 150 155 160

Val Ala Leu Gly Asn Val Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Asn Ala Val
165 170 175

Ala Gly Lys Val Val Ala Leu Asn Gln Ser Val Ser Ala Thr Asp Thr
180 185 190

Leu Thr Gly Ala Gln Glu Asn Leu Gly Gly Leu Ile Gln Ala Asp Ala
195 200 205

Pro Ile Lys Pro Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Asn Ser Ala Gly
210 215 220

Gln Val Ile Gly Val Asp Thr Ala Ala Thr Asp Ser Tyr Lys Met Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Arg Ala Met Ala Val Ala
245 250 255

Asn Gln Ile Arg Ser Gly Ala Gly Ser Asn Thr Val His Ile Gly Pro
260 265 270

Thr Ala Phe Leu Gly Leu Gly Val Thr Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala

ES 2 390 996 T3

275

280

285

Arg Val Gln Arg Val Val Asn Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gly Ile
290 295 300

Ala Pro Gly Asp Val Ile Thr Gly Val Asp Thr Val Pro Ile Asn Gly
305 310 315 320

Ala Thr Ser Met Thr Glu Val Leu Val Pro His His Pro Gly Asp Thr
325 330 335

Ile Ala Val His Phe Arg Ser Val Asp Gly Gly Glu Arg Thr Ala Asn
340 345 350

Ile Thr Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala
355 360

<210> 3

<211> 467

<212> PRT

5 <213> MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIE PARATUBERCULOSIS

<400> 3

Met Phe Tyr Gly Ala Phe Pro Pro Glu Phe Asn Ser Gly Arg Met Tyr
1 5 10 15

Ser Gly Pro Gly Ala Gly Ser Phe Val Ala Ala Ala Thr Ala Trp Gln
20 25 30

Asn Leu Ala Ala Glu Leu Gln Ser Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Thr Val
35 40 45

Leu Ser Gly Leu Thr Ala Gly Pro Trp Val Gly Pro Ser Ser Leu Ala
50 55 60

Met Ala Ser Ala Ala Ala Pro Tyr Val Ala Trp Met Gln Gln Thr Ala
65 70 75 80

Ala Gln Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gln Ala Thr Ala Ala Ala Thr Ala
85 90 95

Tyr Glu Thr Ala Phe Ala Ala His Val Pro Pro Ala Val Ile Thr Glu
100 105 110

Asn Arg Ala Leu Leu Ala Gln Leu Val Ala Thr Asn Ile Phe Gly Gln
115 120 125

ES 2 390 996 T3

Asn Thr Ala Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Gln Tyr Gly Glu Phe Trp
 130 135 140
 Ala Gln Asp Ala Thr Ala Met Asp Thr Tyr Phe Ala Ala Ser Ala Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Asn Lys Leu Thr Glu Phe Gly Pro Ala Pro Lys Thr Thr Asn
 165 170 175
 Glu Ala Ala Gln Pro Met Gln Ala Ala Ala Val Ser Ser Ala Ala Ser
 180 185 190
 Thr Pro Ala Ala Asn Val Ala Gln Thr Ala Ala Ser Ala Ala Ser Thr
 195 200 205
 Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Pro Phe Ser Gly Pro Ala Asn Leu Ala Tyr
 210 215 220
 Leu Tyr Gln Thr Phe Met Thr Asn Leu Phe Asn Thr Val Pro Gly Gly
 225 230 235 240
 Ala Ser Phe Tyr Thr Ser Met Tyr Asn Ala Val Lys Val Pro Leu Gly
 245 250 255
 Leu Thr Thr Gln Phe Asn Asp Val Gly Leu Leu Val Asn Phe Pro Leu
 260 265 270
 Ser Gln Trp Leu Lys Phe Ala Pro Pro Ile Gly Tyr Gly Ala Leu Pro
 275 280 285
 Lys Asp Ala Leu Gly Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Phe Gly Arg Gly
 290 295 300
 Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Ser Pro Val Ala Gly Met Gly Asn Ala Gly
 305 310 315 320
 Thr Leu Val Gly Lys Leu Ser Ile Pro Pro Ser Trp Ala Thr Ala Thr
 325 330 335
 Pro Ser Ile Arg Thr Val Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Gly Ala Glu
 340 345 350
 Ala Val Pro Ala Ala Ala Leu Gly Glu Gly Ser Leu Phe Ser Ser Met
 355 360 365

Gly Leu Ala Gly Met Leu Gly Ser Ala Val Gly Ser Gly Gly Pro Thr
370 375 380

Met Val Arg Gly Gly Val Arg Asn Arg Met Thr Ala Ile Lys Asp Leu
385 390 395 400

Lys Asp Lys Gln Ser Pro Glu Gln Leu Lys Arg Leu Val Ala Gln Ile
405 410 415

Ser Glu Gln Pro Glu Ser Val Gln His His Asn Val Asp Gln Glu Asn
420 425 430

Leu Asp Ala Leu Leu Glu Gln Leu Ala Lys Lys Pro Gly Ile His Ala
435 440 445

Val His Leu Lys Lys Gly Asp Lys Ser Lys Val Leu Pro Ala Asp Ala
450 455 460

Gln Leu Gly
465

<210> 4

<211> 44

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador amplificación PCR

<400> 4

tacatatgca tcatcatcat catcatctca accagagcgt ctcg 44

10 <210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador PCR

<400> 5

tagaattcgg ccggcggccc ctccgcc 27

<210> 6

<211> 32

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 6

ctaatacgaat tcatgttcta tggggccttt c 31

25

<210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 7
taatcgatat ccaggacctt ggactgtc 29
 <210> 8
 10 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 15 <400> 8
atgatatcgg gctggcgccg gcgtcc 26
 <210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 9
atctcgagtc acgcgacctt gccggc 26
 25 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Ratón
 <400> 10
 30 **cctgagcagg atggagaatt aca 23**
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Ratón
 35 <400> 11
tccagaacat gccgcagag 19
 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 40 <213> Ratón
 <400> 12
cccaagcagg ccacagaatt gaaag 25
 <210> 13
 <211> 20
 45 <212> ADN

<213> Ratón
<400> 13

ggaagcacgg cagcagaata 20

5 <210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Ratón
<400> 14

aacttgaggg agaagtagga atgg 24

10 <210> 15
<211> 24
<212> ADN
<213> Ratón
<400> 15

catcatcaaa ccagaccgc ccaa 24

15 <210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Ratón

20 <400> 16

catcttcca aaattcgagt gacaa 25

25 <210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Ratón
<400> 17

tgggagtaga caaggtacaa ccc 23

30 <210> 18
<211> 26
<212> ADN
<213> Ratón
<400> 18

cacgtcgtag caaaccacca agtgga 26

35 <210> 19
<211> 24
<212> ADN
<213> Ratón
<400> 19

tcaagtggca tagatgtgga agaa 24

40 <210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Ratón

<400> 20

tggtctgca ggatttcat g 21

<210> 21
 <211> 27
 5 <212> ADN
 <213> Ratón

<400> 21

tcaccatcct ttgccagtt cctccag 27

<210> 22
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Ratón

<400> 22

tcaccacat ggagaaggc 19

<210> 23
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Ratón

<400> 23

gctaagcagt tgggtgtgca 20

<210> 24
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Ratón

<400> 24

atgccccat gttgtgatg ggtgt 25

<210> 25
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Bovino

<400> 25

caaattccgg tggatgatct g 21

<210> 26
 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Bovino

<400> 26

gcgacaggtc attcatcacc tt 22

<210> 27
 40 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Bovino

<400> 27

	atccagcgca aagccataaa tgaactca	28
	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Bovino	
	<400> 28	
	ccaggatggt gactcgacta gac	23
	<210> 29	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Bovino	
	<400> 29	
	tggctctgct ctcccagaac	20
	<210> 30	
15	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Bovino	
	<400> 30	
	ccgacataaa cctctgaaat ccgaccca	28
20	<210> 31	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Bovino	
	<400> 31	
25	gcccctctga accccaaa	18
	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Bovino	
30	<400> 32	
	gcaggagtgt tgaaagtctc gaa	23
	<210> 33	
	<211> 27	
	<212> ADN	
35	<213> Bovino	
	<400> 33	
	ccaaccgtga gaagatgacc cagatca	27

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una proteína recombinante, **caracterizada porque** la proteína comprende del extremo N al extremo C:
 - i) un fragmento C-terminal de proteína Map3527 que comprende los aminoácidos 183 - 361 de SEQ ID NO: 2;
 - 5 ii) una secuencia de proteína de Map 1519 que comprende los aminoácidos 1-460 de SEQ ID NO: 3; y
 - iii) un fragmento N-terminal de proteína Map3527 que comprende los aminoácidos 33 - 180 de SEQ ID NO: 2.
2. La composición de la reivindicación 1, **caracterizada porque** la secuencia de la proteína Map1519 comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3.
3. La composición de la reivindicación 1, **caracterizada porque** el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1.
4. La composición de la reivindicación 1, **caracterizada porque** la composición comprende además un coadyuvante.
5. La composición de la reivindicación 4, **caracterizada porque** el coadyuvante se selecciona del grupo que consiste en un monofosforil lípido A (MPL), bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDA) y combinaciones de los mismos.
6. La composición de la reivindicación 1, **caracterizada porque** la composición comprende además una proteína de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en proteína 85A de MAP, proteína 85B de MAP, proteína superóxido dismutasa de MAP (SOD), y combinaciones de las mismas.
7. La composición de la reivindicación 1, para su uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) en un mamífero mediante la administración de la composición al mamífero.
8. La composición de la reivindicación 7, **caracterizada porque** la composición comprende además un coadyuvante.
9. La composición de la reivindicación 10, **caracterizada porque** el coadyuvante se selecciona del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL) y bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDA).
10. La composición de la reivindicación 7, **caracterizada porque** la composición es administrada a un rumiante.
11. La composición de la reivindicación 10, **caracterizada porque** el rumiante es un bovino, una oveja, una cabra, un venado o un alce.
12. La composición de la reivindicación 11, **caracterizada porque** el rumiante es un bovino.
13. La composición de la reivindicación 10, **caracterizada porque** el rumiante no está infectado con MAP.
14. La composición de la reivindicación 10, **caracterizada porque** el rumiante está infectado con MAP.
15. La composición de la reivindicación 12, **caracterizada porque** el bovino tiene la enfermedad de Johne.
16. La composición de la reivindicación 7, **caracterizada porque** el animal está preñado.
17. La composición de la reivindicación 7, **caracterizada porque** la composición comprende además una proteína de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), donde la proteína es seleccionada del grupo que consiste de proteína 85A de MAP, proteína 85B de MAP, proteína SOD de MAP, y combinaciones de las mismas.
18. La composición de la reivindicación 7, **caracterizada porque** el polipéptido de la composición comprende la secuencia del SEQ ID NO: 1.

Figura 1A

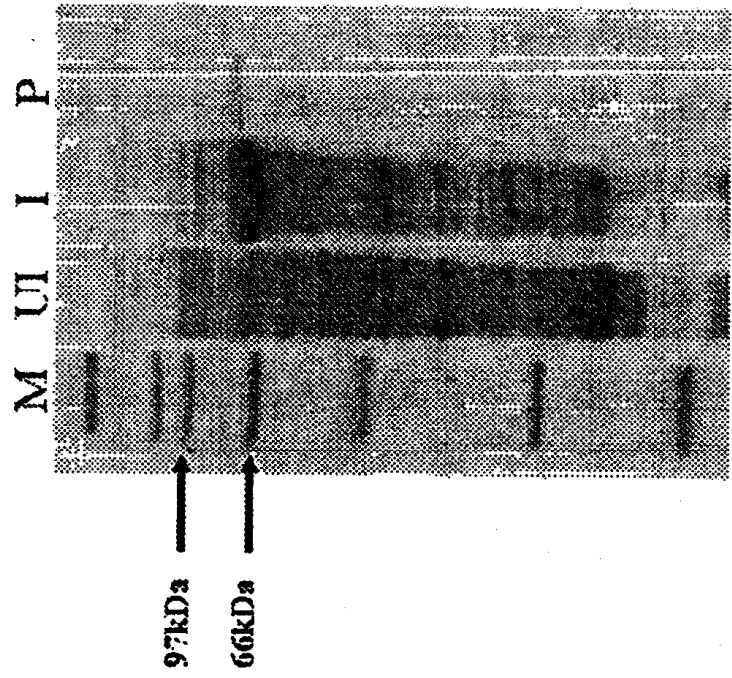
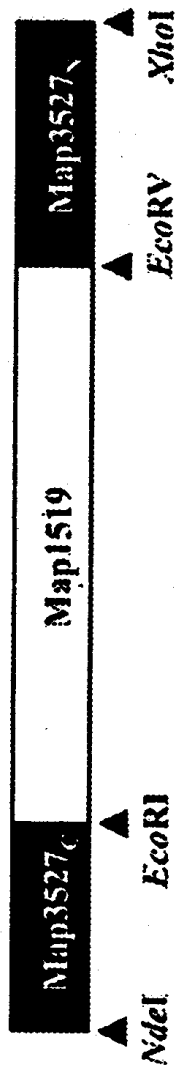


Figura 1B

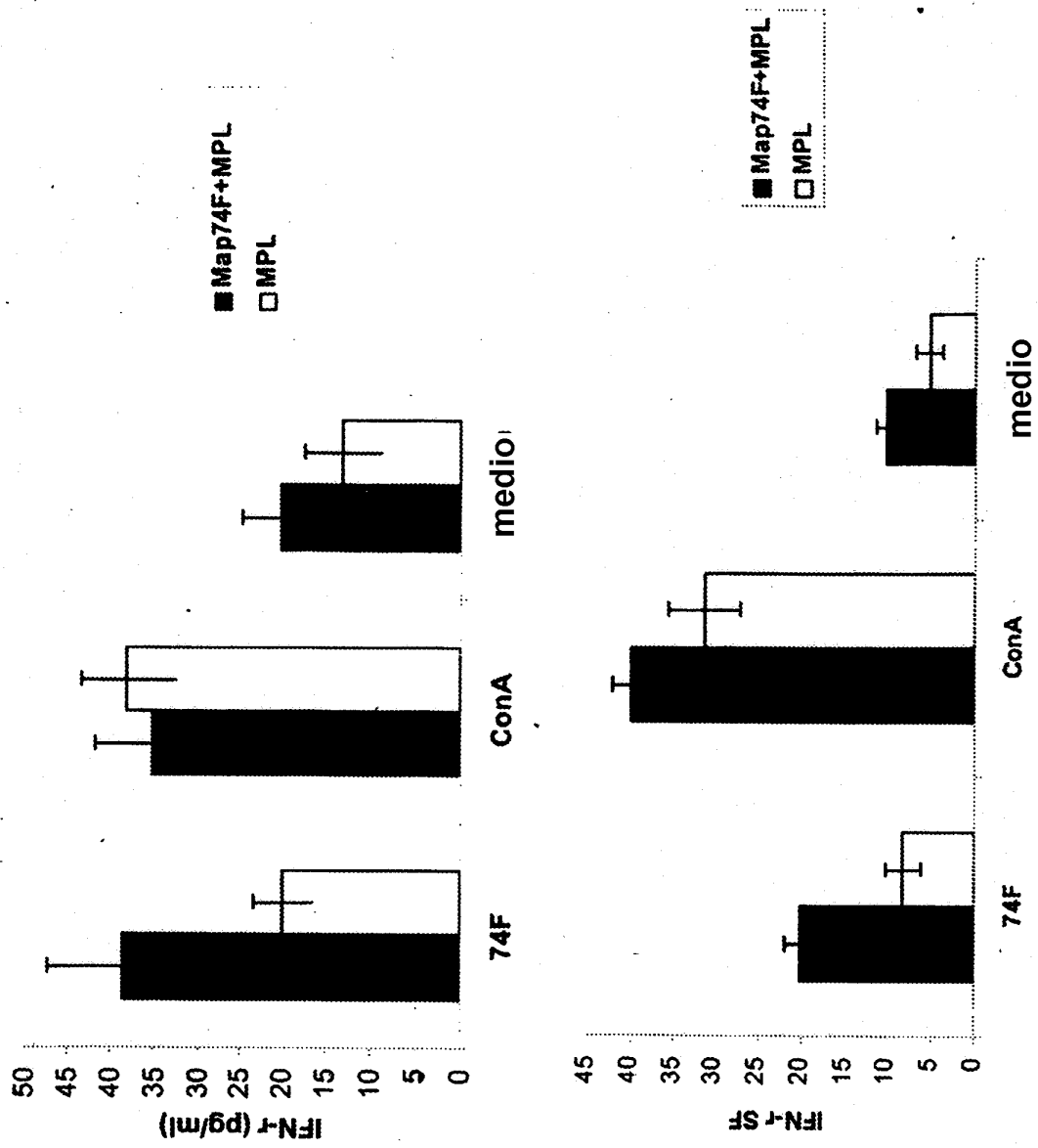


Figura 2A

Figura 2B

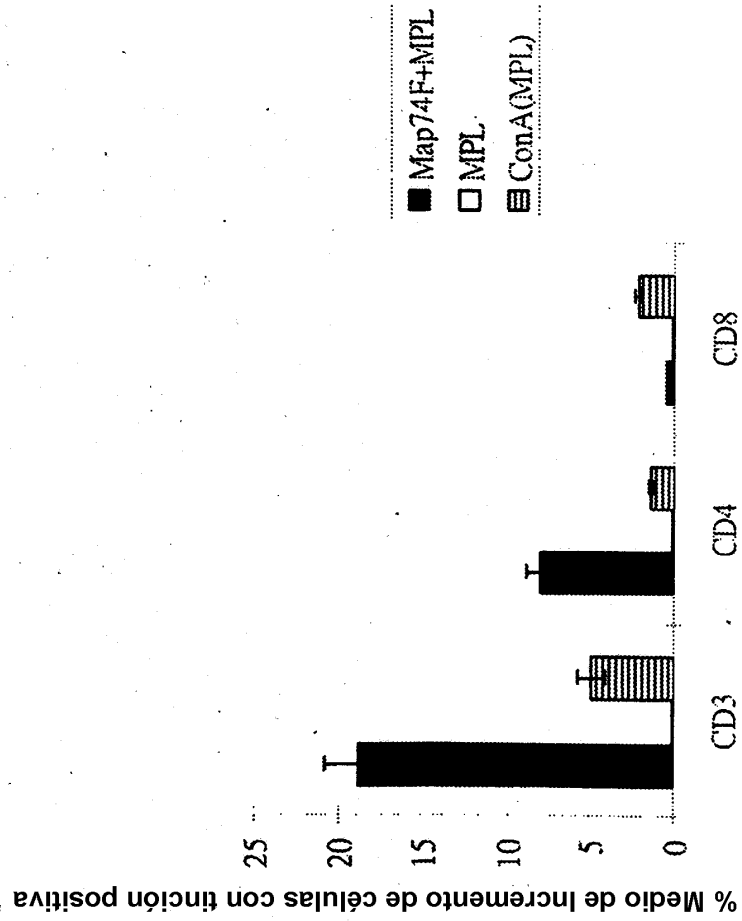


Figura 2C

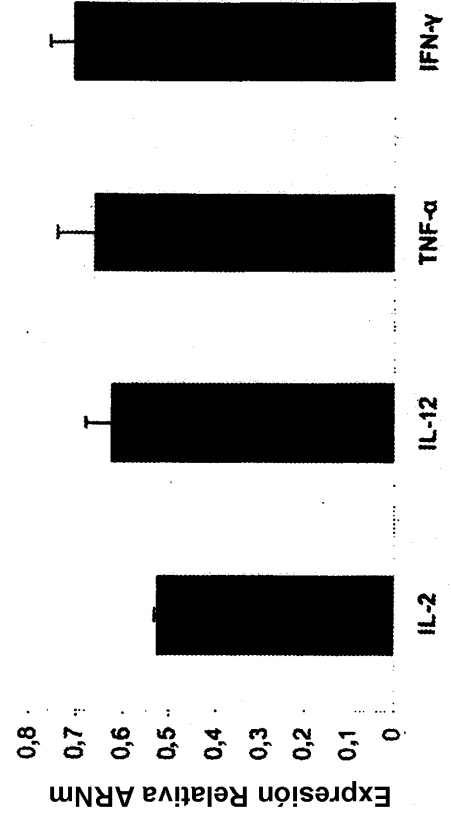


Figura 2D

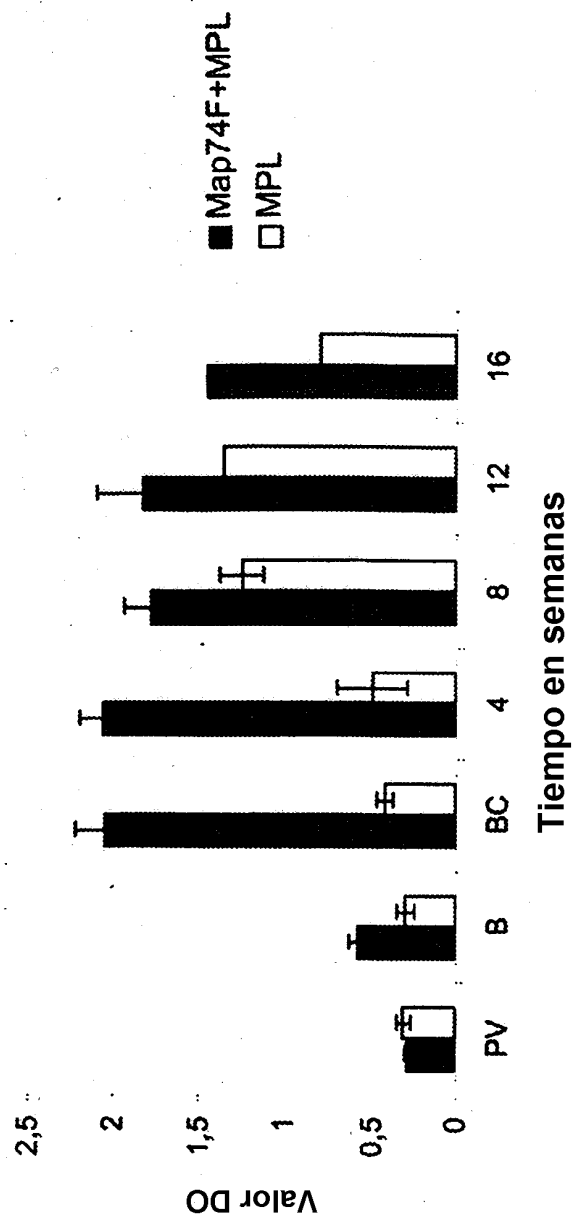


Figura 3A

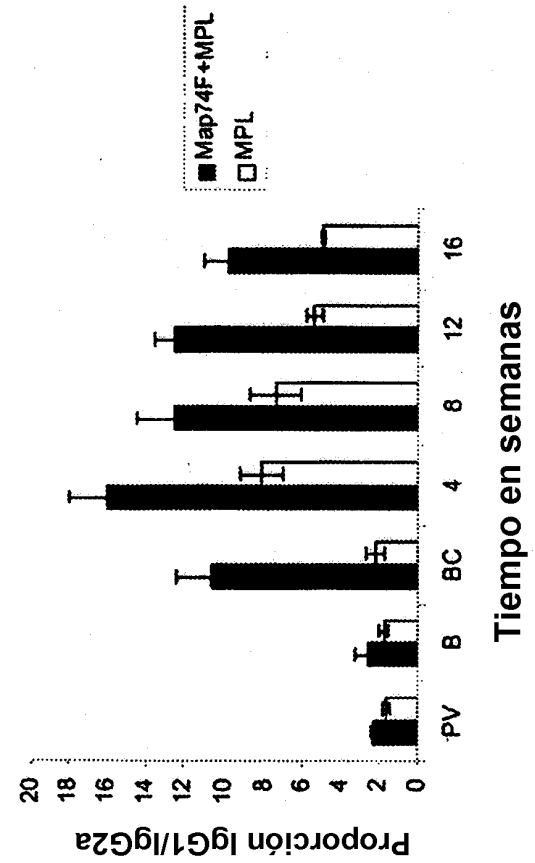
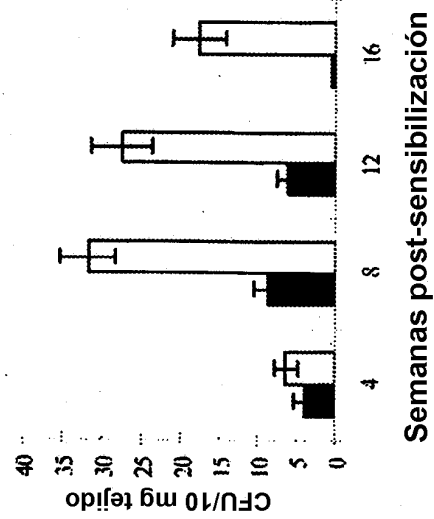


Figura 3B

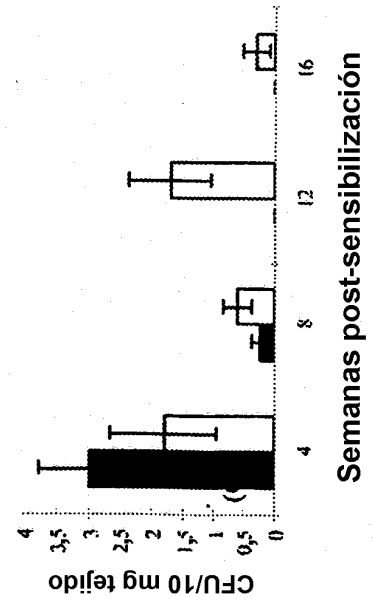
Figura 4A

Bazo



Semanas post-sensibilización

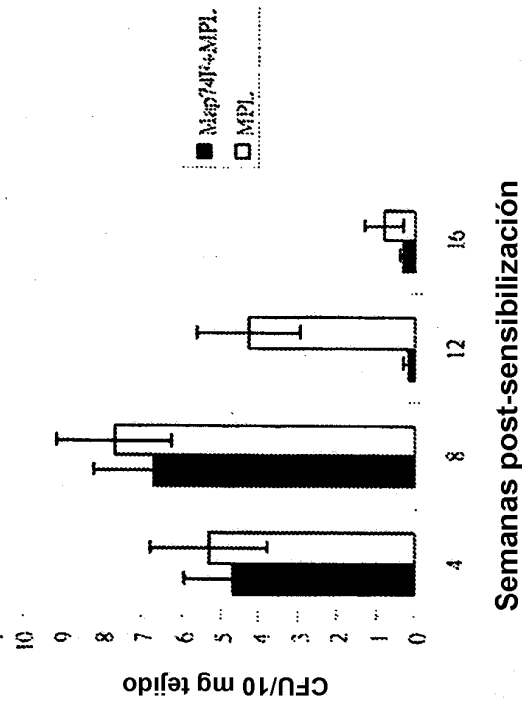
MLN



Semanas post-sensibilización

Figura 4B

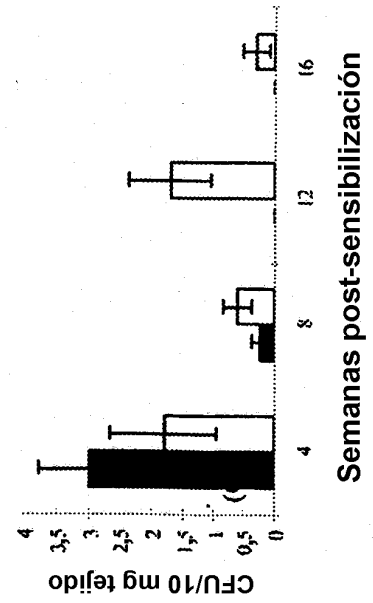
Hígado



Semanas post-sensibilización

Figura 4C

Map74F+MPL
MPL



Semanas post-sensibilización

Figura 5B

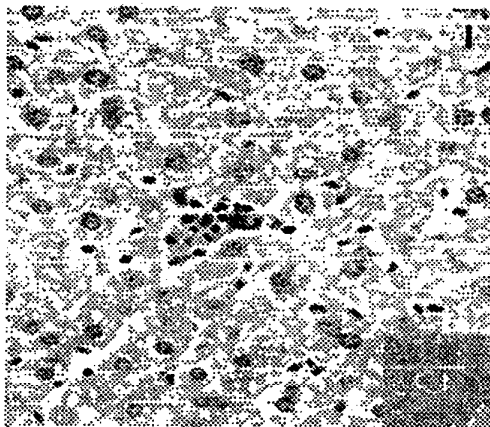


Figura 5D

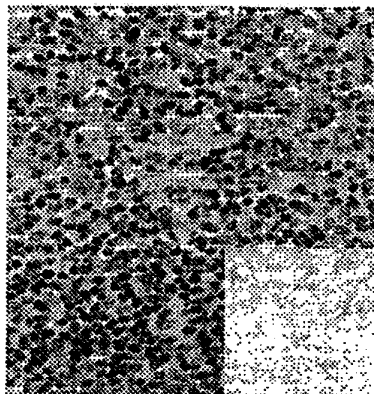


Figura 5A

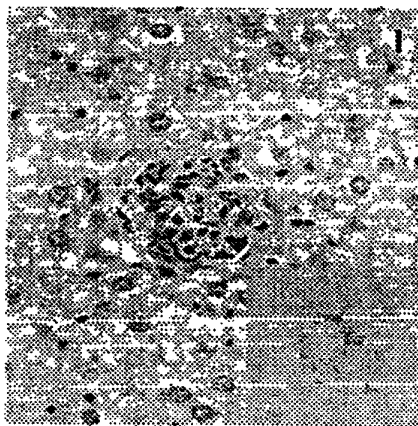


Figura 5C

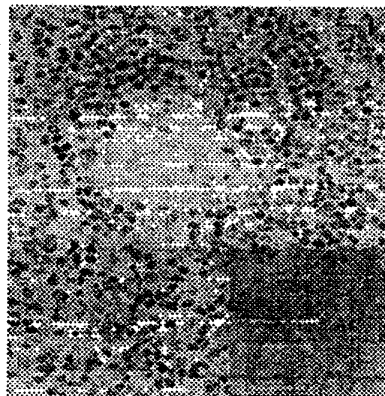


Figura 6A

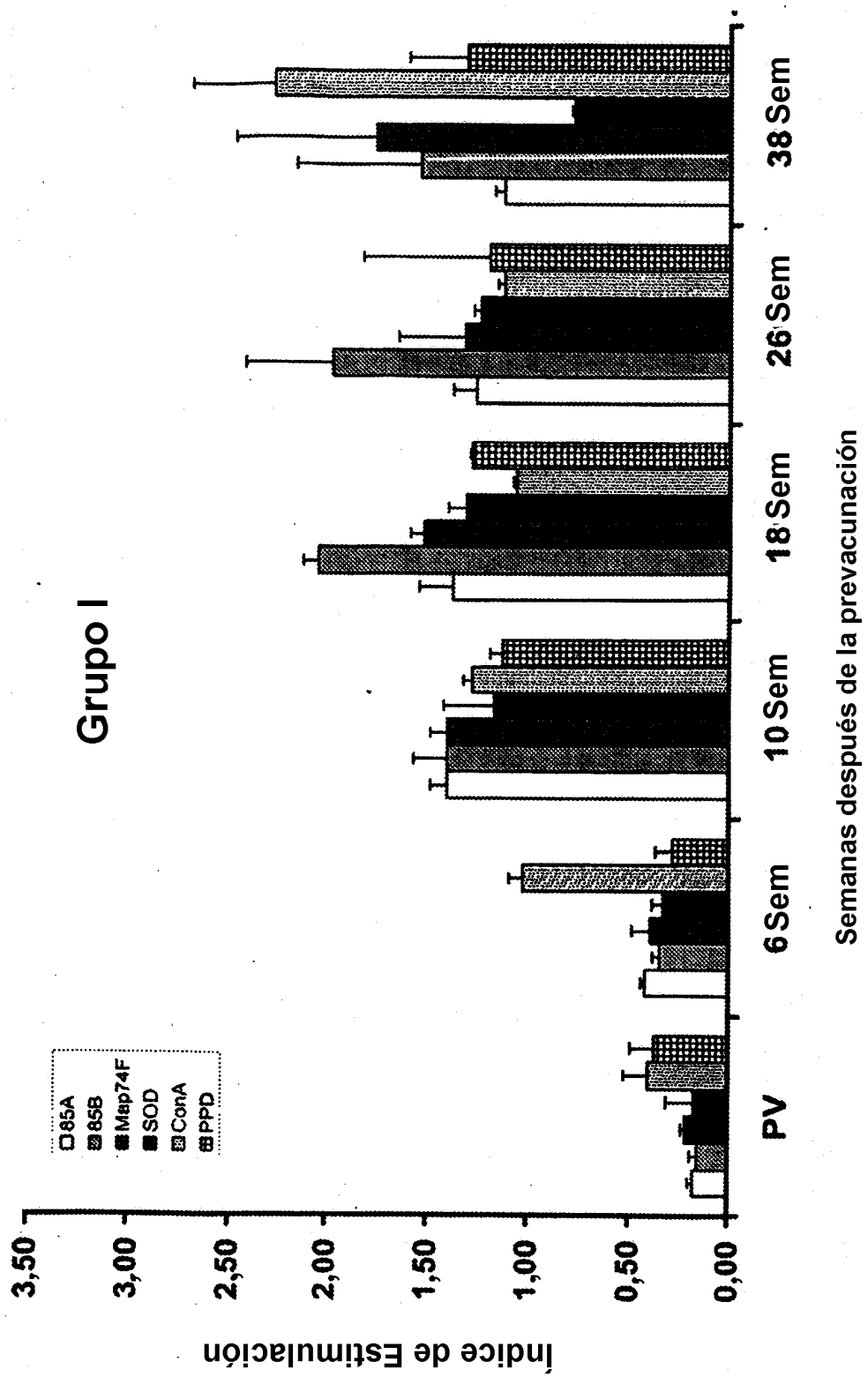


Figura 6B

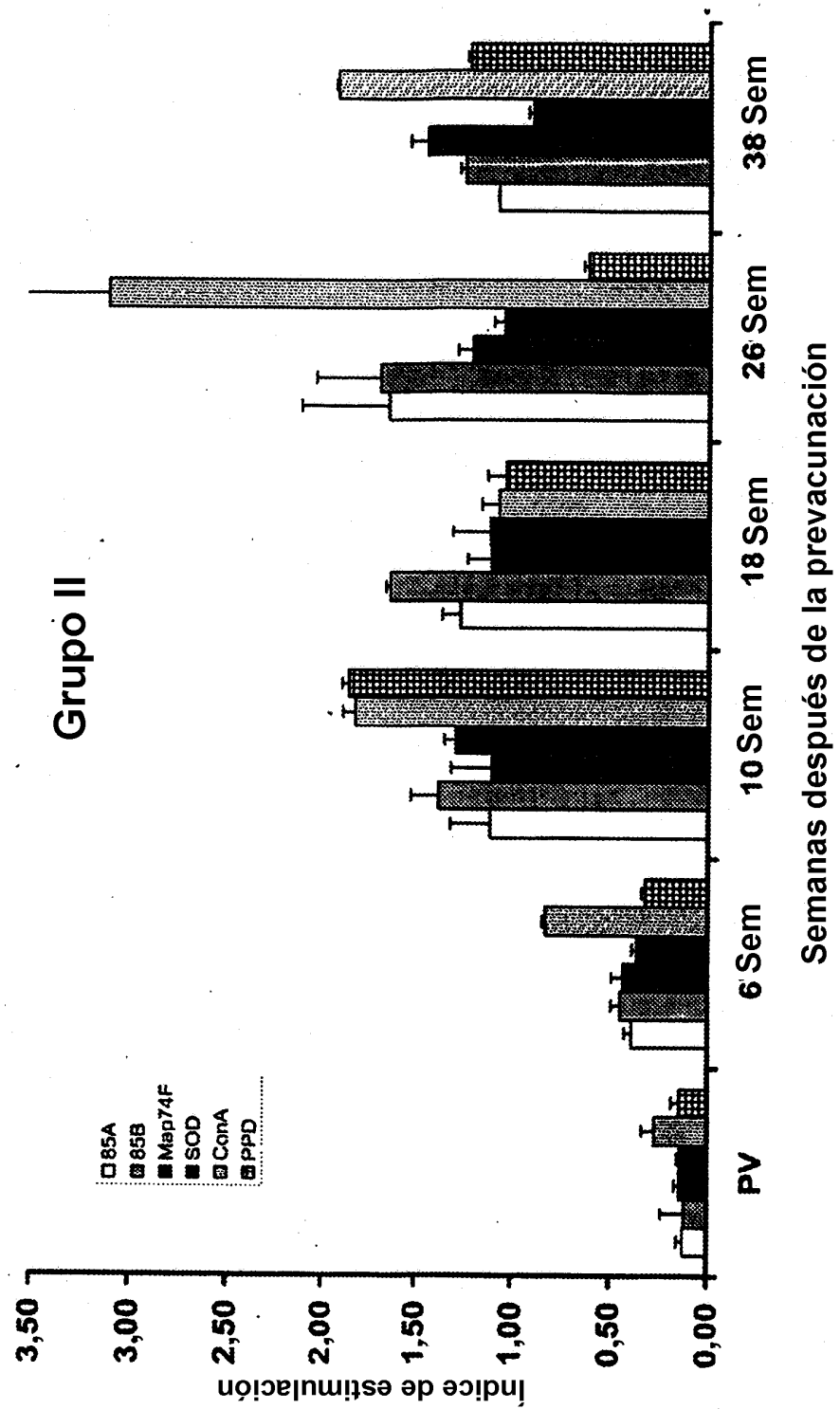


Figura 6C

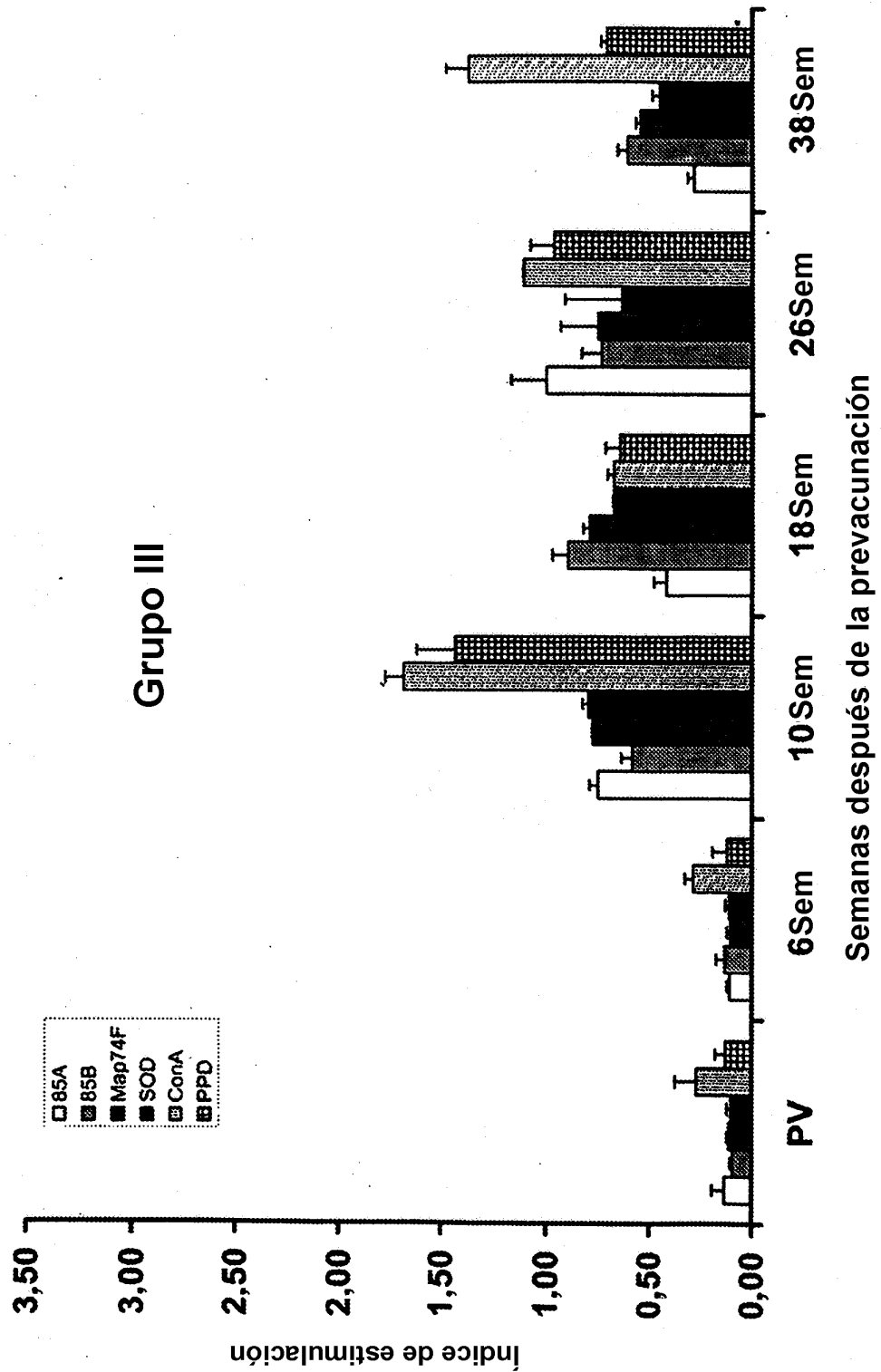


Figura 7A

Grupo I

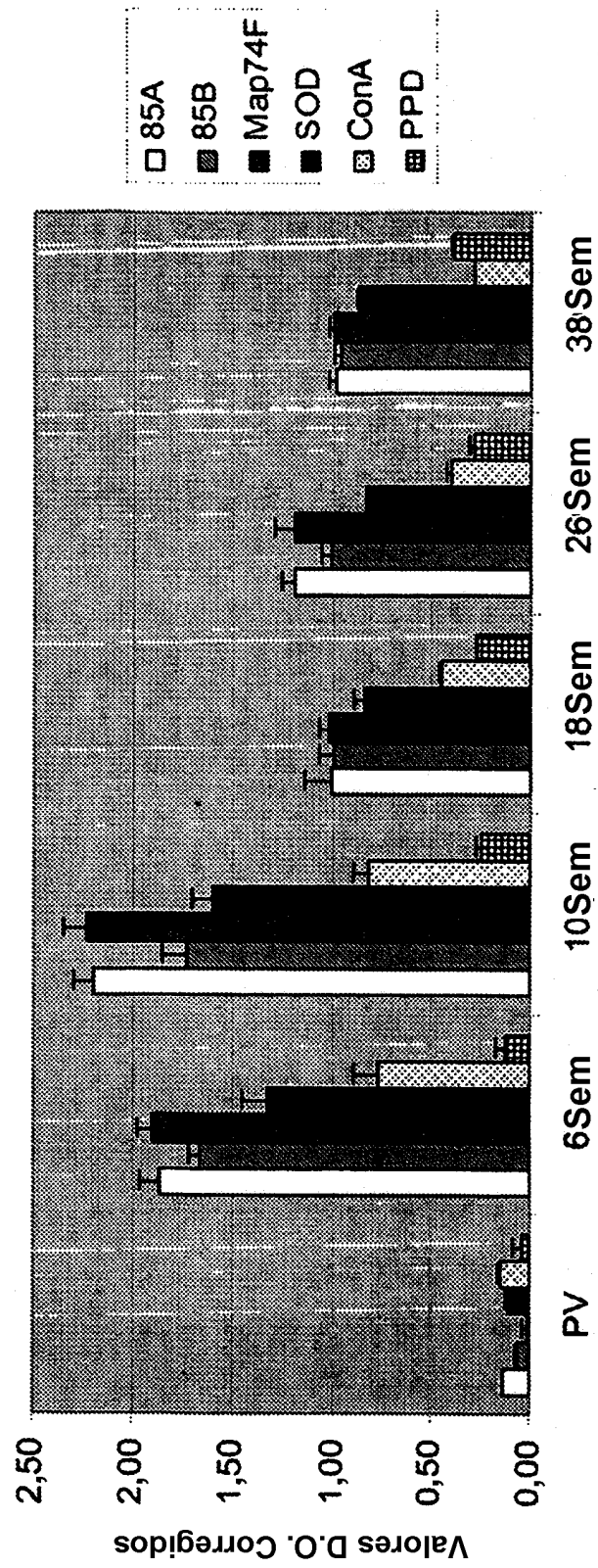


Figura 7B

Grupo II

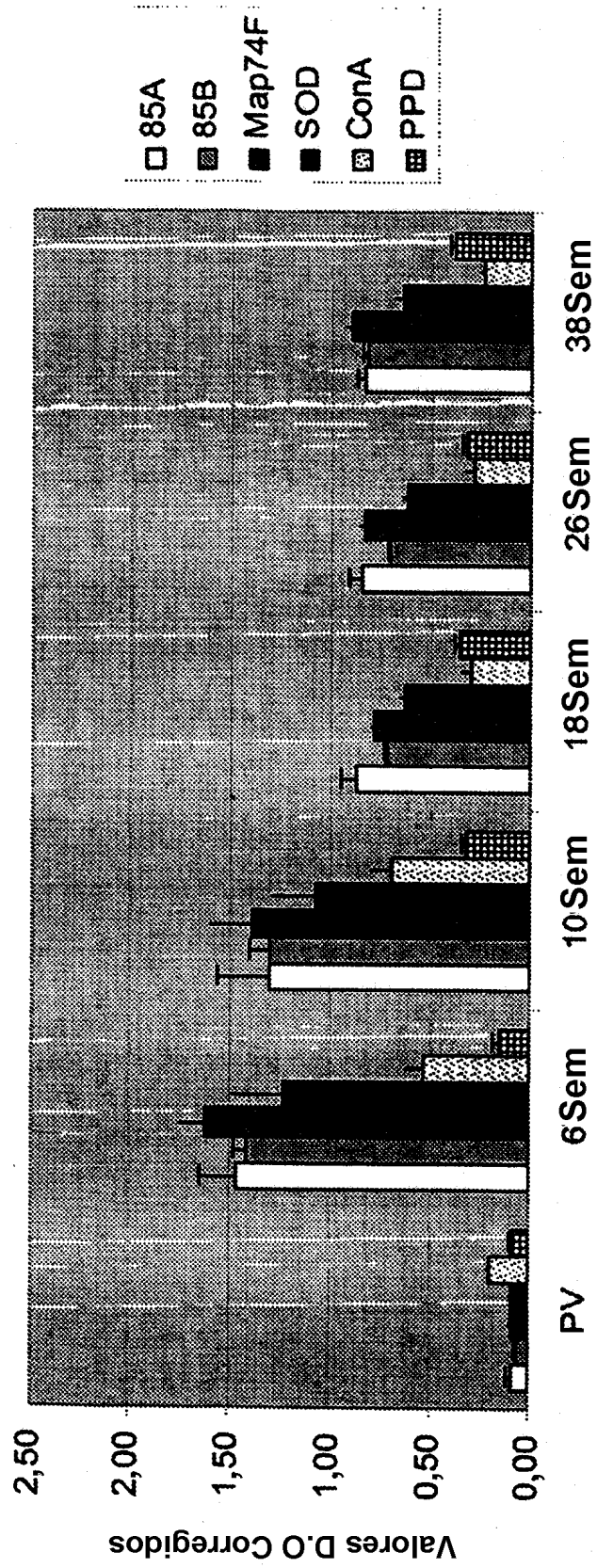


Figura 7C

Grupo III

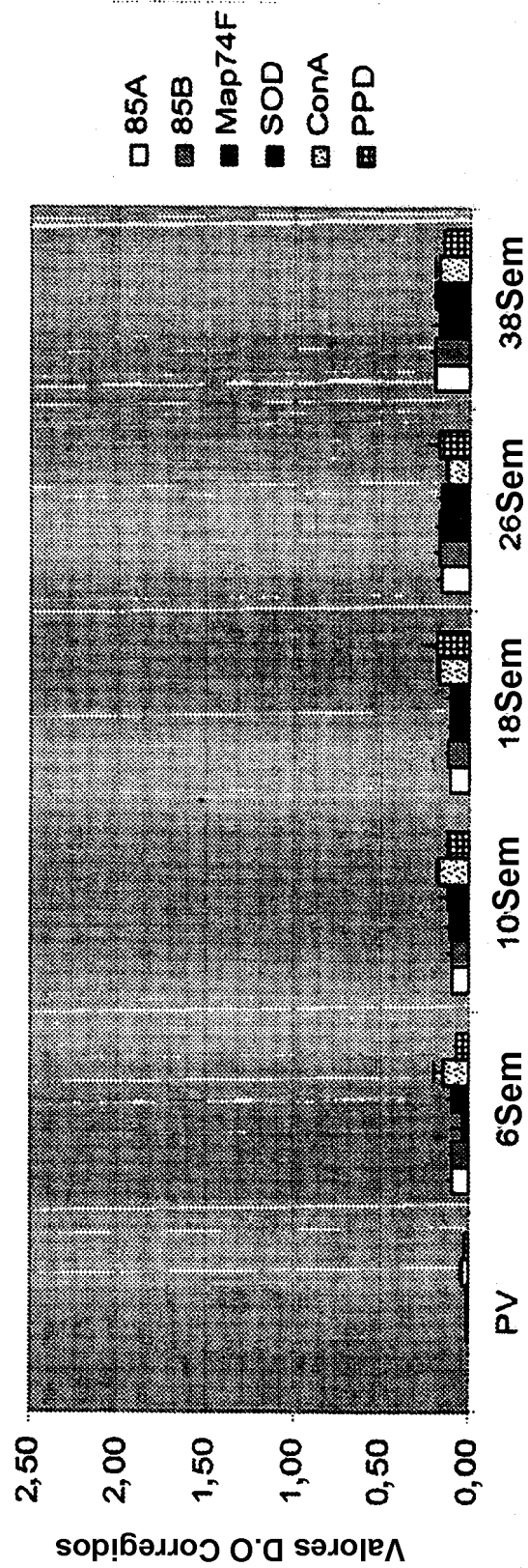


Figura 8A

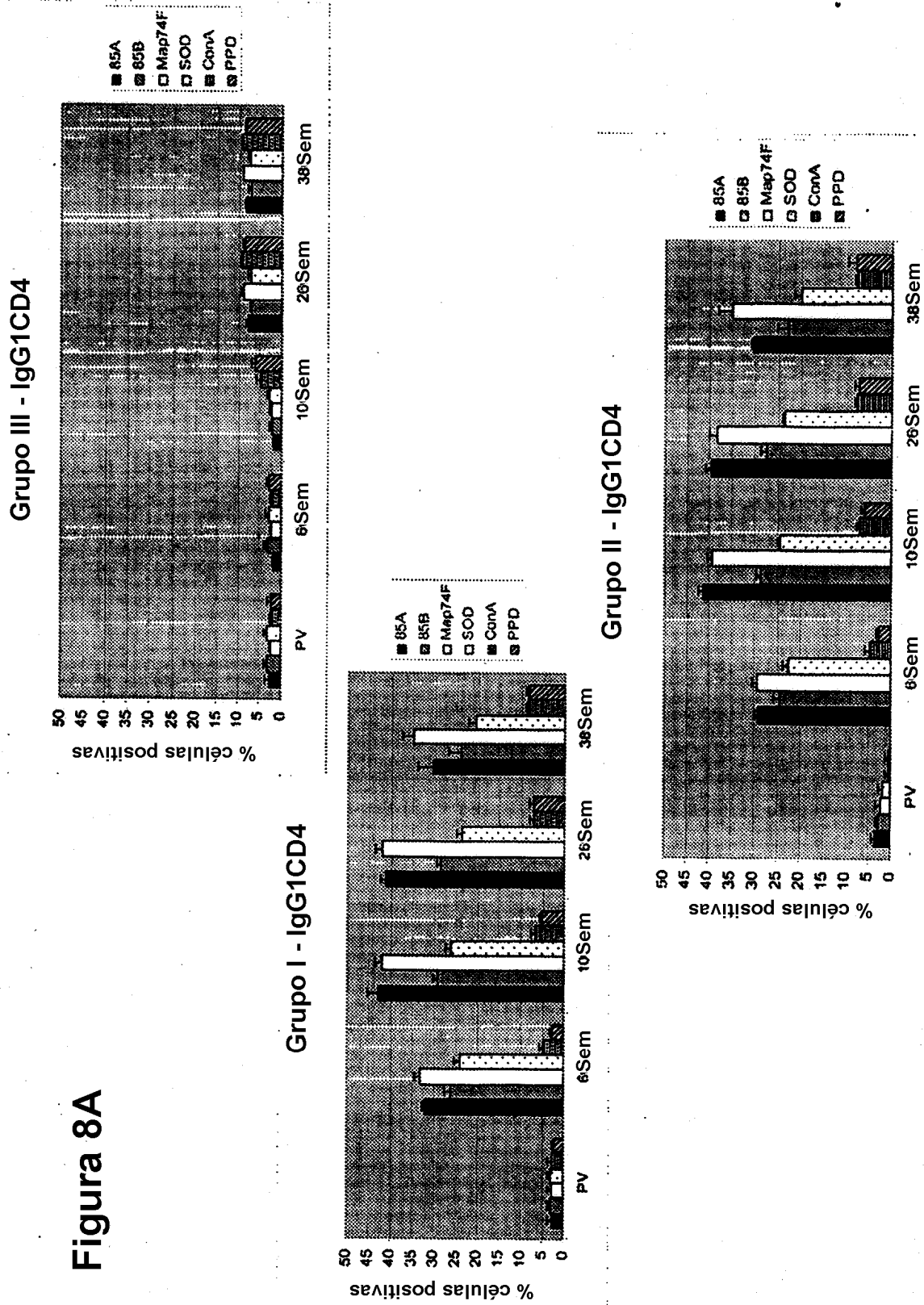


Figura 8B

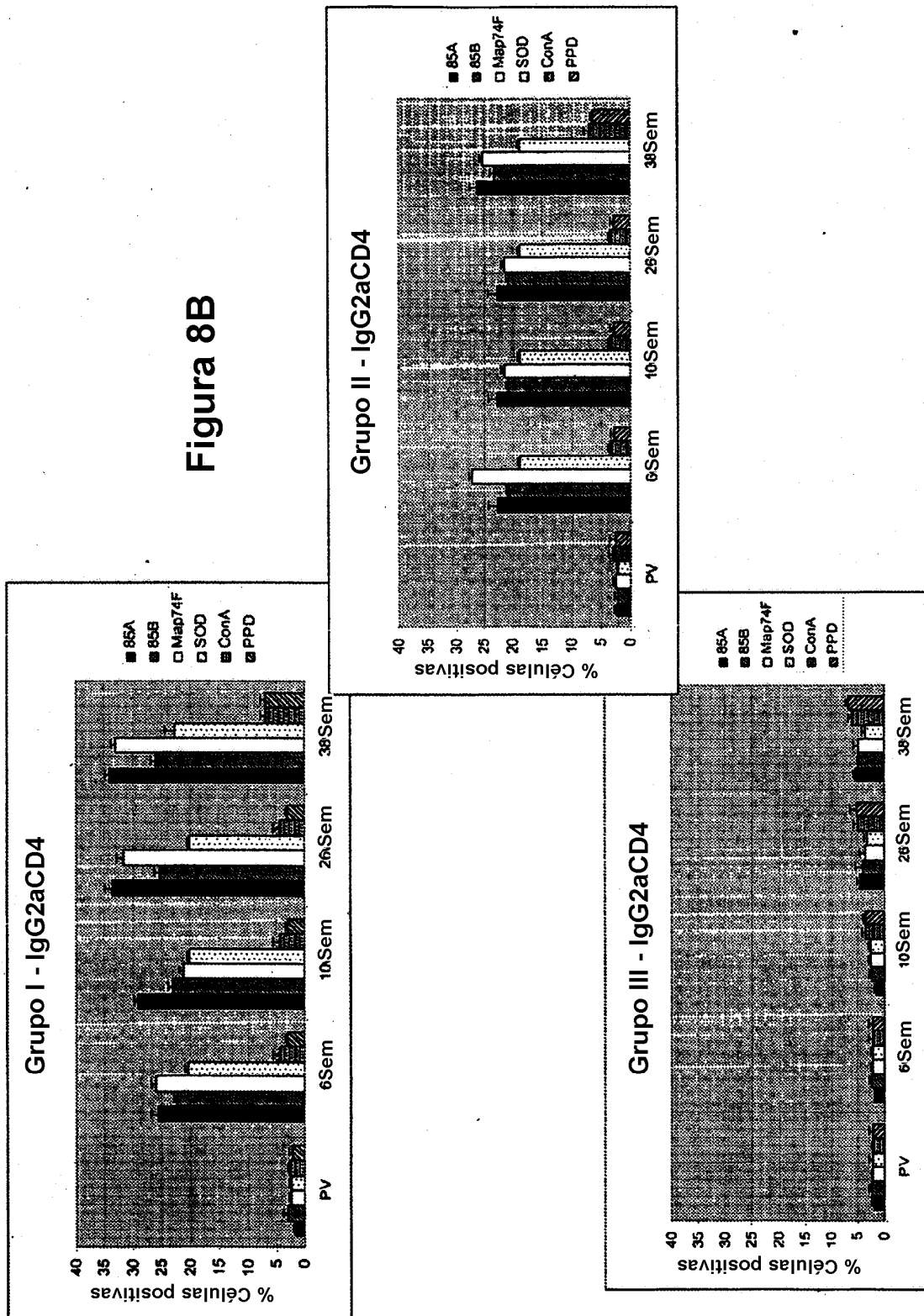


Figura 8C

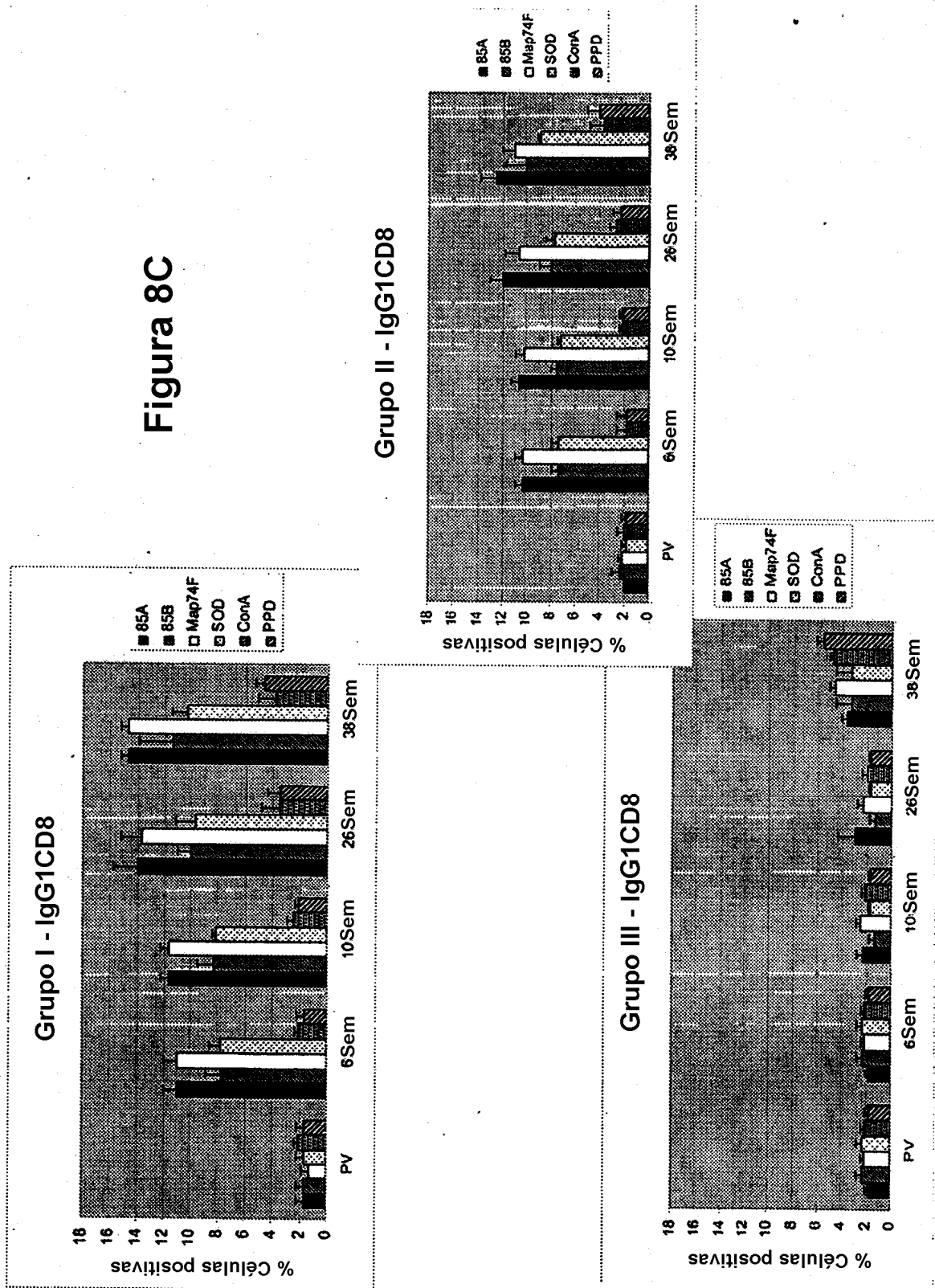


Figura 8D

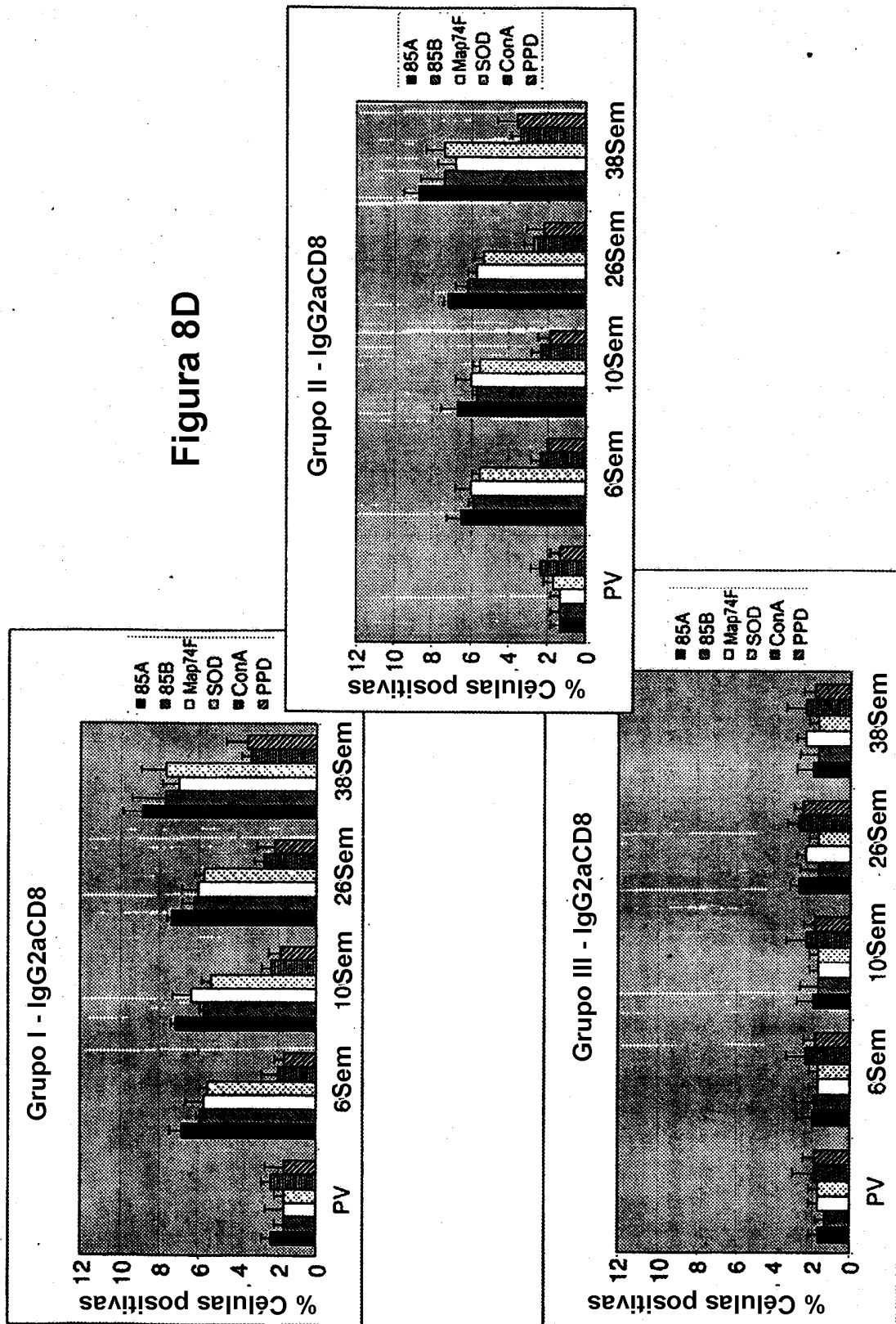


Figura 8E

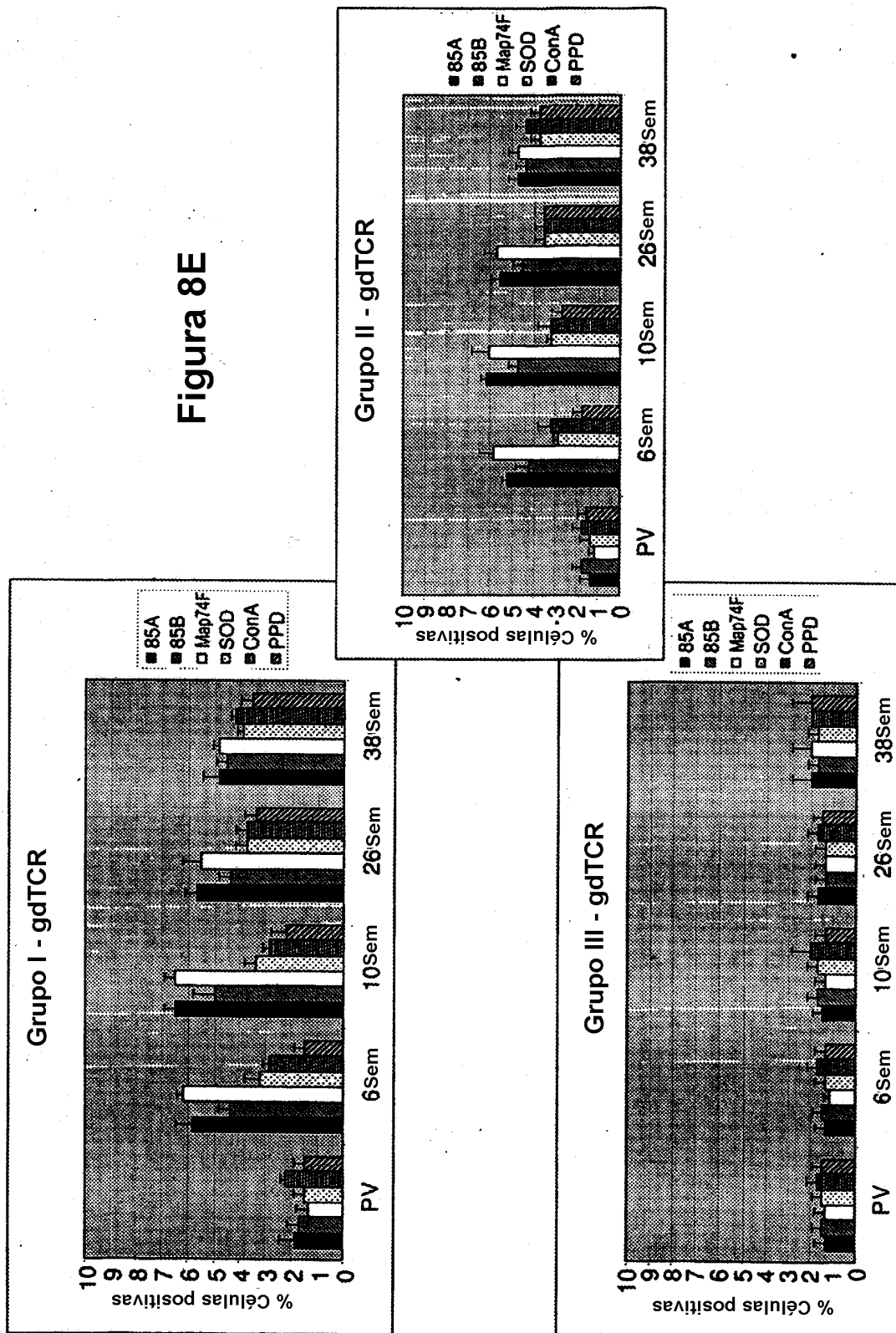


Figura 8F

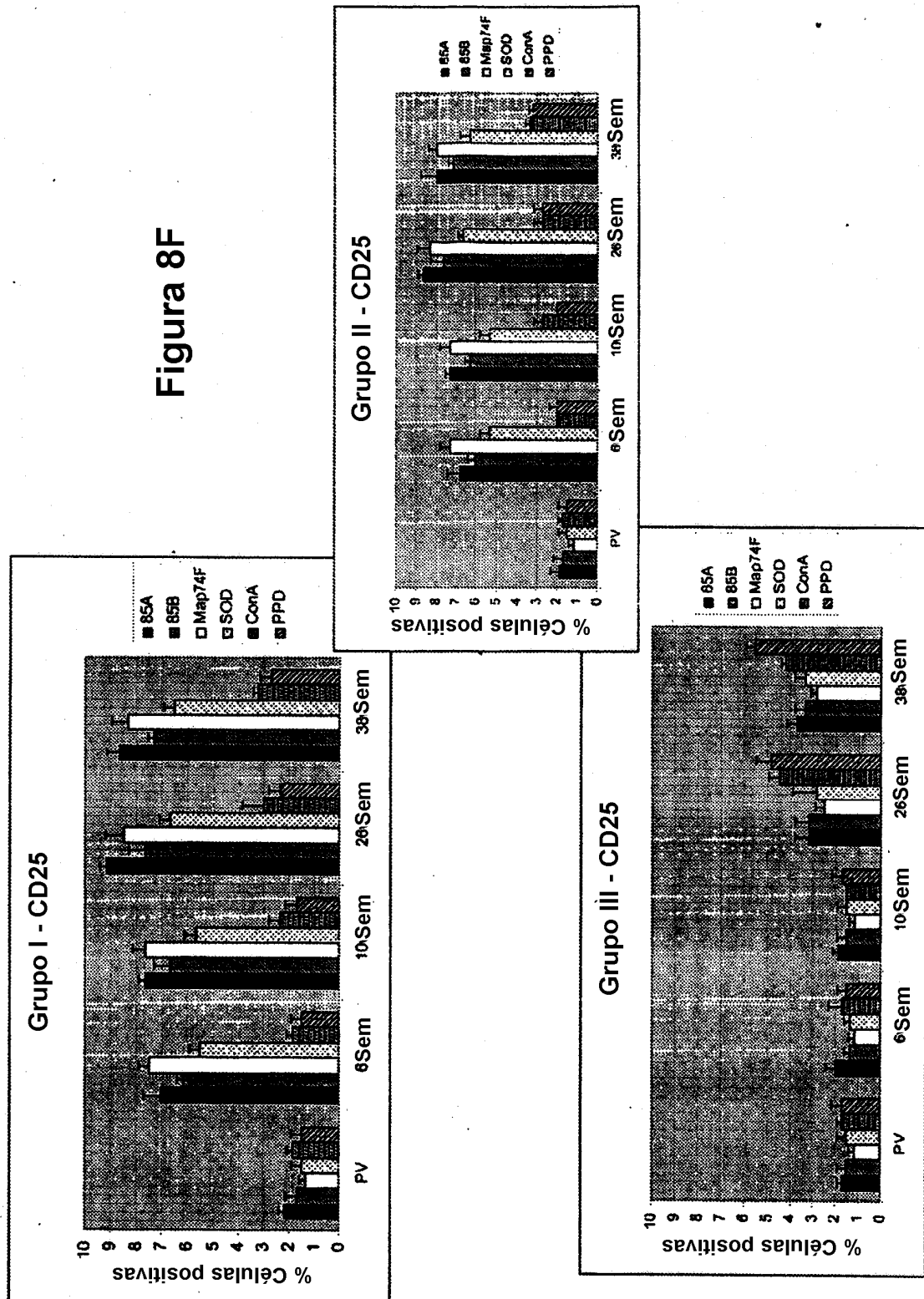
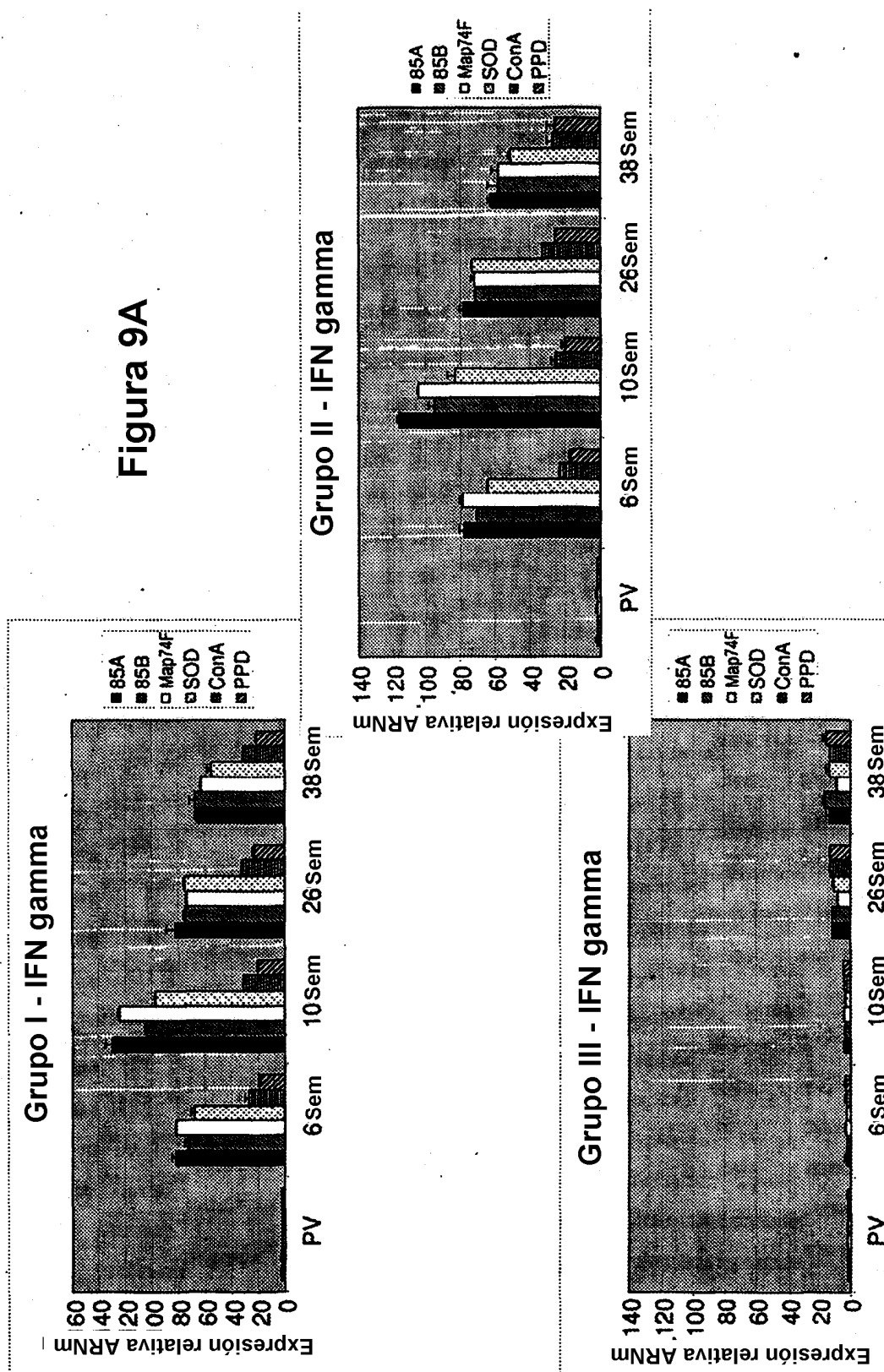


Figura 9A



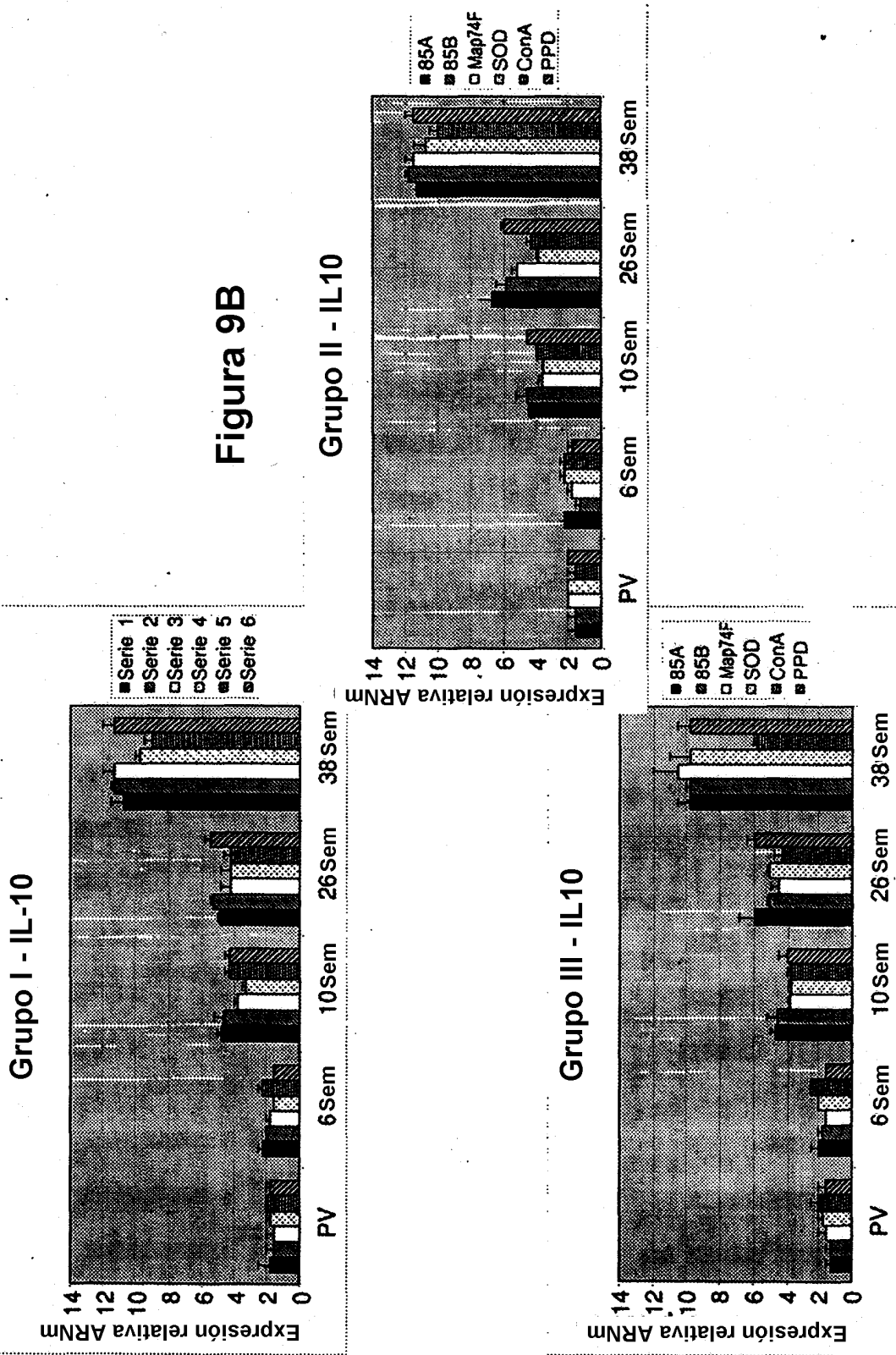


Figura 10

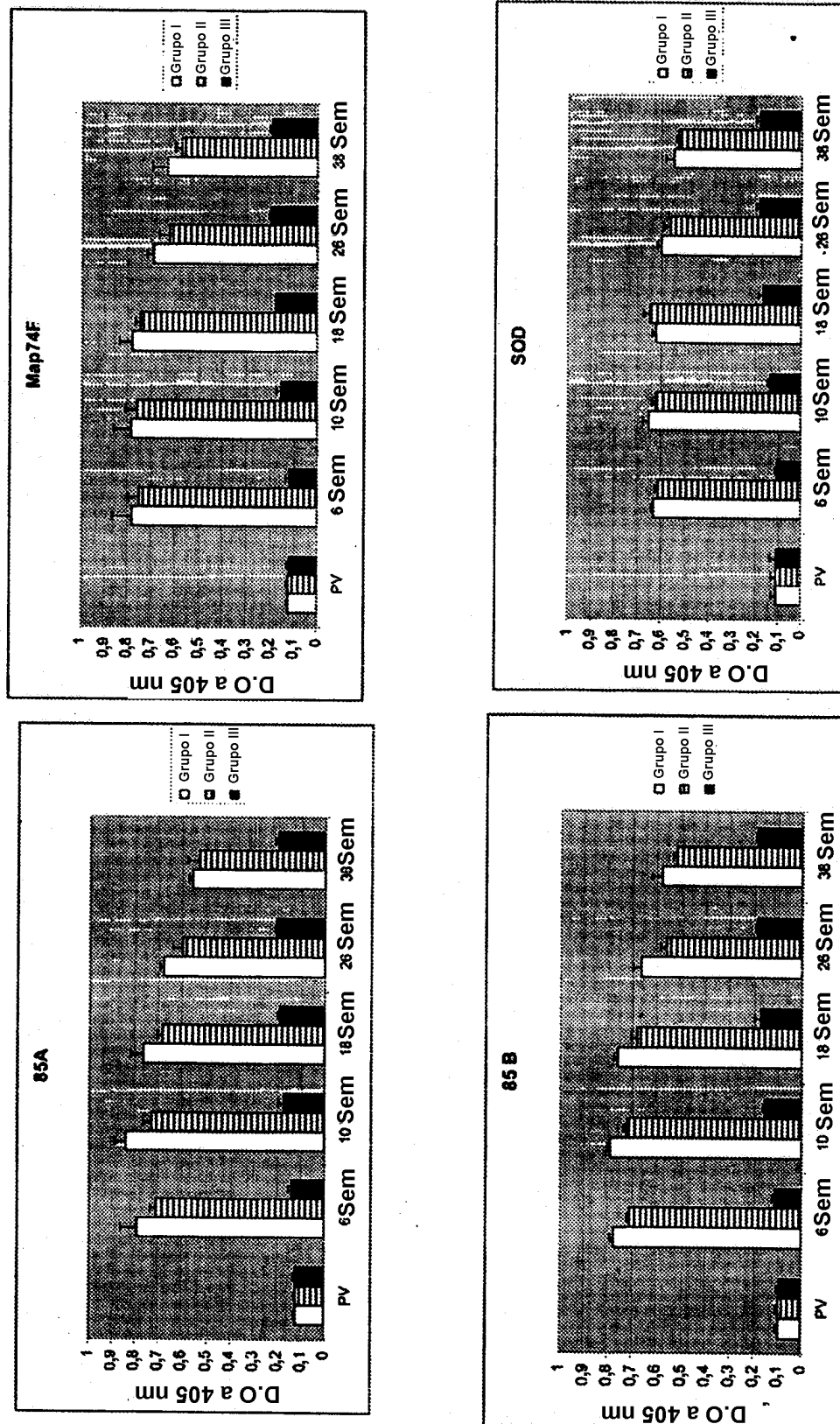


Figura 11

Grupo	Animal nº.	S	T	ML1	ML2	ML3	MRL	ICL	HL	Dd	J1	J2	J3	IP1	IP2	IM1	IM2	ID1	ID2	ICO	C	CCO	SC
I	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	9	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	115	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	118	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	2	1	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	17	-	-	-	-	128	-	>300	-	-	>300	-	-	>300	-	>300	-	>30	>30	>300	-	-	-
	18	-	-	1	>300	>300	-	>300	-	-	>300	>300	-	>300	>300	>300	5	68	>30	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-	240	-	-	-	>300	-	-	-	-	>30	-	0	-	-	-	-
	20	-	-	172	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>300	>300	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	162	193	-	-	10	-	>30	>300	1	-	-	-	>300	-	-	207	2	-	-	-
	22	-	-	76	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	>300	>300	-	-	-	159	-	-	-
	23	-	-	>300	>300	-	-	>300	-	-	>300	>300	-	>300	-	-	-	-	-	-	>300	>300	-
	24	-	-	-	-	-	-	>300	-	-	>300	>300	-	>300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	11	163	3	-	20	-	-	51	>300	>300	48	18	>300	>30	261	-	-	-	-	-

S: Bazo, T: Amígdala, ML: Nódulo linfático mesentérico, MRL: Nódulo linfático ileocecal, ICL: Nódulo linfático ileocecal, HL: Nódulo linfático hepático, Da: Duodeno ascendente, Dd: Duodeno descendente, J1, J2, J3: Yeyuno, IP1, IP2: íleo proximal, IM1, IM2: íleo medio, Id1, Id2: íleo distal, ICO: Orificio ileocecal, C: Cecum, CCO: Orificio cecocólico, SC: Colon espiral