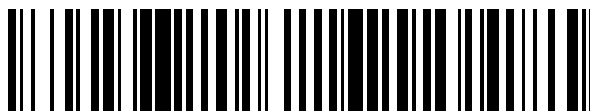


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 026**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**C07K 14/35** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2008 E 13182794 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2672268**

54 Título: **Antígenos de micobacterias**

30 Prioridad:

**10.11.2007 GB 0722105**

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

**17.03.2016**

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR  
ENVIRONMENT FOOD&RURAL AFFAIRS  
(100.0%)**

**Acting through the Animal Health, Veterinary  
Laboratories Agency, Block C, Government  
Buildings, Whittington Road  
Worcester, Worcestershire WR5 2LQ, GB**

72 Inventor/es:

**VORDERMEIER, HANS MARTIN;  
SIDDEERS, BENJAMIN;  
STOKER, NEIL GRAHAM y  
EWER, KATIE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el  
folleto original publicado por la Oficina  
Europea de Patentes**

**ES 2 564 026 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Antígenos de micobacterias

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a antígenos para uso en la detección de infecciones por micobacterias, particularmente *Mycobacterium bovis*, en mamíferos tales como ganado.

**Antecedentes**

10 *M. tuberculosis* y *M. bovis* son patógenos importantes del hombre y animales. Se cree que *M. tuberculosis* infecta hasta a un tercio de la población humana mundial, permaneciendo sin detectar durante la fase latente de la infección y reactivándose causando 10 millones de casos de tuberculosis y otras enfermedades al año, que dan como resultado 2 millones de muertes (Corbett *et al.*, 2003). *M bovis*, que tiene más de un 99,9% de identidad de secuencia con *M. tuberculosis*, es el agente causante de la tuberculosis bovina (TBB) y causa también la enfermedad en seres humanos. La TBB representa una carga económica significativa para la industria agrícola de diversos países incluyendo el Reino Unido (Krebs, 1997; DEFRA, 2006).

15 Los métodos actuales de control de estas infecciones micobacterianas se centran en la vacuna viva atenuada de *M. bovis* bacilo de Calmette-Guerin (BCG) y el diagnóstico usando una prueba cutánea intradérmica con un derivado de proteína purificado (PPD, tuberculina) recogido de cultivos micobacterianos. La prueba cutánea de PPD se basa en la respuesta inmunitaria celular que se crea en ganado por una infección micobacteriana. Las medidas de control de TBB, como se aplican por ejemplo en el Reino Unido y otros países europeos, comprenden una estrategia de "prueba y sacrificio" en que un resultado positivo en una prueba cutánea rutinaria con la prueba de la tuberculina comparativa intradérmica simple (SICTT) conduce al sacrificio obligatorio. En poblaciones humanas, se ha usado la vacuna de BCG. Sin embargo, los programas de vacunación con BCG están obstaculizados por los ampliamente diferentes índices de protección en diferentes poblaciones, con eficacias en el intervalo de 0 a 80% (Colditz *et al.*, 1994; Fine, 1995). Además, la vacunación sensibiliza a los individuos ante tuberculina, interfiriendo así con el diagnóstico.

25 Además de los ensayos cutáneos de TBB, están también bajo consideración ensayos de diagnóstico basados en sangre que miden la producción de linfocinas inducidas por antígeno tales como el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). La citocina IFN- $\gamma$  parece ser crítica en el desarrollo de inmunidad ante *M. tuberculosis*. Por ejemplo, tanto ratones con un gen de IFN- $\gamma$  desestabilizado como seres humanos con un receptor de IFN- $\gamma$  mutado son altamente susceptibles de infecciones micobacterianas. Sin embargo, están asociadas limitaciones de especificidad al uso de PPD en dichos ensayos. Estas surgen debido a la mezcla bruta de las proteínas de *M. bovis* que contiene el PPD, muchas de las cuales son reactivas cruzadas con la cepa de vacuna de BCG y especies micobacterianas ambientales tales como *M. avium* y *M. intracellulare*.

35 Estudios previos han demostrado que pueden desarrollarse reactivos de diagnóstico que distinguen entre ganado vacunado e infectado usando antígenos definidos específicos que están presentes en *M. bovis* virulento pero ausentes en BCG. El análisis genético de BCG ha revelado que se han eliminado varias regiones genómicas grandes durante la atenuación y posterior propagación prolongada en cultivo. Estas regiones se han caracterizado y se han estudiado extensamente los antígenos de una de estas regiones, RD1, en varias especies incluyendo seres humanos y ganado. Por ejemplo, se ha demostrado que pueden usarse cócteles de proteínas o péptidos compuestos por dos antígenos de la región RD1, ESAT-6 y CFP-10, para distinguir entre ganado infectado por *M. bovis* y vacunado con BCG. Se reseña que el ensayo de ESAT-6/CFP-10 tiene una sensibilidad de al menos un 77,9% en ganado con tuberculosis confirmada, y una especificidad de un 100% en ganado vacunado con BCG y no vacunado (Vordermeier *et al.* 2001).

45 Sin embargo, el nivel de sensibilidad conseguido con estos antígenos no ha alcanzado el de la tuberculina. Por lo tanto, sería deseable proporcionar otros antígenos para conseguir esta sensibilidad deseada. La presente invención se enfrenta por consiguiente al problema de proporcionar reactivos de diagnóstico discriminatorios adicionales para la detección de infecciones micobacterianas.

50 Camus *et al.* (*Microbiology* (2002) 148, 2967-2973) y el nº de acceso a NCBI asociado NP\_218132 es una divulgación de la secuencia genómica de H37v de *M. tuberculosis*, incluyendo el gen que codifica Rv3615c. No se sugiere el uso del polipéptido Rv3615c ni porciones del mismo en un reactivo para uso en la detección de infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un animal.

Garnier *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100, 7877-7882) y el nº de acceso a NCBI asociado NP\_857284 es una divulgación de la secuencia genómica de *M. bovis*, incluyendo el gen que codifica Mb3645c. No se sugiere el uso del polipéptido Mb3645c ni porciones del mismo en un reactivo para uso en la detección de infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un animal.

55 El documento US2003/0129601 da a conocer una comparación de las secuencias genómicas de *M. tuberculosis* y *M. leprae* y reseña un total de 644 secuencias proteicas comunes. Se propone que estas secuencias pueden tener

una variedad de usos incluyendo potencial como dianas de fármaco, antígenos de diagnóstico o composiciones de vacuna de subunidades. Los inventores de la presente solicitud han encontrado que una de las secuencias tiene una eficacia particular en el diagnóstico de infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis*.

### Sumario de la invención

5 Según la presente invención, se proporciona un reactivo de diagnóstico de ensayo CMI para uso en la detección de infección por *M. tuberculosis* en un mamífero, que comprende uno o más péptidos consistentes cada uno en una de las SEQ ID N°: 2-13, o una variante funcional que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con y es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria similar ante las SEQ ID N°: 2-13. El animal puede ser un mamífero y preferiblemente es un ser humano o una especie bovina, por ejemplo una vaca doméstica. Como alternativa, el mamífero puede ser un tejón. En una alternativa adicional de la descripción, el animal puede ser una especie de pez o pájaro. La detección puede tener lugar mediante análisis de una muestra obtenida del animal, tal como una muestra de sangre, saliva, fecal o de tejido.

15 La invención también proporciona un kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico de ensayo CMI como se define anteriormente, en el que el reactivo de diagnóstico de ensayo CMI es capaz de detectar una infección por *M. tuberculosis* en un mamífero y es capaz de diferencia entre un mamífero infectado por *M. tuberculosis* y un mamífero vacunado frente a infección por *M. tuberculosis*.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una combinación continua de dos o más péptidos consistiendo cada uno en las SEQ ID NOs:2-13.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende una de SEQ ID NO:2-13, o que codifica un péptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con y es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria similar a SEQ ID NO:2-13.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector adecuado para expresar un péptido como se define anteriormente que comprende el ácido nucleico como se define anteriormente.

La invención también proporciona una célula transformada con el vector como se define anteriormente.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para diagnosticar, en un organismo hospedante, una infección de, o exposición a, *M. tuberculosis*, que comprende las etapas de: i) poner en contacto una población de células del organismo hospedante con un reactivo de diagnóstico de ensayo de inmunidad mediada por célula (CMI) como se define anteriormente y/o un reactivo de diagnóstico que comprende SEQ ID NO:1 y/o un polipéptido aislado como se define anteriormente, y ii) determinar si las células de dicha población celular reconoce el reactivo de diagnóstico.

La proteína hipotética de *M. bovis* Mb3645c tiene la secuencia aminoacídica:

```
MTENLTVQPE RLGVLASHHD NAAVDASSGV EAAAGLGESV AITHGPYCSQ
FNDTLNVYLT AHNALGSSLH TAGVDLAKSL RIAAKIYSEA DEAWRKAIDG
LFT (SEQ ID NO: 1).
```

35 Mb3645c es el equivalente *M. bovis* de *M. tuberculosis* Rv3615c, que tiene una secuencia aminoacídica idéntica. Las referencias a Mb3645c en la presente memoria se deben tomar, por lo tanto, como que incluyen una referencia a Rv3615c, a menos que esté implicado o se especifique otra cosa.

La proteína hipotética de *M. bovis* Mb3645c tiene la secuencia aminoacídica: MTENLTVQPE RLGVLASHHD NAAVDASSGV EAAAGLGESV AITHGPYCSQ FNDTLNVYLT AHNALGSSLH TAGVDLAKSL RIAAKIYSEA DEAWRKAIDG LFT (SEQ ID NO: 1).

40 La Mb3645c es el equivalente en *M. bovis* de Rv3615c de *M. tuberculosis*, que tiene una secuencia aminoacídica idéntica. Las referencias en la presente memoria a Mb3645c han de tomarse, por lo tanto, como inclusivas de la referencia a Rv3615c, a menos que se implique o especifique otra cosa.

45 “Detección de la infección”, como se menciona anteriormente, indica que puede detectarse un animal que está infectado por *M. bovis* o *M. tuberculosis*, por ejemplo, puede distinguirse de un animal que se ha vacunado contra la infección por una o ambas de estas bacterias, por ejemplo mediante el uso de la vacuna de BCG. La capacidad de distinguir entre estos estados usando un péptido que tiene un epítipo de Mb3645c es sorprendente, en vista de la presencia de la secuencia de ácido nucleico que codifica esta proteína en todos de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y vacuna viva atenuada de BCG.

50 Como se describe a continuación, se ha encontrado sorprendentemente que la proteína hipotética conocida Mb3645c comprende un epítipo que puede usarse con fines de diagnóstico, por ejemplo en el reconocimiento específico de un mamífero infectado por *M. bovis* o *M. tuberculosis*. Esto es debido al descubrimiento inesperado por

los inventores de que, como se menciona anteriormente, aunque el gen que codifica Mb3645c está presente en todos de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y vacuna viva atenuada de BCG, la exposición de un animal o una muestra de un animal a un epítipo de Mb3645c causa solo una respuesta inmunitaria detectable en un animal infectado por *M. bovis* o *M. tuberculosis* (o en una muestra de dicho animal). Dicha respuesta no es detectable en un animal no infectado (o una muestra de uno), incluso cuando a ese animal se le haya administrado la vacuna de BCG.

Basándose en una búsqueda BLAST de proteína de NCBI, la proteína conocida más cercana a Mb3645c (distinta de Rv3615c) es la proteína hipotética MAP3219c de *M. avium*, que comparte un 75% de identidad de secuencia con Mb3645c. La presente invención excluye cualquier epítipo de MAP3219c que no se encuentre también en Mb3645c.

Como se usa en la presente memoria, el término "epítipo" hace referencia a los aminoácidos (típicamente un grupo de aproximadamente 5 o más aminoácidos) en una secuencia peptídica que son esenciales para la generación de una respuesta inmunitaria y que, por lo tanto, pueden usarse en una prueba de diagnóstico. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpo, pero puede ser también una respuesta inmunitaria no mediada por anticuerpo, por ejemplo una respuesta inmunitaria que puede detectarse mediante un ensayo de inmunidad mediada por célula (CMI). Por lo tanto, el epítipo puede ser uno reconocible por un linfocito T, por ejemplo, mediante la unión de un receptor de linfocito T al epítipo.

El epítipo puede comprender aminoácidos consecutivos, o los aminoácidos que forman el epítipo pueden estar separados entre sí. En el último caso, la naturaleza de los aminoácidos entre los aminoácidos que forman el epítipo puede no ser crucial para la actividad y puede ser variada, a condición de que la estructura terciaria del epítipo se mantenga, por ejemplo, de modo que pueda aparecer una respuesta inmunitaria tal como una respuesta inmunitaria mediada por célula en respuesta a la presencia del epítipo. La determinación de los aminoácidos que forman un epítipo o parte de un epítipo puede emprenderse usando métodos rutinarios. Por ejemplo, puede hacerse una de una serie de mutaciones pequeñas, tales como mutaciones puntuales, a un péptido y ensayarse el péptido mutado para determinar si se ha retenido la actividad inmunogénica o de diagnóstico. Cuando se ha retenido, entonces la variante retiene el epítipo. Si la actividad se ha perdido, entonces la mutación ha desestabilizado el epítipo y por ello debe revocarse.

Adecuadamente, el péptido de diagnóstico tiene menos de 103 aminoácidos, por ejemplo hasta 100 aminoácidos, por ejemplo hasta 75 aminoácidos, por ejemplo hasta 50 aminoácidos, por ejemplo hasta 25 aminoácidos, por ejemplo hasta 20 aminoácidos. Puede comprender una forma truncada de Mb3645c.

El péptido de reactivo de diagnóstico puede comprender un epítipo de (es decir, contenido en) uno o más de los grupos de péptidos que consisten en las SEQ ID NO 2-13, que se definen a continuación:

MTENLTVQPE RLGVLASHHD (SEQ ID NO: 2);

PERLGLVLASH HDNAAVDASS (SEQ ID NO: 3);

SHHDNAAVDA SSGVEAAAGL (SEQ ID NO: 4);

DASSGVEAAA GLGESVAITH (SEQ ID NO: 5);

AAGLGESVAI THGPYCSQFN (SEQ ID NO: 6);

AITHGPYCSQ FNDTLNVYLT (SEQ ID NO: 7);

SQFNDTLNVY LTAHNALGSS (SEQ ID NO: 8);

VYLTAHNALG SSLHTAGVDL (SEQ ID NO: 9);

LGSSLHTAGV DLAKSLRIAA (SEQ ID NO: 10);

GVDLAKSLRI AAKIYSEADE (SEQ ID NO: 11);

RIAAKIYSEA DEAWRKAIDG (SEQ ID NO: 12); y

AKIYSEADEA WRKAIDGLFT (SEQ ID NO: 13).

Los péptidos de SEQ ID NO: 2-13 son péptidos de 20 unidades superpuestos que abarcan la secuencia completa de Mb3645c de SEQ ID NO: 1. Como se demuestra a continuación, estos péptidos comprenden epítopos que pueden usarse con fines de diagnóstico, por ejemplo, en el reconocimiento específico de un mamífero infectado por *M. bovis* o *M. tuberculosis*.

En una realización de la divulgación, el reactivo de diagnóstico comprende uno o más péptidos seleccionados cada uno del grupo de péptidos consistente en las SEQ ID NO: 2-13. El reactivo de diagnóstico puede comprender al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más péptidos con un epítipo de uno o más péptidos seleccionado cada uno del

## ES 2 564 026 T3

grupo de péptidos consistente en las SEQ ID NO: 2-13. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico puede comprender al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más péptidos definido cada uno por cualquiera de las SEQ ID NO: 2-13.

En otro ejemplo, el reactivo de diagnóstico comprende un péptido que tiene un epítipo del péptido de SEQ ID NO: 12 y/o 13. Este reactivo de diagnóstico puede comprender, por ejemplo, el péptido de SEQ ID NO: 12 y/o 13.

- 5 En un ejemplo adicional, el reactivo de diagnóstico comprende un péptido que tiene uno o más epítopos de uno o más del grupo de péptidos consistente en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 o el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 y 13. En otro ejemplo, el reactivo de diagnóstico comprende un péptido que tiene uno o más epítopos de uno o más del grupo de péptidos consistente en las SEQ ID NO: 2 y 9-13.

- 10 Los péptidos de SEQ ID NO: 1 y 8, 9, 10, 11, 12 y 13 (especialmente 10, 11, 12 y 13) contienen epítopos dominantes reconocidos por células T bovinas y son por lo tanto particularmente útiles en el reactivo de diagnóstico de la invención.

El reactivo de diagnóstico puede comprender, por ejemplo, una combinación de epítopos derivados de uno cualquiera o más de los grupos de péptidos expuestos a continuación:

| SEQ ID NOs    | SEQ ID NOs       | SEQ ID NOs       | SEQ ID NOs       | SEQ ID NOs    |
|---------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| 2, 9          | 2, 10            | 2, 11            | 2, 12            | 2, 13         |
| 2, 9, 10      | 2, 9, 11         | 2, 9, 12         | 2, 9, 13         | 2, 10, 11     |
| 2, 10, 12     | 2, 10, 13        | 2, 11, 12        | 2, 11, 13        | 2, 12, 13     |
| 2, 9, 10, 11  | 2, 9, 10, 12     | 2, 9, 10, 13     | 2, 10, 11, 12    | 2, 10, 11, 13 |
| 2, 11, 12, 13 | 2, 9, 10, 11, 12 | 2, 9, 10, 11, 13 | 2, 9, 10, 12, 13 | 9, 10         |
| 9, 11         | 9, 12            | 9, 13            | 9, 10, 11        | 9, 10, 12     |
| 9, 10, 13     | 9, 10, 11, 12    | 9, 10, 11, 13    | 9, 10, 12, 13    | 10, 11        |
| 10, 12        | 10, 13           | 10, 11, 12       | 10, 11, 13       | 10, 12, 13    |
| 11, 12        | 11, 13           | 11, 12, 13       | 12, 13           | 10, 12, 13    |
| 8, 9          | 8, 10            | 8, 12            | 8, 13            | 8, 9, 10      |
| 8, 10, 12     | 8, 12, 13        | 8, 9, 12         | 8, 9, 13         | 8, 10, 12     |
| 8, 10, 13     | 7, 8, 10, 12     | 8, 10, 12, 13    | 9, 10            | 9, 12         |
| 9, 13         | 9, 10, 12        | 9, 12, 13        |                  |               |

- 15 El reactivo de diagnóstico puede comprender por tanto cualquier combinación de péptidos seleccionados de los enumerados anteriormente, o cualquier combinación de las combinaciones enumeradas.

- 20 Como alternativa, el reactivo de diagnóstico puede comprender péptidos que tienen todos los epítopos del grupo de péptidos consistente en, por ejemplo, las SEQ ID NO: 12-13, o consistente en las SEQ ID NO: 11-13, o consistente en las SEQ ID NO: 10-13, o consistente en las SEQ ID NO: 9-13, o consistente en las SEQ ID NO: 8-13, o consistente en las SEQ ID NO: 7-13, o consistente en las SEQ ID NO: 2-13. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico puede comprender todos los péptidos del grupo de péptidos consistente, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 12-13, o consistente en las SEQ ID NO: 11-13, o consistente en las SEQ ID NO: 10-13, o consistente en las SEQ ID NO: 9-13, o consistente en las SEQ ID NO: 8-13, o consistente en las SEQ ID NO: 7-13, o consistente en las SEQ ID NO: 2-13.

- 25 El reactivo de diagnóstico descrito puede comprender también un péptido de fusión en que se han unido los péptidos derivados de SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que tiene al menos 76% de identidad con ella.

- 30 Los péptidos reactivos de diagnóstico basados en Mb3645c como se definen en la presente memoria pueden usarse por si solos o con uno o más péptidos, por ejemplo para conseguir una mayor sensibilidad y/o especificidad de una prueba de diagnóstico. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico puede comprender además uno o más polipéptidos o péptidos derivados de los polipéptidos ESAT-6 (SEQ ID NO: 14) y/o CFP-10 (SEQ ID NO: 15), en que ESAT-6 tiene la secuencia aminoacídica:

**MTEQQWNFAG IEAAASAIQG NVTSIHSLLD EGKQSLTKLA AAWGGSGSEA  
YQGVQQKWDA TATELNALQ NLARTISEAG QAMASTEAGNV TGMFA (SEQ ID  
NO: 14);**

y en que CFP-10 tiene la secuencia aminoacídica:

**MAEMKTAAT LAQEAGNER ISGDLKTQID QVESTAGSLQ GQWRGAAGTA  
AQAAVVRFQE AANKQKQELD EISTNIRQAG VQYSRADEEQ QQALSSQMGF  
(SEQ ID NO: 15).**

Por ejemplo, los péptidos derivados de ESAT-6 pueden ser péptidos de SEQ ID NO: 16-21, que son:

**MTEQQWNFAG IEAAAS (SEQ ID NO: 16);  
AGIEAAASAI QGNVTS (SEQ ID NO: 17);  
AIQGNVTSIH SLLDEG (SEQ ID NO: 18);  
KWDATATELN NALQNL (SEQ ID NO: 19); y  
GQAMASTEGR VTGMFA (SEQ ID NO: 20).**

5 Los péptidos derivados de CFP-10 pueden ser péptidos de SEQ ID NO 21-25, que son:

**MAEMKTAAT LAQEAGNF (SEQ ID NO: 21);  
QEAGNERIS GDLKTQ (SEQ ID NO: 22);  
VVRFQEAANK QKQELDEI (SEQ ID NO: 23);  
NIRQAGVQYS RADEEQQQ (SEQ ID NO: 24); y  
RADEEQQQAL SSQMGF (SEQ ID NO: 25).**

10 Los péptidos ESAT-6 y CFP-10 de SEQ ID NO 16-25 se han dado a conocer en Vordermeier *et al.* (2001) y proporcionan un diagnóstico útil para la detección de animales infectados por *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*. Usados en combinación con péptidos derivados de Mb3645c, como se definen aquí, se obtiene un reactivo de diagnóstico más sensible.

El reactivo de diagnóstico según la presente invención puede ser por consiguiente específico de *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*.

El reactivo de diagnóstico puede usarse en la detección de un mamífero infectado por *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*, por ejemplo, una vaca infectada por *M. bovis*.

15 Se proporciona también según la presente invención un kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico como se define en la presente memoria. El reactivo de diagnóstico es capaz de detectar un mamífero infectado por *M. tuberculosis*. El reactivo de diagnóstico es capaz de diferenciar entre un mamífero infectado por *M. tuberculosis* y un mamífero vacunado contra *M. tuberculosis* (por ejemplo, un mamífero vacunado con una vacuna viva atenuada de BCG).

20 El kit de diagnóstico puede ser de uso particular en la detección de un mamífero infectado por *M. tuberculosis* que no sea susceptible de diagnóstico por el ensayo de ESAT-6/CFP-10 como se describe en Vordermeier *et al.* (2001).

El kit de diagnóstico puede comprender uno o más péptidos seleccionados cada uno de los que tienen las secuencias aminoacídicas de SEQ ID NO 2-13 y opcionalmente comprender adicionalmente uno o más péptidos seleccionados cada uno de los que tienen las secuencias aminoacídicas de SEQ ID NO 16-25.

25 El kit de diagnóstico es adecuado para uso en un ensayo de inmunidad mediada por células (CMI). Por ejemplo, el ensayo de CMI puede usar la detección de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) como sistema de lectura en formato EIA (Wood y Jones, 2001) o ELISPOT (Vordermeier *et al.*, 2002). Como es bien conocido por el experto en la materia, dichos ensayos no dependen de la detección de una respuesta de anticuerpo sino que, en lugar de ello, se basan en el reconocimiento de un epítipo por una célula T, por ejemplo a través de la unión de un receptor de célula T.

30 El término "propiedades inmunogénicas y antigénicas específicas de *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*" indica que el péptido según este aspecto de la divulgación es detectable mediante un ensayo inmunogénico, preferiblemente mediante un ensayo de inmunidad mediada por células (CMI).

La invención también proporciona un péptido aislado que comprende una combinación contigua de dos o más secuencias SEQ ID NO: 2-13.

35 La presente divulgación engloba también variantes del péptido reactivo de diagnóstico y el péptido aislado. Como se usa en la presente memoria, una "variante" significa un péptido en que la secuencia aminoacídica difiere de la

5 secuencia básica de la que deriva en que uno o más aminoácidos en la secuencia están sustituidos por otros aminoácidos. La variante es una variante funcional porque se mantienen las características funcionales del péptido del que deriva la variante. Por ejemplo, se desencadena una respuesta inmunitaria similar por la exposición de un animal, o una muestra de un animal, al polipéptido variante. En particular, cualquier sustitución, adición o delección aminoacídica no debe alterar o alterar significativamente la estructura terciaria del uno o más epítomos contenidos en el péptido del que deriva la variante. El especialista en la materia es capaz de determinar fácilmente variantes funcionales apropiadas y de determinar la estructura terciaria de un epítomo y cualquier alteración del mismo, sin la aplicación de habilidades inventivas.

10 Las sustituciones aminoacídicas pueden considerarse como "conservativas" cuando se reemplaza un aminoácido por un aminoácido diferente con propiedades ampliamente similares. Las sustituciones no conservativas son cuando los aminoácidos se reemplazan por aminoácidos de tipo diferente. Se entiende por "sustitución conservativa" la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, en que las clases se definen como sigue:

| Clase             | Ejemplos de aminoácidos                |
|-------------------|--|
| No polar:         | Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp |
| Polar no cargada: | Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln      |
| Ácida             | Asp, Glu                               |
| Básica            | Lys, Arg, His                          |

15 Como es bien conocido por los especialistas en la materia, alterar la estructura primaria de un péptido con una sustitución conservativa puede no alterar significativamente la actividad de ese péptido debido a que la cadena lateral del aminoácido que se inserta en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces y contactos similares a la cadena lateral del aminoácido que se ha sustituido. Esto es así incluso cuando la sustitución es en una región que es crítica para la determinación de la conformación del péptido.

20 Como se menciona anteriormente, las sustituciones no conservativas son posibles a condición de que estas no desestabilicen la estructura terciaria de un epítomo del péptido, por ejemplo, que no interrumpen la inmunogenicidad (por ejemplo, la antigenicidad) del péptido.

Hablando en general, serán posibles pocas sustituciones no conservativas sin alterar la actividad biológica del polipéptido. Adecuadamente, las variantes pueden ser al menos un 90% idénticas a la secuencia básica.

25 Se describe también un ácido nucleico aislado que codifica un péptido reactivo de diagnóstico, un péptido aislado o variantes del mismo como se definen en la presente memoria, pero excluyendo los polipéptidos y péptidos ESAT-6 y CFP-10 conocidos definidos por las SEQ ID NO. 14-25. Usando el código genético estándar, puede concebirse y fabricarse fácilmente por un especialista en la materia un ácido nucleico que codifica un epítomo o péptido. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN y, cuando es una molécula de ADN, puede comprender ADNc o ADN genómico. La divulgación engloba fragmentos y variantes del ácido nucleico aislado, en que cada uno de dichos fragmentos o variantes codifica un péptido con propiedades antigénicas como se definen en la presente memoria. Los fragmentos pueden comprender adecuadamente al menos 15, por ejemplo al menos 30 o al menos 60 bases consecutivas de la secuencia básica.

35 El término "variante" con relación a una secuencia de ácido nucleico significa cualquier sustitución, variación, modificación o reemplazo por delección o adición de uno o más ácidos nucleicos, desde o hasta una secuencia polinucleotídica que proporcione la secuencia peptídica resultante codificada por el polinucleótido, que exhiba al menos las mismas propiedades que el péptido codificado por la secuencia básica. En este contexto, las propiedades para conservar son la capacidad de formar uno o más epítomos de tal modo que se genere una respuesta inmunitaria que sea equivalente a la del péptido reactivo de diagnóstico o péptido aislado como se define en la presente memoria. Por lo tanto, el término incluye variantes alélicas e incluye también un polinucleótido que hibrida sustancialmente con la secuencia polinucleotídica de la presente divulgación. Dicha hibridación puede aparecer a o entre condiciones de bajo y alto rigor. En términos generales, las condiciones de bajo rigor pueden definirse como una hibridación en que la etapa de lavado tiene lugar en una disolución tampón de NaCl 0,330-0,825M a una temperatura de aproximadamente 40-48°C por debajo de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) calculada o real de la secuencia de sonda (por ejemplo, de aproximadamente la temperatura ambiente del laboratorio a aproximadamente 55°C), mientras que las condiciones de alto rigor implican un lavado con disolución tampón de NaCl 0,0165-0,0330 M a una temperatura de aproximadamente 5-10°C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada o real de la sonda (por ejemplo, aproximadamente a 65°C). La disolución tampón puede ser, por ejemplo, tampón SSC (NaCl 0,15M y citrato trisódico 0,015 M), teniendo lugar el lavado de bajo rigor con tampón 3 x SSC y teniendo lugar el lavado de alto rigor con tampón 0,1 x SSC. Las etapas implicadas en la hibridación de las secuencias de ácido nucleico se han descrito, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989; "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).

Típicamente, las variantes tienen un 60% o más de nucleótidos en común con la secuencia de ácido nucleico de la presente divulgación, más típicamente un 65%, 70%, 80%, 85%, o incluso un 90%, 95%, 98% o 99% o más identidad de secuencia.

5 Pueden aislarse péptidos y ácidos nucleicos de la invención de cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Sin embargo, pueden prepararse sintéticamente usando sintetizadores peptídicos convencionales. Como alternativa, pueden producirse usando tecnología de ADN recombinante o aislarse a partir de fuentes naturales seguido de cualquier modificación química, si se requiere. En estos casos, se incorpora un ácido nucleico que codifica el péptido a un vector de expresión adecuado, que se usa entonces para transformar una célula hospedadora adecuada, tal como una célula procariótica tal como *E. coli*. Las células hospedadoras transformadas se cultivan y el péptido se aísla de las mismas. Los vectores, células y métodos de este tipo forman aspectos adicionales de la presente divulgación.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método *in vitro* para diagnosticar en un hospedador una infección por, o exposición a, *M. tuberculosis* que comprende las etapas de:

- i) poner en contacto una población de células del hospedador con un reactivo de diagnóstico de ensayo CMI como en la presente memoria y/o un reactivo de diagnóstico que comprende la SEQ ID NO: 1; y
- 15 ii) determinar si las células de dicha población celular reconocen el reactivo de diagnóstico. El reactivo de diagnóstico basado en Mb3645c puede ponerse en contacto conjunta o separadamente con el reactivo de diagnóstico basado en ESAT-6/CFP-10.

La población de células puede incluir células T. El reconocimiento del reactivo de diagnóstico por dichas células puede hacerse, por ejemplo, mediante la unión de un receptor de células T al reactivo de diagnóstico, por ejemplo, la unión del receptor a un epítipo incluido en el reactivo de diagnóstico.

El método para el diagnóstico comprende un ensayo de inmunidad mediada por célula (CMI), por ejemplo, un ensayo de CMI que detecta IFN- $\gamma$  como se describe en la presente memoria.

El término "polipéptido" como se usa en la presente memoria incluye péptidos de cadena larga, tales como proteínas y fragmentos epitópicos de las mismas. El término "péptido" hace referencia a proteínas más pequeñas, por ejemplo de hasta 100 aminoácidos de longitud.

La identidad de secuencia entre secuencias nucleotídicas y aminoácidas puede determinarse mediante comparación de un alineamiento de las secuencias. Cuando está ocupada una posición equivalente en las secuencias comparadas por el mismo aminoácido o base, las moléculas son idénticas en esa posición. Puntuar un alineamiento como porcentaje de identidad es una función del número de aminoácidos o bases idénticos en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Cuando se comparan secuencias, los alineamientos óptimos pueden requerir introducir huecos en una o más de las secuencias para tener en consideración posibles inserciones y deleciones en las secuencias. Los métodos de comparación de secuencia pueden emplear penalizaciones de hueco de modo que, para el mismo número de moléculas idénticas en las secuencias que se están comparando, un alineamiento de secuencias con los menores huecos posibles, reflejando la alta relación entre las dos secuencias comparadas, consiga una mayor puntuación que aquel con muchos huecos. El cálculo de la identidad porcentual máxima implica la producción de un alineamiento óptimo teniendo en consideración las penalizaciones de hueco.

Los programas informáticos adecuados para llevar a cabo comparaciones de secuencia están ampliamente disponibles en el sector comercial y público. Los ejemplos incluyen el programa Gap (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) y el programa FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410). Gap y FASTA están disponibles como parte del paquete CGC Accelrys versión 1.11 (Accelrys, Cambridge, RU), anteriormente conocido como el paquete GCG Wisconsin. Puede accederse como alternativa al programa FASTA públicamente en el European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/fasta>) y la University of Virginia ([http://fasta.biotech.virginia.edu/fasta\\_www/cgi](http://fasta.biotech.virginia.edu/fasta_www/cgi)). FASTA puede usarse para buscar en una base de datos de secuencias una secuencia dada o para comparar dos secuencias dadas (véase [http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www/cgi/search\\_frm2.cgi](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www/cgi/search_frm2.cgi)). Típicamente, deberían usarse los parámetros por defecto fijados por los programas informáticos al comparar secuencias. Los parámetros por defecto pueden cambiarse dependiendo del tipo y la longitud de las secuencias que se están comparando. Una comparación de secuencia que usa el programa FASTA puede usar los parámetros por defecto Ktup = 2, matriz de puntuación = Blosum50, gap = -10 y ext = -2.

### Breve descripción de las figuras

Se describirán ahora ejemplos particulares no limitantes de la presente invención con referencia a las siguientes figuras, en las que:

la Figura 1 es un histograma que muestra las frecuencias de respuesta de los candidatos a antígenos cribados;



la Figura 2 es una gráfica que muestra la respuesta ante Mb3645c en muestras de ganado no infectado, ganado infectado, vacunas de BCG y negativas de ESAT/CFP;

la Figura 3 comprende gráficas que muestran la correlación entre la abundancia y la antigenicidad de ARNm en *M. tuberculosis* (gráfico izquierdo) y *M. bovis* (gráfico derecho);

- 5 la Figura 4 muestra las respuestas de péptidos según la invención, determinadas usando un ensayo de ELISPOT de IFN- $\gamma$  con PBMC aisladas de ganado infectado por *M. bovis* (la secuencia 02 corresponde a la SEQ ID NO:2, la secuencia 03 a la SEQ ID NO:3 y demás); y

10 la Figura 5 muestra un análisis de FACS efectuado después de la estimulación de PBMC aislados de ganado infectado por *M. bovis* con péptidos según la divulgación (la secuencia 02 corresponde a la SEQ ID NO:2, la secuencia 03 a la SEQ ID NO:3 y demás, como anteriormente).

## Ejemplos

### Introducción

15 La identificación de nuevos candidatos a vacuna de subunidades o marcadores de diagnóstico se ha potenciado en gran medida con el desarrollo de diversos enfoques postgenómicos (Cockle *et al.*, 2002; Ewer *et al.*, 2006). Estos implicaban en gran parte análisis basados en secuencia del genoma del patógeno. Aquí, los inventores tomaron un enfoque alternativo y se centraron en la actividad transcripcional de los genes para identificar antígenos potenciales. Se desarrolló un método de análisis de micromatrices que cuantifica la expresión génica a escala global. Como se ve en la Tabla 1, se encontró que muchos de los antígenos micobacterianos principales tales como ESAT6, CFP10, Ag85B etc. están altamente expresados de modo consistente. Además de esto, se ha mostrado recientemente que el número de linfocitos T CD4+ sensibles a antígenos micobacterianos conocidos está estrechamente relacionado con el nivel de transcripción de su gen (Rogerson *et al.*, 2006).

20 Con esto como base, los inventores usaron un análisis cuantitativo de micromatrices para identificar genes que están altamente expresados de modo consistente tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis* en una variedad de condiciones de crecimiento. Se seleccionaron entonces 14 de estos genes y se cribó su potencial como inmunógenos y marcadores de diagnóstico de infección usando ganado infectado por *M. bovis*. No se encontraron evidencias que apoyaran una conexión entre la abundancia y la antigenicidad del ARNm. Sin embargo, sorprendentemente los inventores sí identificaron un antígeno que discriminaba entre ganado infectado y vacunado. Adicionalmente, el mismo antígeno mostró una respuesta marcada en ganado infectado que no responde a los antígenos micobacterianos clásicos ESAT6 y CFP10, lo que permitirá al antígeno aumentar sensibilidad de las pruebas de diagnóstico diferencial descritas anteriormente basadas en ESAT6 y CFP10 (Vordemeier *et al.* 2001).

### Métodos

#### *Selección de candidatos a antígenos*

35 Se usaron 6 conjuntos de datos de micromatrices en este estudio. Se efectuaron todas las extracciones de ARN e hibridaciones de micromatrices como se detalla en Bacon *et al.* (2004). Se usaron el lenguaje informático Perl y el entorno estadístico R para efectuar todos los análisis de datos y estadísticos adicionales.

40 Para cada conjunto de datos, se calcularon las abundancias de ARNm en el genoma como sigue. Inicialmente, se retiraron todos los puntos de control en la matriz del conjunto de datos, incluyendo todos los que representan ARN ribosómico. Se restó de cada punto el ruido de fondo local, determinado por software de cuantificación de imagen. No se excluyeron de este estudio valores de datos, ya que se razonó que las señales débiles (después de la resta del fondo) reflejaban transcritos de baja abundancia.

Se normalizó para cada punto  $i$  en la matriz la intensidad de fluorescencia en el canal de ARN mediante una simple división entre la intensidad de fluorescencia del canal de ADN $_i$ :

$$\text{Intensidad normalizada (R}_i\text{)} = \text{ARN}_i / \text{ADN}_i$$

45 Se confirmó la correlación entre las repeticiones de hibridación dentro de cada conjunto de datos para asegurar que no había valores atípicos extremos. Se promediaron entonces las repeticiones técnicas y biológicas para proporcionar un valor de intensidad normalizado único para cada gen en la matriz.

Para dar cuenta del sesgo de la longitud de sonda observado, se normalizó la intensidad de señal a la longitud de sonda usando un modelo de regresión lineal de logaritmo de intensidad por longitud de sonda:

$$\text{Intensidad normalizada por sonda (log}^e \text{Rn}_i\text{)} = \text{log}^e \text{R}_i - (\text{corte} + \text{pendiente} \cdot \text{longitud de sonda})$$

50 Se volvieron a convertir los valores de  $\text{Rn}_i$  corregidos a la escala original y por facilidad de comprensión se ilustran como valor proporcional, expresado en partes por millón (ppm), basado en la suposición de que la suma de todos los valores de intensidad representa la suma de la población de transcritos (ARNm) en la muestra:

$$\text{ppm} = (\text{Rn} / \sum_{i\text{-th}} \text{Rn}) \cdot 10^6$$

Se seleccionaron entonces los candidatos a antígenos basándose en su expresión consistentemente alta en los seis conjuntos de datos que proceden de una variedad de condiciones experimentales: *M. tuberculosis* en quimiostatos aeróbicos bajos en oxígeno, *M. tuberculosis* en cultivo en lotes, *M. tuberculosis* en macrófagos, *M. bovis* en quimiostatos aeróbicos y *M. bovis* en lotes. Usando estos conjuntos de datos, se seleccionaron los genes que estaban consistentemente entre el 15% de transcritos de ARNm más abundantes en todas las condiciones tanto en *M. tuberculosis*, *M. bovis* o ambos. Se seleccionaron adicionalmente los candidatos basándose en la estrecha homología aminoacídica entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* y la homología poco significativa con otras especies estrechamente relacionadas. Además de esto, se excluyeron todos los candidatos que se hubieran ensayado anteriormente. Se cribaron un total de 14 candidatos usando péptidos de 20 unidades superpuestos en este estudio (Tabla 1).

#### Ganado

Se obtuvieron 10 animales de control no infectados de rebaños de parroquias ensayadas durante 4 años sin historial de brote de TBB en los últimos 4 años y se ensayó la ausencia de respuesta de IFN- $\gamma$  *in vitro* ante PPD-A y PPD-B, para confirmar la ausencia de infección. Se vacunaron 20 animales adicionales de rebaños exentos de TBB similares al menos 6 meses antes del muestreo con  $10^6$  ufc de la cepa de BCG danesa 1331 (Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca) según las instrucciones del fabricante (reconstituido en medio Sauton e inyectado a 1 ml por vía subcutánea).

Se obtuvieron muestras de sangre de 30 individuos de reacción positiva a la prueba de tuberculina cutánea infectados naturalmente de rebaños conocidos por tener TBB. Se cribó adicionalmente en todos los animales la respuesta de IFN- $\gamma$  *in vitro* ante PPD-B y se registró la presencia o ausencia de respuesta ante ESAT6 y CFP10. Se albergaron estos animales en VLA en el momento del muestreo de sangre. Se confirmó la infección por necroscopia y/o cultivo de *M. bovis*.

#### Producción de péptidos

Se suministraron tuberculina bovina (PPD-B) y tuberculina aviar (PPD-A) por la Tuberculin Production Unit de la Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Surrey, RU y se usaron para estimular sangre completa a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se incluyó enterotoxina B estafilocócica como control positivo a 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Se sintetizaron sobre varillas los péptidos representantes de los candidatos como péptidos de 20 unidades que cubren la longitud de las 14 proteínas, con cada péptido superponiéndose a su vecino por 12 residuos aminoacídicos (Pepscan, Lelystad, Holanda). Se disolvieron estos en disolución salina equilibrada de Hanks (Gibco) y 20% de DMSO a 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se agruparon por genes en 26 agrupamientos de 8 a 12 péptidos, con algunos genes representados por más de un agrupamiento. Se usaron los agrupamientos para estimular sangre completa a una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de péptido total. Se sintetizaron péptidos de las proteínas ESAT-6 y CFP-10, se valoró su calidad y se formularon en un cóctel peptídico como se describe anteriormente (Vordermeier *et al.*, 2001).

#### Ensayo de inmunosorción ligado a enzima de IFN- $\gamma$

Se efectuaron cultivos en sangre completa en placas de 96 pocillos en que se mezclaron 250  $\mu\text{l}$  de alícuotas de sangre completa con disolución que contiene antígeno a una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se recogieron los sobrenadantes que contenían suero después de 24 horas de cultivo a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador humidificado. Se determinó la concentración de IFN- $\gamma$  usando el kit BOVIGAM ELISA (Prionics AG, Suiza). Los resultados se consideraron positivos cuando las densidades ópticas a 450 nm (DO<sub>450</sub>) con antígenos menos la DO<sub>450</sub> sin antígenos eran  $\geq 0,1$ . Para el análisis comparativo de respuestas ante PPD-B frente a PPD-A, se definió un resultado positivo como una DO<sub>450</sub> de PPD-B menos DO<sub>450</sub> de PPD-A de  $\geq 0,1$  y una DO<sub>450</sub> de PPD-B menos DO<sub>450</sub> no estimulada de  $\geq 0,1$ .

#### Análisis de datos BOVIGAM

Se manejaron todos los datos brutos del cribado BOVIGAM usando un programa PERL, boviAnalyser.pl, que suscitaba rutinas analíticas en el entorno estadístico R (R-Development-Core-Team, 2006). Se generaron gráficas usando tanto R como Graph-Pad Prism v4.

#### Ensayo de puntos por inmunosorción ligada a enzima (ELISPOT) de IFN- $\gamma$ ex vivo

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada tomada de tres cabezas de ganado que habían exhibido anteriormente respuesta *in vitro* ante el agrupamiento de péptidos Rv3615c. Se efectuó la separación usando centrifugación en gradiente con Histopaque 1077 (Sigma) y se resuspendieron las células en medio de cultivo de tejido RPMI 1640 que contenía HEPES 25 mM (Gibco), 10% de suero fetal de ternero, 1% de aminoácidos no esenciales,  $\beta$ -mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se contaron las células y se prepararon suspensiones que contenían  $2 \times 10^6$  células/ml. Se analizó la producción de IFN- $\gamma$  por PBMC usando un kit ELISPOT de IFN- $\gamma$  bovina Mabtech (Mabtech, Estocolmo, Suecia). Se recubrieron las

placas de ELISPOT (Multiscreen HTS-IP; Millipore) a 4°C durante una noche con un anticuerpo monoclonal específico de IFN- $\gamma$  bovino, después de lo cual se bloquearon las células durante 2 horas usando 2% de suero fetal bovino en RPMI 1640. Se retiraron el anticuerpo primario y el tampón de bloqueo de las placas y se añadieron entonces PBMC suspendidas en medio de cultivo de tejido ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) y se incubaron durante una noche a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de antígenos individuales. Se efectuó la estimulación usando los péptidos a una concentración de 5  $\mu$ g/ml o un agrupamiento de los 12 péptidos que contiene 5  $\mu$ g/ml de cada péptido. Se lavaron los pocillos usando disolución salina tamponada con fosfato más 0,05% de Tween 80. Se usó un anticuerpo secundario biotinilado a una concentración de 0,025  $\mu$ g/ml seguido de una incubación con peroxidasa de rábano picante ligada a estreptavidina. Después de un lavado adicional, se visualizaron las células que formaban puntos usando un kit de cromógeno AEC (Sigma). Se contaron los puntos usando un lector AID ELISPOT y el software EliSpot 4.0 (Autoimmun Diagnostika, Alemania).

#### *Análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS)*

Se aislaron PBMC de sangre heparinizada reciente como se describe anteriormente para el ensayo ELISPOT y se contaron. Se preparó entonces una suspensión que contenía  $2 \times 10^6$  células/ml y se incubaron durante una noche en una placa de 24 pocillos (Nunc) a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> con medio RPMI (control no estimulado), PPD-B, mitógeno de hierba carmín (control positivo), péptidos individuales a una concentración de 5  $\mu$ g/ml o un agrupamiento de los 12 péptidos a una concentración de 5  $\mu$ g/ml. Después de la incubación, se añadió brefeldina A (Sigma) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml y se incubó la preparación durante 4 h adicionales. Se centrifugó la placa a 300 x g durante 5 min y se resuspendieron las células en 250  $\mu$ l (volumen final) para transferencia a una placa de 96 pocillos. Se efectuó la tinción de anticuerpo de superficie usando anticuerpos anti-CD4 conjugado con Alexa Fluor 647 (código MCA1653A627; Serotec) y anti-CD8 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (código MCA837F; Serotec). Se efectuó una tinción diferencial "viva/muerta" usando Vivid (Invitrogen). Después de incubar durante 15 min a 4°C, se lavaron las células y se centrifugaron antes de permeabilizar usando Cytotfix/ Cytoperm (BD) a 4°C durante 20 min, y se almacenaron durante una noche a 4°C. Se efectuó la tinción intracelular de IFN- $\gamma$  usando anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  conjugado con R-ficoeritrina (Serotec) durante 30 min a 4°C. Se suspendieron finalmente las células en 600  $\mu$ l de tampón y se analizaron usando un instrumento Cyan ADP y software Summit 4.3 (Dako, Dinamarca).

#### Resultados

Se valoró en los genes que se había encontrado que estaban altamente expresados de modo consistente en *M. tuberculosis* y *M. bovis* en una variedad de condiciones de crecimiento (denominados miembros de invarioma abundante) la presencia de antígenos conocidos. Se encontró que 10 antígenos anteriormente bien caracterizados eran parte de este invarioma abundante (Tabla 1), lo que sugería que los demás genes altamente expresados de forma consistente podían ser también antigénicos.

**Tabla 1: Antígenos micobacterianos que se encuentra que están altamente expresados en una variedad de condiciones de crecimiento**

| Rv      | Nombre     | ppm medias | Desv. est. | Referencia                      |
|---------|------------|------------|------------|---------------------------------|
| Rv0288  | cfp7       | 781        | 286        | (Skjot <i>et al.</i> , 2002)    |
| Rv0440  | groEL2     | 4438       | 2385       | (Shinnick, 1987)                |
| Rv1174c | Mpt8.4     | 1165       | 424        | (Coler <i>et al.</i> , 1998)    |
| Rv1886c | fbpB/Ag85B | 1464       | 1168       | (Harth <i>et al.</i> , 1996)    |
| Rv1987  | Rv1987     | 495        | 136        | (Cockle <i>et al.</i> , 2002)   |
| Rv1980c | mpt64      | 1316       | 629        | (Harboe <i>et al.</i> , 1986)   |
| Rv3418c | groES      | 5189       | 2593       | (Baird <i>et al.</i> , 1988)    |
| Rv3616c | Rv3616c    | 2619       | 1457       | (Mustafa <i>et al.</i> , 2006)  |
| Rv3874  | cfp10      | 5414       | 3950       | (Sorensen <i>et al.</i> , 1995) |
| Rv3875  | esat6      | 2472       | 1229       | (Berthet <i>et al.</i> , 1998)  |

Teniendo esto en mente, se generó una lista de 14 candidatos a antígeno basándose en su alta expresión consistente en una variedad de condiciones de crecimiento. Estas incluían quimiostato *in vitro* y cultivos en lotes tanto de *M. tuberculosis* como de *M. bovis*, así como para *M. tuberculosis* la infección de macrófagos y el crecimiento en condiciones microaerófilas. En la mayoría de casos, se seleccionaron también los candidatos

5 basándose en la homología estrecha entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* pero la poca homología con otras especies micobacterianas (Tabla 2). La mayoría de los candidatos se clasifican como proteínas hipotéticas conservadas. Sin embargo, hay tres presuntas proteínas de membrana, una es una escisionasa y otra un miembro de la familia de proteínas PE. Se sintetizaron péptidos de 20 unidades superpuestos para la secuencia de codificación completa de cada gen y se agruparon en 26 agrupamientos de 8 a 12 péptidos, con algunos péptidos representados por más de un agrupamiento. En estos agrupamientos se cribó entonces su capacidad de estimular la respuesta de IFN- $\gamma$  *in vitro* usando sangre completa de 30 cabezas de ganado infectadas por *M. bovis* (positivas de tuberculina bovina (PPD-B)) y 10 no infectadas por *M. bovis* (negativas de PPD-B).

Tabla 2: Candidatos a antígeno cribados  
% de homología de secuencia aa con H37Rv de *M. tuberculosis* ("M. tb") si >50%

| Rv      | Mb      | M. tb | M. bovis | M. avium | M. paratb. | M. leprae | M. marinum | M. smegmatis | C. glutamicum | N. farcinica | Altamente expresado en <sup>†</sup> : | Función                          |
|---------|---------|-------|----------|----------|------------|-----------|------------|--------------|---------------|--------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Rv1211  | Mb1243  | 100   | 100      |          |            | 94        | 93         | 80           | 52            | 72           | M. tb.*                               | CHP                              |
| Rv1222  | Mb1254  | 100   | 100      | 64       | 64         | 71        | 67         | 64           |               |              | Mb                                    | CHP                              |
| Rv1398c | Mb1433c | 100   | 100      |          |            |           |            |              |               |              | Mtb y Mb                              | CHP                              |
| Rv2081c | Mb2107c | 100   | 100      |          |            |           |            |              |               |              | Mb                                    | Posible TP                       |
| Rv2876  | M2901   | 100   | 99       |          |            | 68        | 58         | 58           |               | 50           | Mb                                    | Posible TP conservada            |
| Rv3271c | Mb3299c | 100   | 100      |          |            |           | 78         |              |               |              | Mtb                                   | IMP probablemente conservada     |
| Rv3407  | Mb3441  | 100   | 100      |          |            |           |            | 50           |               |              | Mtb                                   | CHP                              |
| Rv3477  | Mb3504  | 100   | 98       | 70       | 70         | 58        | 75         |              |               |              | Mtb y Mb                              | Proteína de la familia PE (PE31) |
| Rv3613c | Mb3643c | 100   | 100      |          |            |           |            |              |               |              | M. tb.*                               | HP                               |
| Rv3614c | Mb3644c | 100   | 100      |          |            | 81        | 73         | 51           |               |              | Mtb y Mb                              | CHP                              |
| Rv3615c | Mb3645c | 100   | 100      |          |            | 67        | 79         |              |               |              | Mtb y Mb                              | CHP                              |
| Rv3633  | Mb3657  | 100   | 100      |          |            |           |            |              |               |              | Mb                                    | CHP                              |
| Rv3750c | Mb3776c | 100   | 100      |          |            |           |            |              |               |              | Mtb                                   | Posible escisionasa              |
| Rv3866  | Mb3896  | 100   | 100      |          |            |           | 89         | 78           |               |              | Mb                                    | CHP                              |

<sup>†</sup>: Expresado en las 4 condiciones de Mtb (cultivo en lotes, quimiostato aeróbico y bajo en oxígeno, macrofagos) o las 2 condiciones de Mb (cultivos en lotes y quimiostatos)

\*: en todas las condiciones de Mtb excepto bajo en oxígeno

CHP: proteína hipotética conservada

HP: proteína hipotética

IMP: proteína de membrana integral

TP: proteína transmembrana

Todas las cabezas de ganado de *M. bovis* infectadas tenían respuestas positivas ante PPD-B y además 23 de las 30 cabezas de ganado infectadas respondían ante un cóctel de péptidos ESAT6/CFP10 (Vordermeier *et al.*, 2001). Se muestran en la Figura 1 las frecuencias de respuesta para los 14 candidatos a antígeno en ganado infectado por *M. bovis* y no infectado por *M. bovis*. 7 de los candidatos no consiguieron estimular ninguna respuesta de IFN- $\gamma$  significativa ni en ganado infectado por *M. bovis* ni no infectado. 4 de los candidatos a antígeno estimulaban una respuesta positiva en un 10% o más de los animales no infectados por *M. bovis*. Esto sugería una reactividad cruzada con otras especies ambientales aunque los inventores seleccionaron contra homología significativa en micobacterias distintas de *M. tuberculosis* o *M. bovis*. 4 de los candidatos estimulaban respuestas significativas en ganado infectado por *M. bovis*, aunque 2 de estos se reconocían en un 10% o menos del ganado ensayado y tenían frecuencias de respuesta similares o mayores en animales negativos de PPD-B. De los dos candidatos restantes, *Rv3750c/Mb3776c* estimulaban una respuesta en un 15% del ganado infectado por *M. bovis* y en ninguno de los animales no infectados.

*Mb3645c* no se reconoció por ninguna de las cabezas de ganado no infectadas por *M. bovis*, mientras que 11 de los 30 animales infectados por *M. bovis* (37%,  $p < 0,01$ , Figura 2) crearon una respuesta de IFN- $\gamma$  positiva cuando se estimulaban con este agrupamiento peptídico. De forma interesante, dado el papel recientemente propuesto de *Rv3615c* (el equivalente en *M. tuberculosis* de *Mb3645c*) en la secreción de ESAT6/CFP10 en *M. tuberculosis* (Macgurn *et al.*, 2005, Fortune *et al.*, 2005), se observó que las respuestas positivas ante el agrupamiento peptídico *Mb3645c* de animales infectados por *M. bovis* se enriquecían en las cabezas de ganado que no respondían a ESAT6 ni CFP10 (4 de 7, 57%,  $p < 0,05$ , Figura 2). Esto eleva la posibilidad de que estas proteínas puedan usarse para aumentar la sensibilidad de pruebas de diagnóstico basadas en ESAT6/CFP10 anteriormente desarrolladas (Vordermeier *et al.*, 2001).

Para valorar el potencial de *Mb3645c* como antígeno para el diagnóstico diferencial de animales vacunados con BCG e infectados por *M. bovis*, se cribó el agrupamiento peptídico en 20 cabezas de ganado vacunadas con BCG. En contraposición con los animales infectados por *M. bovis*, ninguna de las cabezas de ganado vacunadas con BCG creó una respuesta de IFN- $\gamma$  significativa ante péptidos *Mb3645c* ( $p < 0,01$ , Figura 2).

Finalmente, como pocos de los candidatos resultaron ser antígenos potentes, se exploró adicionalmente la correlación entre los niveles de ARNm y la antigenicidad. Se recogieron las frecuencias de respuesta para 80 proteínas micobacterianas adicionales que se habían cribado en ganado infectado por *M. bovis* (Ewer *et al.*, 2006, Cockle *et al.*, 2002, Mustafa *et al.*, 2006). Conjuntamente, estas 94 proteínas tenían frecuencias de respuesta que variaban de 0 a 86%, con una media de 30% que representaba así un amplio intervalo de potencial antigénico. En comparación con sus abundancias de ARNm, se encontró poca correlación en *M. tuberculosis* o *M. bovis* crecidas en quimiostato: 0,01 (Spearman,  $p = 0,38$ ) y 0,06 (Spearman,  $p = 0,56$ ) respectivamente, sugiriendo que el nivel de ARNm solo no es un factor de predicción importante de potencial antigénico en el ganado.

Para confirmar la presencia y localización de los epítomos de células T en *Rv3615c*, se determinó la respuesta ante péptidos constituyentes del agrupamiento *Rv3615c* usando un ensayo ELISPOT de IFN- $\gamma$  con PBMC aisladas de ganado infectado por *M. bovis*. Los péptidos SEQ ID NO: 8-13 se reconocieron en al menos dos de las tres cabezas de ganado ensayadas. Los péptidos de SEQ ID NO: 10-13 (que cubren los aminoácidos 57 a 103) desde el extremo C de la proteína eran los más antigénicos y se reconocieron por los tres animales ensayados. El péptido de SEQ ID NO: 13 (AKIYSEADEAWRKAIDGLFT), en particular, estimulaba una respuesta en los tres animales, con una media de 509 unidades formadoras de punto (UFP) por  $10^6$  PBMC (desviación estándar, 185,3 UFP por  $10^6$  PBMC), que es comparable con los resultados para el agrupamiento en conjunto (414 UFP por  $10^6$  PBMC; desviación estándar, 135,6 UFP por  $10^6$  PBMC) (Figura 4).

Para caracterizar adicionalmente la respuesta linfocítica específica ante *Rv3615c*, se efectuó un análisis de FACS con PBMC aisladas del mismo ganado infectado por *M. bovis* que se usó para el análisis ELISPOT. Se analizó en los linfocitos la producción de IFN- $\gamma$  intracelular y la presencia de los marcadores de diferenciación celular CD4 y CD8. Se encontró que, reflejando los datos de ELISPOT, los péptidos de SEQ ID NO: 2-8 estimulaban poca producción de IFN- $\gamma$ . Se observaron niveles notablemente superiores de IFN- $\gamma$  para las células estimuladas con los péptidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12 y 13 (Figura 5). De forma interesante, no se observó respuesta de IFN- $\gamma$  ante el péptido de SEQ ID NO: 11, a pesar del hecho de que se registró una respuesta en el ensayo ELISPOT. El análisis de las células estimuladas con el péptido de SEQ ID NO: 11 mostró que la mayoría (>64%) de las células en la muestra estaban muertas, sugiriendo que el péptido mismo causaba la apoptosis inducida por IFN- $\gamma$ , lo que podría estar de acuerdo con las respuestas positivas vistas en el ensayo ELISPOT.

### Discusión

Ha habido muchas estrategias para la identificación de inmunógenos micobacterianos usando métodos postgenómicos, incluyendo la predicción de epítomos de células T (Vordermeier *et al.*, 2003) y comparaciones genómicas para identificar marcos de lectura abiertos específicos de patógenos (Ewer *et al.*, 2006). Trabajos previos han mostrado que muchos genes altamente expresados eran antígenos micobacterianos conocidos; por lo tanto, los inventores consideraron la actividad transcripcional como un factor de predicción de antigenicidad.

Se cribó en una selección de genes altamente expresados de forma consistente su capacidad de estimular respuestas de IFN- $\gamma$  en ganado infectado por *M. bovis*. Se seleccionaron 14 candidatos basándose en su alta expresión tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis* en una variedad de condiciones de crecimiento, incluyendo quimiostato *in vitro* y cultivos en lotes, así como de cultivos de una infección por macrófagos y de quimiostato microaerófilo. Se excluyeron las proteínas si eran inmunógenos conocidos o tenían una homología significativa con proteínas de otras micobacterias; por ello, la mayoría de candidatos a antígeno no tenían anotaciones funcionales. Sin embargo, se predijeron tres proteínas asociadas a membrana, una escisionasa y una proteína de la familia PE (Tabla 2).

Tres de los candidatos cribados aquí (Rv3615c/14c/13c) parecen estar localizados en el mismo operón de cinco genes (Rv3616c a Rv3612c). El operón completo está altamente expresado de forma consistente en todas las condiciones de crecimiento analizadas por micromatrices. Uno de estos candidatos, Mb3645c, tenía la frecuencia de respuesta mayor en ganado infectado por *M. bovis* de todos los candidatos ensayados en este estudio. Los productos de estos genes operónicos se han identificado como componentes del sistema de secreción micobacteriano (el sistema SNM), que funciona exportando tanto ESAT6 como CFP10 (Macgurn *et al.*, 2005, Fortune *et al.*, 2005). Se ha mostrado también que el producto del primer gen de este operón, Rv3616c, es un antígeno micobacteriano dominante. Rv3616c se reconoce más frecuentemente en ganado infectado por *M. bovis* en comparación con Rv3615c: 84,6% frente a 37% (Mustafa *et al.*, 2006). Rv3616c se secreta de manera mutuamente dependiente con ESAT6 y CFP10 (Fortune *et al.*, 2005), mientras que Rv3615c parece interactuar con otras proteínas del sistema de secreción (Macgurn *et al.*, 2005) y puede por lo tanto permanecer en la célula bacteriana, lo que podría explicar la diferencia en las frecuencias de respuesta del ganado infectado por *M. bovis*.

El cóctel peptídico de ESAT6/CFP10 se había desarrollado como reactivo de diagnóstico alternativo a PPD y diferencia individuos infectados y vacunados ya que estos antígenos no están presentes en BCG de *M. bovis* (Vordermeier *et al.*, 2001). Se ha reseñado que la prueba tiene una sensibilidad de aproximadamente un 77,9% en ganado infectado. Se ha encontrado que Rv3615c no es reconocido por los sistemas inmunitarios de animales no infectados por *M. bovis* o vacunados con BCG, al contrario que Rv3616c al que responden un 40% de los individuos vacunados (Mustafa *et al.*, 2006), y es por tanto altamente específico. Además, un 57% del ganado infectado por *M. bovis* que no responde al cóctel peptídico de ESAT6/CFP10 usado genera una respuesta de IFN- $\gamma$  significativa ante Rv3615c. Por lo tanto, la inclusión de Rv3615c en el cóctel de diagnóstico de ESAT6/CFP10 aumenta la sensibilidad de una prueba de diagnóstico de *M. bovis*, al detectar animales infectados que no consiguen reconocer los epítomos de ESAT6/CFP10. Esto se consigue sin comprometer la especificidad de la prueba.

De los 14 candidatos iniciales, solo uno era significativamente antigénico, mientras que observaciones previas habían conducido a los investigadores a creer que muchos genes altamente expresados podrían ser inmunógenos potentes. Es bien conocido que los procesos de transcripción y traducción están estrechamente acoplados en procariontes (Miller *et al.*, 1970) y existe cierta correlación entre los niveles de ARNm y proteína en las micobacterias. Por lo tanto, se teorizó que esto estaba reflejando potencialmente una tendencia por la cual las proteínas más abundantes son simplemente más accesibles a los sistemas inmunitarios del hospedador y es más probable que se procesen y presenten por fagocitos. A la vista de los datos generados por los inventores, se examinó esto con más detalle recogiendo las frecuencias de respuesta para 94 proteínas, incluyendo las 14 cribadas en este estudio. Sorprendentemente, se encontró muy poca correlación entre los niveles de ARNm y la antigenicidad medida por frecuencias de respuesta, sugiriendo que la abundancia de ARNm sola no es un factor de predicción válido del estado antigénico.

#### Referencias

Bacon J, James BW, Wernisch L, Williams A *et al.* (2004) *Tuberculosis*, 84, 205-217.

Baird, P. N., Hall, L. M. C. y Coates, A. R. M. (1988) *Nucl. Acids Res.*, 16, 9047.

Berthet, F., Rasmussen, P., Rosenkrands, I., Andersen, P. y Gicquel, B. (1998) *Microbiology*, 144, 3195-3203.

Cockle, P. J., Gordon, S. V., Lalvani, A., Buddle, B. M., Hewinson, R. G. y Vordermeier, H. M. (2002) *Infect. Immun.*, 70, 6996-7003.

Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V. y Mosteller, F. (1994) *JAMA*, 271, 698-702.

Coler, R. N., Skeiky, Y. A. W., Vedvick, T., Bement, T., Owendale, P., Campos-Neto, A., Alderson, M. R. y Reed, S. G. (1998) *J. Immunol.*, 161, 2356-2364.

Corbett, E. L., Watt, C. J., Walker, N., Maher, D., Williams, B. G., Raviglione, M. C. y Dye, C. (2003) *Arch. Intern. Med.*, 163, 1009-1021.

DEFRA (2006), Departamento de medio ambiente, alimentación y medio rural del gobierno de RU, Ficha técnica de gastos por TB bovina 1999 - 2005 [en línea]. Disponible en: <http://www.defra.gov.uk/animalh/tb/stats/expenditure.htm> [accedido el 23/08/2006].

- Ewer, K., Cockle, P., Gordon, S., Mansoor, H., Govaerts, M., Walravens, K., Marche, S., Hewinson, G. y Vordermeier, M. (2006) Clin. Vaccine Immunol., 13, 90-97.
- Fine, P. E. M. (1995) The Lancet, 346, 1339-1345.
- 5 Fortune, S. M., Jaeger, A., Sarracino, D. A., Chase, M. R., Sasseti, C. M., Sherman, D. R., Bloom, B. R. y Rubin, E. J. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 10676-10681.
- Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, M. E., Torres, M. L., Ramírez, C. y Cruz, N. (1986) Infect. Immun., 52, 293-302.
- Harth, G., Lee, B., Wang, J., Clemens, D. y Horwitz, M. (1996) Infect. Immun., 64, 3038-3047.
- Krebs, J. (1997) Publicaciones del ministerio de agricultura, pesca y alimentación, Londres, Reino Unido.
- Macgurn, J. A., Raghavan, S., Stanley, S. A. y Cox, J. S. (2005) Mol. Microbiol., 57, 1653-63.
- 10 Miller, O. L., Jr., Hamkalo, B. A. y Thomas, C. A., Jr. (1970) Science, 169, 392-395.
- Mustafa, A. S., Skeiky, Y. A., Al-Attiyah, R., Alderson, M. R., Hewinson, R. G. y Vordermeier, H. M. (2006) Infect. Immun., 74, 4566-4572.
- "R- Development- Core- Team (2006) R: A Language and Environment for Statistical Computing", R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria.
- 15 Rogerson, B. J., Jung, Y.-J., LaCourse, R., Ryan, L., Enright, N. y North, R. J. (2006) Immunology, 118, 195-201.
- Shinnick, T. M. (1987) J. Bacteriol., 169, 1080-1088.
- Skjot, R. L. V., Brock, I., Arend, S. M., Munk, M. E., Theisen, M., Ottenhoff, T. H. M. y Andersen, P. (2002) Infect. Immun., 70, 5446-5453.
- Sorensen, A., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P. y Andersen, A. (1995) Infect. Immun., 63, 1710-1717.
- 20 Vordermeier, H. M., Whelan, A., Cockle, P. J., Farrant, L., Palmer, N. y Hewinson, R. G. (2001) Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8, 571-578.
- Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. (2002). Infect. Immun., 70, 3026-32
- Vordermeier, M., Whelan, A. O. y Hewinson, R. G. (2003) Infect. Immun., 71, 1980-1987.
- 25 Wood PR, Jones SL. (2001) Tuberculosis (Edinb, 81, 147-55.



**Listado de secuencias**

- <110> The Secretary of State for Environment, Food and Rural Affairs acting through the veterinary Laboratories Agency
- 5 <120> Antígenos de micobacterias
- <130> P1416EP01
- 10 <140> 08848298.9  
<141> 11-06-2008
- <150> 0722105.4  
<151> 10-11-2007
- 15 <160> 25
- <170> PatentIn version 3.5
- 20 <210> 1  
<211> 103  
<212> PRT  
<213> Mycobacterium bovis
- 25 <400> 1
- Met Thr Glu Asn Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala  
1 5 10 15
- Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala  
20 25 30
- Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys  
35 40 45
- Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala  
50 55 60
- Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu  
65 70 75 80
- Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys  
85 90 95
- Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr  
100
- 30 <210> 2  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial
- <220>  
35 <223> fragmento de proteína de longitud total
- <400> 2
- Met Thr Glu Asn Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala  
1 5 10 15
- Ser His His Asp  
20

ES 2 564 026 T3

<210> 3  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total  
  
 10 <400> 3  
  
 Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala Ser His His Asp Asn Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
  
 Asp Ala Ser Ser  
 20  
  
 15 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> fragmento de proteína de longitud total  
  
 <400> 4  
  
 Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala  
 1 5 10 15  
  
 Ala Ala Gly Leu  
 20  
  
 25 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total  
  
 <400> 5  
  
 35 Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val  
 1 5 10 15  
  
 Ala Ile Thr His  
 20  
  
 40 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total  
  
 45 <400> 6  
  
 Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys  
 1 5 10 15  
  
 Ser Gln Phe Asn  
 20

ES 2 564 026 T3

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total  
  
 10 <400> 7  
  
 Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn  
 1 5 10 15  
  
 Val Tyr Leu Thr  
 20  
  
 15 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> fragmento de proteína de longitud total  
  
 <400> 8  
  
 Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala  
 1 5 10 15  
  
 Leu Gly Ser Ser  
 20  
  
 25 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total  
  
 <400> 9  
  
 35 Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala  
 1 5 10 15  
  
 Gly Val Asp Leu  
 20  
  
 40 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total  
  
 45 <400> 10  
  
 Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu  
 1 5 10 15  
  
 Arg Ile Ala Ala  
 20

ES 2 564 026 T3

<210> 11  
<211> 20  
<212> PRT  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> fragmento de proteína de longitud total

10 <400> 11

Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser  
1 5 10 15

Glu Ala Asp Glu  
20

15 <210> 12  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
20 <223> fragmento de proteína de longitud total

<400> 12

Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys  
1 5 10 15

Ala Ile Asp Gly  
20

25 <210> 13  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> fragmento de proteína de longitud total

<400> 13

35 Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys Ala Ile Asp  
1 5 10 15

Gly Leu Phe Thr  
20

40 <210> 14  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Mycobacterium bovis

<400> 14

ES 2 564 026 T3

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser  
1 5 10 15

Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly  
20 25 30

Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser  
35 40 45

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu  
50 55 60

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala  
85 90 95

<210> 15  
<211> 100  
5 <212> PRT  
<213> Mycobacterium bovis

<400> 15

Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly  
1 5 10 15

10 Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val  
20 25 30

Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly  
35 40 45

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys  
50 55 60

Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly  
65 70 75 80

Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser  
85 90 95

Gln Met Gly Phe  
100

15 <210> 16  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> fragmento de proteína de longitud total

<400> 16

25 Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser  
1 5 10 15

<210> 17

ES 2 564 026 T3

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

<400> 17

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

<210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

20 <400> 18

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

<210> 19  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

30 <400> 19

Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu  
 1 5 10 15

35 <210> 20  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

45 <400> 20

Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala  
 1 5 10 15

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

55 <400> 21

Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly  
 1 5 10 15

60 Asn Phe

<210> 22

ES 2 564 026 T3

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

<400> 22

Gln Glu Ala Gly Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln  
 10 1 5 10 15

<210> 23  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

<400> 23

Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu Leu Asp  
 20 1 5 10 15

Glu Ile

25 <210> 24  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

<400> 24

35 Asn Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln  
 1 5 10 15

Gln Gln

40 <210> 25  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> fragmento de proteína de longitud total

<400> 25

Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser Gln Met Gly Phe  
 50 1 5 10 15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un reactivo de diagnóstico de ensayo de inmunidad mediada por célula (CMI) para uso en la detección de infección por *M. tuberculosis* en un mamífero, que comprende uno o más péptidos consistente cada uno en una de las SEQ ID NO: 2-13, o una variante funcional que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con y es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria similar a la SEQ ID NO: 2-13.
2. El reactivo de diagnóstico de ensayo CMI según la reivindicación 1, que comprende al menos 2, 3, 4 o más péptidos cada uno del grupo de péptidos consistente en las SEQ ID NO: 2-13.
3. El reactivo de diagnóstico de ensayo CMI según la reivindicación 2, que comprende todos los péptidos de las SEQ ID NO: 2-13.
- 10 4. El reactivo de diagnóstico de ensayo CMI según cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente uno o más polipéptidos que tienen cada uno la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 14-25.
- 15 5. Un kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico de ensayo CMI como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el reactivo de diagnóstico de ensayo CMI es capaz de detectar una infección por *M. tuberculosis* en un mamífero y en que es capaz de diferenciar un mamífero infectado por *M. tuberculosis* de un mamífero vacunado contra la infección por *M. tuberculosis*.
- 20 6. Un polipéptido aislado que comprende una combinación contigua de dos o más péptidos consistiendo cada uno en las SEQ ID NO: 2-13.
7. Un ácido nucleico que codifica un péptido que consiste en una de SEQ ID NO: 2-13, o que codifica un péptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia y que es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria similar a SEQ ID No: 2-13.
8. Un vector adecuado para expresar un péptido como se define en la reivindicación 1, que comprende el ácido nucleico como se define en la reivindicación 7.
9. Una célula transformada con el vector como se define en la reivindicación 8.
- 25 10. Un método *in vitro* para diagnosticar en un hospedador una infección por, o exposición a, *M. tuberculosis*, que comprende las etapas de:
  - i) poner en contacto una población de células del hospedador con un reactivo de diagnóstico de ensayo de inmunidad mediada por célula (CMI) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o un reactivo de diagnóstico que comprende SEQ ID NO:1 y/o un polipéptido aislado según la reivindicación 6; y
  - ii) determinar si las células de dicha población celular reconocen el reactivo de diagnóstico.

30



Frecuencias de respuesta

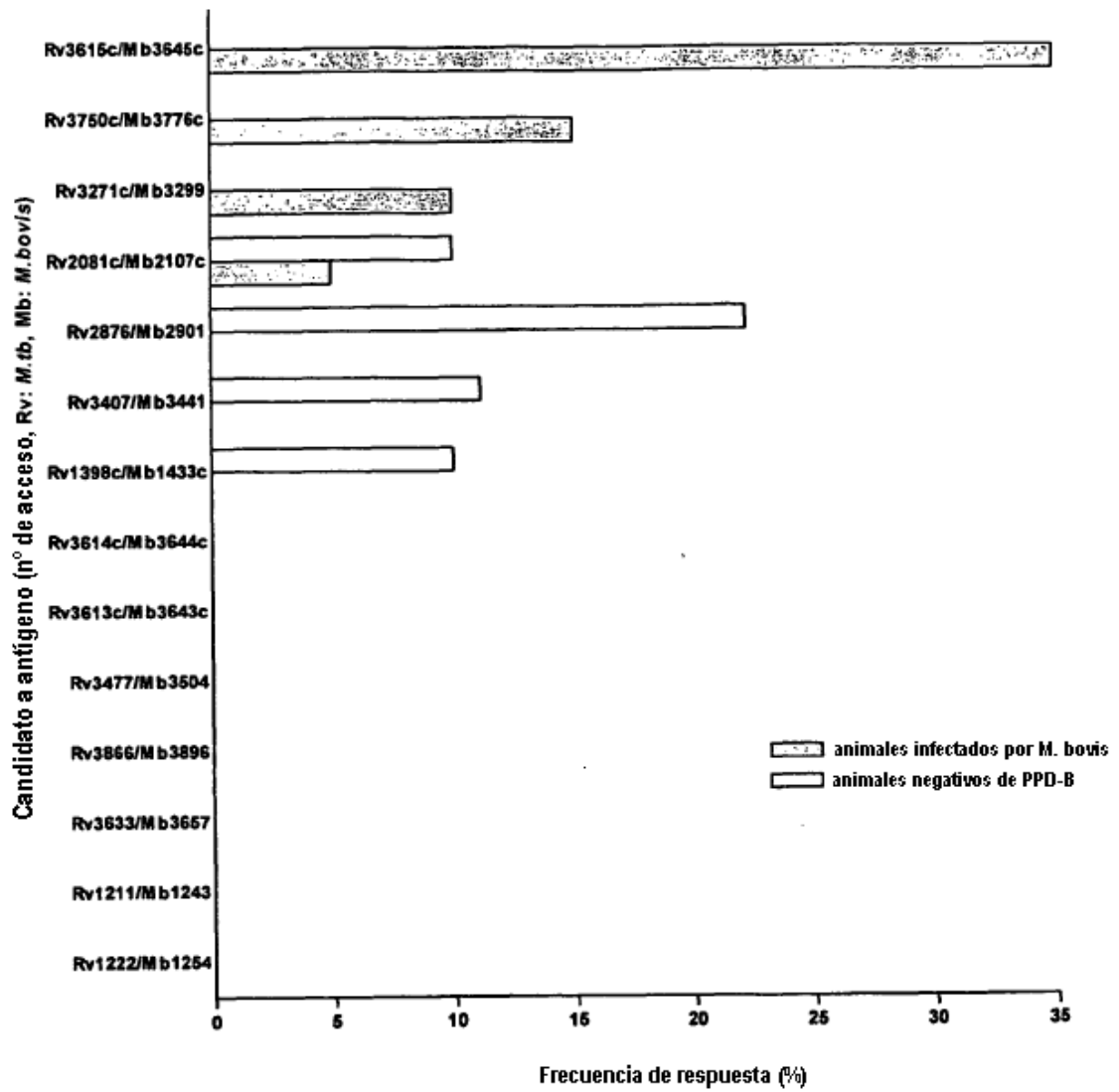


Figura 1

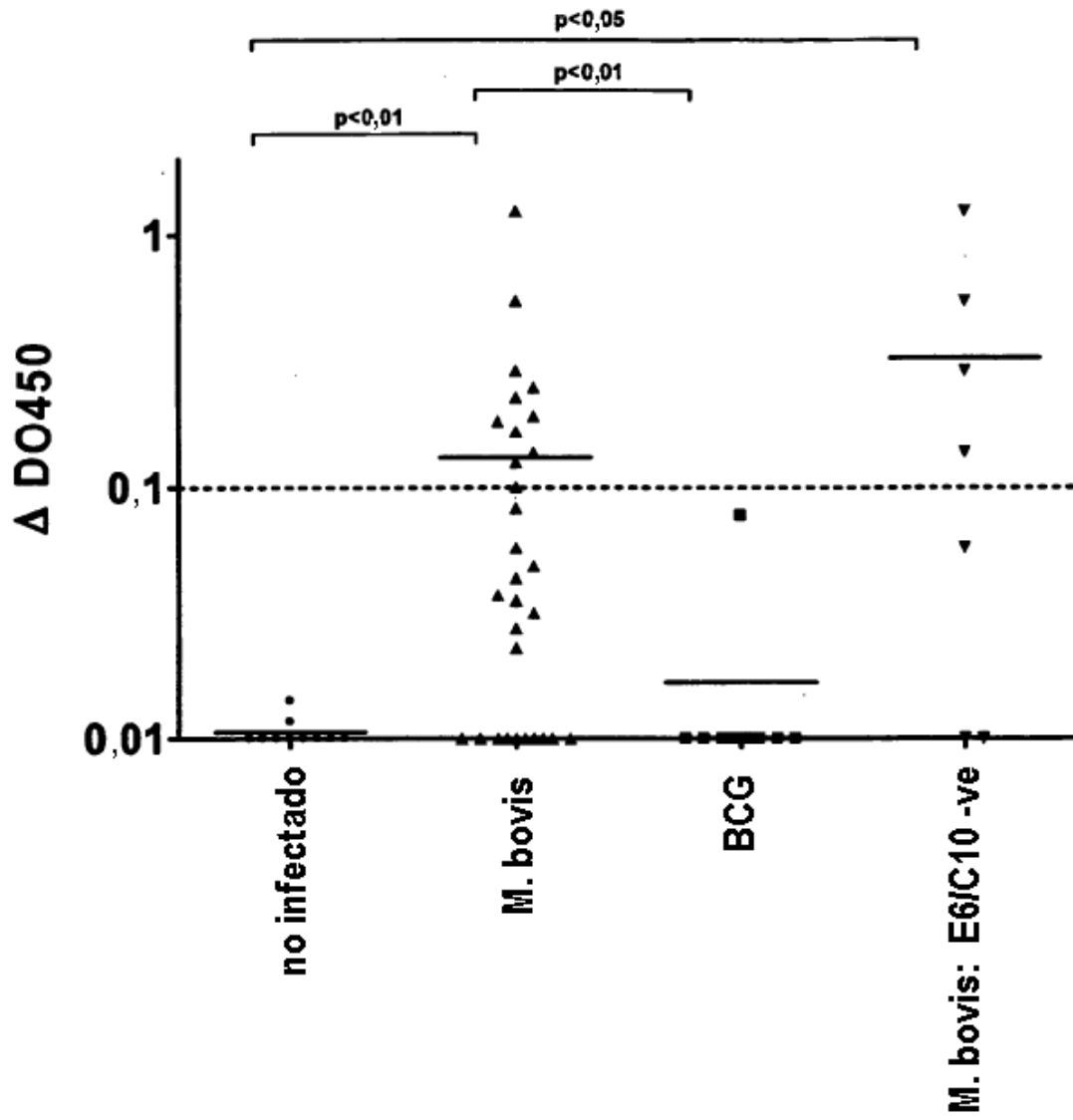


Figura 2

ARNm frente a antigenicidad

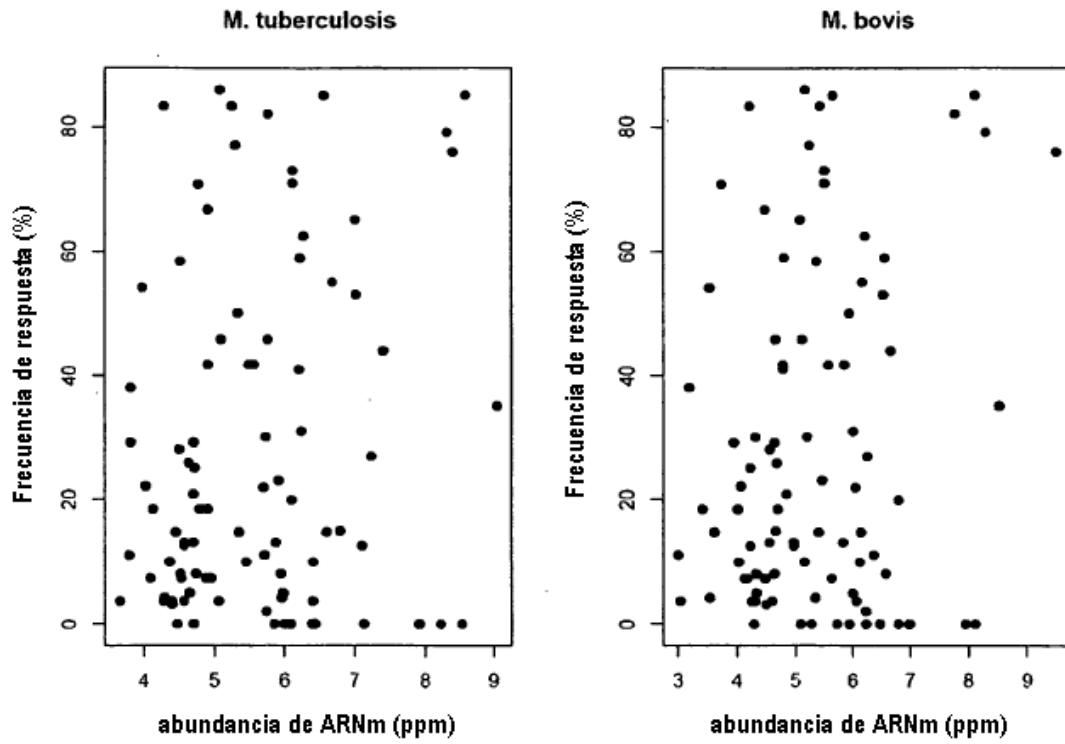


Figura 3

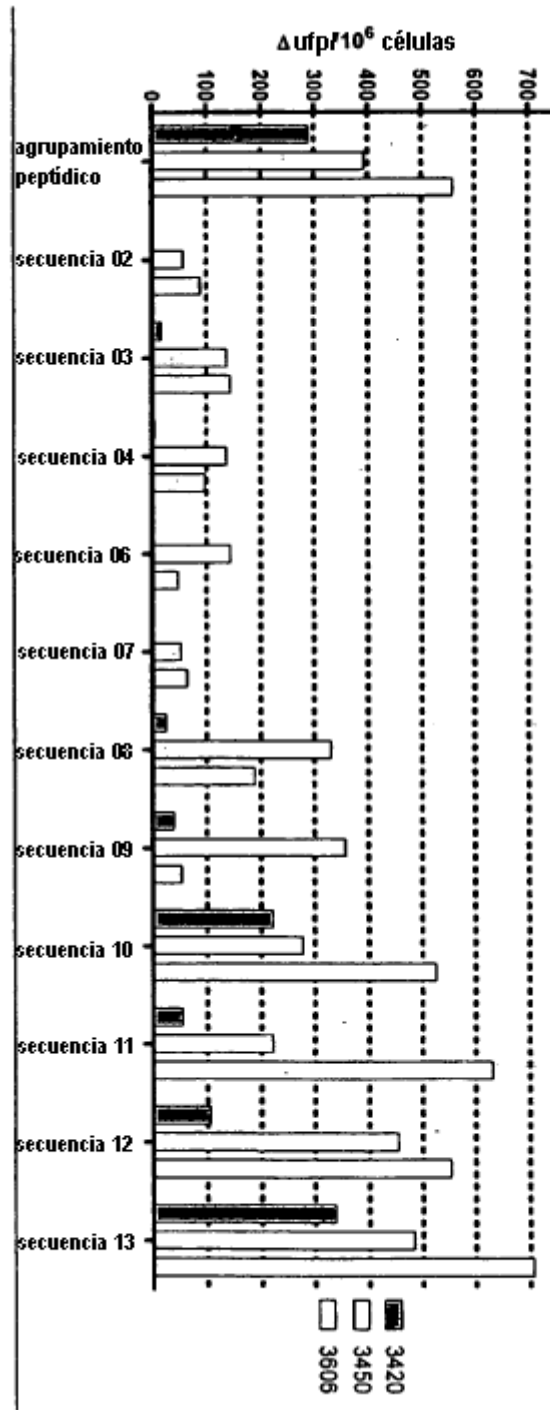


Figura 4

Figura 5

