

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 907**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2011 PCT/GB2011/051343**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12010875**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2011 E 11745814 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2596357**

54 Título: **Reactivos de diagnóstico**

30 Prioridad:

19.07.2010 GB 201012072

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

13.02.2017

73 Titular/es:

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

**Acting through Animal and Plant Health Agency,
Woodham Lane
Addlestone, Surrey KT15 3NB, GB**

72 Inventor/es:

**JONES, GARETH y
VORDERMEIER, HANS**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 600 907 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

Reactivos de diagnóstico.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a reactivos para su uso en la detección de infecciones por tuberculosis, particularmente tuberculosis en mamíferos tales como seres humanos y ganado, más particularmente infección por *Mycobacteria*, tales como *M. Tuberculosis* y *M. bovis*. Los reactivos son útiles para diferenciar entre animales con una infección por tuberculosis y aquellos que han sido vacunados contra una infección, ya que únicamente se obtiene un resultado positivo a partir de animales infectados (o animales expuestos a un agente infeccioso).

Antecedentes

15 *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 y col., (2003) Arch. Intern. Med. vol. 163 págs. 1009-1021). *M bovis*, que tiene más de un 99,9 % de identidad de secuencia con *M. tuberculosis*, es el agente causante predominante de la tuberculosis bovina (TBB) y causa también la enfermedad en seres humanos. Se han notificado casos de tuberculosis bovina en ganado causada por *M. tuberculosis*, particularmente en países en desarrollo con altos índices de incidencia de TB humana (véase, por ejemplo, Berg y col. (2009) PLoS ONE vol. 4 e5068). La TBB representa una carga económica significativa para la industria agrícola de diversos países incluyendo Reino Unido (Krebs (1997) "Bovine Tuberculosis in Cattle & Badgers" HMSO, Londres, Reino Unido).

25 La principal prueba de diagnóstico utilizada en el control y vigilancia de la TB bovina es la prueba cutánea de tuberculina, una prueba que ha permanecido en la vanguardia del diagnóstico de la TB tanto en el hombre como en el ganado durante más de 100 años. El desarrollo de la prueba surgió después de la preparación de la primera "tuberculina" por Robert Koch en 1890. Mientras que la tuberculina de Koch no pudo vivir hasta sus pretensiones iniciales de tener propiedades curativas, se reconoció rápidamente su potencial diagnóstico. Los formatos más comunes de la prueba usados en el ganado son la prueba del pliegue caudal (CFT), la prueba de tuberculina cervical intradérmica simple (SIT) y la prueba de tuberculina cervical comparativa intradérmica simple (SICCT) (Monaghan y col. (1994) Vet. Microbiol. vol. 40 págs. 111-24). Ambos formatos de prueba usan una tuberculina derivado proteico purificado (PPD) preparada de un cultivo de *M. bovis* (PPD-B) como el antígeno de diagnóstico principal. Adicionalmente, la prueba SICCT incluye el uso de un PPD obtenido a partir de *M. avium* (PPD-A) para proporcionar una medida de sensibilización ambiental. Es la más específica de las dos pruebas (Plum (1931) Cornell Vet. vol. 21 págs. 68-76; Stenius (1938) Veterinary Record vol. 50 págs. 633-7) y, por lo tanto, el formato de prueba adoptado en Reino Unido.

40 Además de los ensayos cutáneos, están también bajo consideración ensayos de diagnóstico basados en sangre que miden la producción de linfocinas inducidas por antígeno tales como el interferón (IFN- γ). La citocina IFN- γ parece ser crítica en el desarrollo de inmunidad a *M. tuberculosis*. Por ejemplo, tanto ratones con un gen de IFN- γ interrumpido como seres humanos con un receptor de IFN- γ mutado son altamente susceptibles a infecciones micobacterianas. Sin embargo, están asociadas limitaciones de especificidad al uso de PPD en dichos ensayos. Estas surgen debido a la mezcla en bruto 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*.

50 La expresión "ensayo de infección por tuberculosis" usada en la presente memoria descriptiva puede referirse a cualquiera de estas pruebas de diagnóstico a las que se ha hecho referencia anteriormente.

La tuberculosis bovina es un problema importante y constante en Reino Unido (<http://www.defra.gov.uk/food-farm/animals/diseases/tb>, consultado el 14 de julio de 2011). La vacunación de ganado bovino ha sido identificada como una de las estrategias de control a largo plazo de Reino Unido más prometedoras (Krebs (1997) "Bovine Tuberculosis in Cattle & Badgers" HMSO) y el desarrollo de una vacuna eficaz sigue siendo una prioridad de investigación. Actualmente, las vacunas prometedoras contra la tuberculosis bovina se basan en combinaciones de sensibilización-recuerdo heterólogas que incluyen la cepa de la vacuna de *M. bovis* atenuada viva Bacilo Calmette-Guerin (BCG) como uno de sus componentes (Hogarth y col. (2006) J. Pharm. Pharmacol. vol. 58 págs. 749-57). Sin embargo, como en los seres humanos, la vacunación de ganado con BCG compromete la especificidad de la prueba

cutánea de tuberculina, ya que el PPD contiene antígenos reactivos cruzados compartidos tanto por las cepas patógenas como de vacuna (Berggren (1981) Br. Vet. J. vol. 137 págs. 88-94; Buddle y col. (1999) Clin. Diagn. Lab. Immunol. vol. 6 págs. 1-5; Waddington & Ellwood (1972) Br. Vet. J. vol. 128 págs. 541-52). Por lo tanto, el desarrollo de pruebas de diagnóstico que puedan diferenciar los animales vacunados de los infectados, denominados pruebas 5 DIVA, es un requisito previo esencial para permitir la inclusión de la vacunación basada en BCG como parte de las estrategias de control de la tuberculosis bovina.

Los documentos WO98/53075, WO98/53076, WO01/04151 y WO01/62893 desvelan en su totalidad compuestos, incluyendo polipéptidos, que pueden ser útiles para diagnosticar tuberculosis. El documento ZA200706520 desvela 10 una proteína tipo ESAT de *Mycobacterium tuberculosis*.

Estudios anteriores han demostrado que los reactivos de diagnóstico que distinguen entre ganado vacunado e infectado se pueden desarrollar usando antígenos definidos y específicos que están presentes en *M. bovis* virulento pero ausente del BCG. El análisis genético del BCG ha revelado que varias regiones genómicas grandes se han 15 eliminado durante la atenuación y posterior propagación prolongada en el cultivo. Estas regiones se han caracterizado y los antígenos de una de estas regiones, RD1, se han estudiado extensamente 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 ganado vacunado con BCG. En los seres humanos, se usan los péptidos ESAT-6 y CFP-10 sintéticos 20 en la prueba QuantiFERON[®]-TB Gold para el diagnóstico de la tuberculosis.

La aplicación práctica de dichos reactivos DIVA se ha realizado hasta ahora en gran medida a través del uso en ensayos de liberación de interferón γ (IFN- γ) (IGRAs) basados en sangre. Por ejemplo, el documento WO2009/060184 desveló varios polipéptidos que incluían epítopos de Rv3615c que se descubrió que eran útiles 25 para detectar una infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis*, usando tal ensayo. Este polipéptido también se ha confirmado como útil para detectar una infección por *M. tuberculosis* en seres humanos (Millington y col. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 108 págs. 5730-5735). Se hace referencia a Rv3615c en el presente documento usando la anotación del genoma de *M. tuberculosis* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>, consultado el 14 de julio de 2011). En el genoma de *M. bovis*, se anota como Mb3645c (<http://genolist.pasteur.fr/BoviliList/>, consultado el 14 de 30 julio de 2011).

Dado el alto nivel de familiaridad y la extensa aplicación de la prueba cutánea de tuberculina por veterinarios y médicos, un formato de prueba cutánea de DIVA proporcionaría una valiosa plataforma de prueba adicional. Éste podría ser especialmente el caso en el que la logística de acceso a los recursos de laboratorio es problemática. Es 35 también notable que en los últimos años ha habido también un renovado interés en una prueba de DIVA basada en una prueba cutánea para la tuberculosis humana, demostrando varios informes el potencial de prueba cutánea de ESAT-6 (Aggerbeck & Madsen (2006) Tuberculosis (Edinb.) vol. 86 págs. 363-73; Arend y col. (2000) J. Infect. Dis. vol. 181 págs. 1850-4; Wu et al. (2008) Clin. Exp. Immunol. vol. 152 págs. 81-7). Por consiguiente, la presente invención aborda el problema de proporcionar reactivos de diagnóstico discriminatorios para la detección de 40 infecciones por micobacterias, especialmente en un formato de prueba cutánea DIVA.

Resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un reactivo de diagnóstico que consiste en la 45 secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma, o un reactivo de diagnóstico que comprende un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma y que consiste en 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos, en el que la variante es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan, caracterizado por que el reactivo desencadena un resultado de ensayo de diagnóstico negativo cuando se realiza un ensayo de 50 infección por tuberculosis en una muestra de un animal que ha sido vacunado contra una infección por un agente de la tuberculosis. Este polipéptido desencadena un resultado positivo al usarse en un ensayo para determinar si un animal tiene una infección por tuberculosis o ha estado expuesto a un agente de la tuberculosis. Ventajosamente, el reactivo de diagnóstico puede permitir a un usuario diferenciar entre un animal que tiene una infección por tuberculosis y uno que ha sido vacunado contra una infección de este tipo, como se desvela en el presente 55 documento por primera vez y como se explicará en más detalle a continuación. También se obtiene un resultado negativo cuando el animal no está vacunado o no está infectado (o no ha estado expuesto a un agente de la tuberculosis). El animal puede ser un mamífero, por ejemplo, una vaca, teñón o un ser humano.

El reactivo de diagnóstico puede comprender adicionalmente un polipéptido que comprende una secuencia

aminoacídica SEQ ID NO: 8 o una variante funcional de la misma. El polipéptido puede ser un polipéptido que no es Rv3020c de longitud completa. Por ejemplo, puede comprender entre 15-65 aminoácidos, por ejemplo, entre 15-60 aminoácidos, 15-50 aminoácidos, 15-40 aminoácidos y puede comprender, por ejemplo, al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos. Este polipéptido también desencadena un resultado positivo al usarse en un ensayo para determinar si un animal tiene una infección por tuberculosis o ha estado expuesto a un agente de la tuberculosis. De nuevo, el reactivo de diagnóstico puede permitir a un usuario diferenciar entre un animal que tiene una infección por tuberculosis y uno que ha sido vacunado contra una infección de este tipo. Por lo tanto, el reactivo está caracterizado por que el reactivo desencadena un resultado de ensayo de diagnóstico negativo cuando se realiza un ensayo de infección por tuberculosis en una muestra de un animal que ha sido vacunado contra una infección por un agente de la tuberculosis. También se obtiene un resultado negativo cuando el animal no está vacunado o no está infectado (o no ha estado expuesto a un agente de la tuberculosis).

Ninguno de los polipéptidos Rv2346c, Rv1793 o Rv3020c se ha identificado previamente como útil para diferenciar entre animales infectados por tuberculosis y vacunados.

Opcional o adicionalmente, el reactivo de diagnóstico puede comprender adicionalmente al menos un polipéptido, comprendiendo cada uno al menos una de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 o 10 o variantes funcionales de las mismas.

En una realización, el reactivo de diagnóstico puede comprender todas las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1-9. Puede estar en forma de polipéptidos individuales, teniendo cada uno una secuencia aminoacídica seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1-9, puede ser una o más proteínas de fusión, comprendiendo cada una dos o más de las SEQ ID NO: 1-9. Estas secuencias se incluyeron en el agrupamiento peptídico Sec#1 descrito en el presente documento y mostrado en la Tabla 3 a continuación.

La expresión "infección por tuberculosis", como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva, indica una infección en la que el agente causante es una *Mycobacterium*, por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, y/o *M. africanum*. En algunos casos, la infección puede ser el resultado de una exposición a una combinación de estas especies bacterianas. Asimismo, la expresión "agente de la tuberculosis" indica un organismo capaz de causar síntomas tuberculosos, típicamente una *Mycobacterium*, por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, y/o *M. africanum*.

Una vacuna que puede administrarse a un animal para vacunarlo contra una infección por tuberculosis incluye la vacuna con BCG.

El reactivo de diagnóstico puede comprender adicionalmente un polipéptido que comprende al menos una de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 50-69 o una variante funcional de las mismas. Estas secuencias se incluyeron en los agrupamientos peptídicos n.º 11 y n.º 14 descritos en el presente documento y mostrados en la Tabla 2 a continuación. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico puede comprender las SEQ ID NO: 7 y 50-59 y/o las SEQ ID NO: 8 y 60-69.

En algunas realizaciones, el reactivo de diagnóstico puede comprender adicionalmente al menos un polipéptido, comprendiendo cada uno al menos una de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 11-49 o variantes funcionales de las mismas. A modo de ejemplo no limitante, el reactivo de diagnóstico puede comprender los polipéptidos que tienen las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 11, 18, 22, 30 y 45, o puede comprender los polipéptidos que tienen las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 13, 15, 24, 46; en otras palabras, el reactivo de diagnóstico puede comprender cualquier combinación de polipéptidos que tienen cada uno una secuencia aminoacídica seleccionada libremente de entre las indicadas por las SEQ ID NO: 11-49.

Las secuencias SEQ ID NO: 11-21 son péptidos que son fragmentos de ESAT-6. Las secuencias SEQ ID NO: 22-31 son péptidos que son fragmentos de CFP-10. Las secuencias SEQ ID NO: 32-43 son péptidos que son fragmentos de Rv3615c. Estas secuencias se analizan en la solicitud pendiente junto con la presente n.º PCT/GB2011/050843. Las SEQ ID NO: 44, 45 y 46 son ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c de longitud completa, respectivamente. La SEQ ID NO: 47 es la proteína MPB83, SEQ ID NO: 48 es un fragmento de MPB83 y la SEQ ID NO: 49 es la proteína MPB70.

En una realización, el reactivo de diagnóstico puede comprender las SEQ ID NO: 7, 11-42 y 50-59. Como alternativa, o adicionalmente, el reactivo de diagnóstico puede comprender las SEQ ID NO: 8, 11-42 y 60-69.

El reactivo de diagnóstico puede comprender secuencias peptídicas individuales, o puede comprender una o más

proteínas de fusión, comprendiendo cada una al menos dos secuencias aminoacídicas seleccionadas de entre las SEQ ID NO: 1-69, preferiblemente, comprendiendo al menos una de las SEQ ID NO: 7 u 8.

El reactivo de diagnóstico puede ser para su uso en un método de detección de una infección por tuberculosis en un mamífero, o para detectar la exposición de un animal a un agente de la tuberculosis. Ventajosamente, el método se 5 capaz de confirmar tal infección o exposición, como diferenciada de la vacunación. El método puede ser una prueba cutánea tal como una prueba del pliegue caudal (CFT), una prueba intradérmica simple (SIT) o una prueba cervical comparativa intradérmica simple (SICCT). Se obtiene un resultado positivo cuando el animal está infectado con (o ha estado expuesto a) un agente de la tuberculosis, y se obtiene un resultado negativo si el animal no está ni infectado 10 ni expuesto, incluso si el animal ha sido vacunado contra infección por un agente de la tuberculosis.

En algunas realizaciones, por ejemplo, para su uso en una prueba cutánea, el reactivo de diagnóstico puede estar en forma de una preparación inyectable estéril que puede ser una suspensión acuosa u oleaginosa, o una suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. La suspensión acuosa puede 15 prepararse, por ejemplo, en manitol, agua, solución de Ringer o una solución de cloruro sódico isotónica. Como alternativa, puede prepararse en una solución salina tamponada con fosfato. La suspensión oleaginosa puede prepararse en un monoglicérido sintético, un diglicérido sintético, un ácido graso o un aceite farmacéuticamente aceptable natural. El ácido graso puede ser un ácido oleico o un derivado de glicérido de ácido oleico. El aceite farmacéuticamente aceptable natural puede ser un aceite de oliva, un aceite de ricino, o un aceite de oliva 20 polioxielilado o aceite de ricino polioxielilado. La suspensión oleaginosa puede contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, por ejemplo, Ph. Helv.

Por lo tanto, de acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar una infección por tuberculosis en un animal, o la exposición del animal a un agente de la tuberculosis, que comprende 25 las etapas de

- (i) poner en contacto *in vitro* una población de células del animal con al menos un reactivo de diagnóstico como se define en el primer aspecto de la invención; y
- (ii) determinar si las células de dicha población reconocen el reactivo de diagnóstico.

30 Tal método es un "ensayo de infección por tuberculosis", como se ha hecho referencia anteriormente y se describe en el presente documento. La población de células puede incluir linfocitos T. El reconocimiento del reactivo de diagnóstico por dichas células puede ser, por ejemplo, por medio de la unión de un receptor de linfocitos T al reactivo de diagnóstico, por ejemplo, la unión del receptor de linfocitos T al menos a un polipéptido incluido en el 35 reactivo de diagnóstico. El método puede comprender un ensayo de inmunidad mediada por células (CMI), que puede detectar interferón gamma (IFN- γ) como se describe en el presente documento.

De acuerdo con un aspecto relacionado de la invención, se proporciona un método para detectar una infección por tuberculosis en un animal, o una exposición de un animal a un agente de la tuberculosis, que comprende realizar 40 una prueba cutánea en el animal usando al menos un reactivo de diagnóstico de acuerdo con el primer aspecto de la invención. También se considera que es un "ensayo de infección por tuberculosis" como se ha hecho referencia anteriormente. "Usando" y el "uso" de polipéptidos y reactivos de diagnóstico en la prueba cutánea incluidos en el método implican típicamente una infección intradérmica del uno o más polipéptidos y/o el reactivo de diagnóstico en el animal. La prueba cutánea puede ser una prueba CFT, SIT o SICCT, como se describe en la Office International 45 des Epizooties (OIE) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (ISBN-10:92-9044-718-4; http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_summry.htm, consultada el 14 de julio de 2011). El manual proporciona información, definiciones y directrices sobre los criterios de pruebas positivas.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden servir para detectar una infección por *M. bovis* o 50 *M. tuberculosis* en un animal, por ejemplo (pero sin limitación), un mamífero, tal como una vaca, tejón o ser humano. Ventajosamente, puesto que los reactivos de diagnóstico son capaces de diferenciar entre un animal infectado y un animal vacunado, el usuario puede estar seguro de que un resultado positivo del método es un positivo verdadero que indica infección, en lugar de un falso positivo resultante de la previa vacunación del animal. Por lo tanto, los métodos es este aspecto de la invención proporcionan un método para detectar una infección por tuberculosis en un 55 animal, o una exposición de un animal a un agente de la tuberculosis, que comprende realizar una prueba cutánea en el animal usando al menos un reactivo de diagnóstico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, donde el uso del método en un animal que se ha vacunado contra una infección por un agente de la tuberculosis da como resultado la obtención de una prueba cutánea negativa, y el uso del método en un animal infectado con un agente de la tuberculosis da como resultado la obtención de una prueba cutánea positiva.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico de acuerdo con el primer aspecto de la invención. El kit de diagnóstico puede servir para su uso en uno o más métodos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. Particularmente, cuando el kit es para su uso en un método de prueba cutánea, el reactivo de diagnóstico puede estar en forma líquida, como se ha escrito anteriormente, o puede estar en forma sólida (por ejemplo, liofilizado). Puede incluirse en el kit en forma de al menos una alícuota de 0,05-0,15 ml que contiene 1-15 µg de cada polipéptido contenido en el reactivo de diagnóstico. Por ejemplo, el kit puede comprender alícuotas de aproximadamente 0,05 ml, aproximadamente 0,06 ml, aproximadamente 0,07 ml, aproximadamente 0,08 ml, aproximadamente 0,09 ml, aproximadamente 0,1 ml, aproximadamente 0,11 ml, aproximadamente 0,12 ml, aproximadamente 0,13 ml, aproximadamente 0,14 ml o aproximadamente 0,15 ml, que contenían 1-15 µg, 3-12 µg, 5-10 µg de cada proteína, por ejemplo, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 6 µg, aproximadamente 7 µg, aproximadamente 8 µg, aproximadamente 9 µg o aproximadamente 10 µg de cada polipéptido. Cada alícuota puede contenerse en un dispositivo de inyección desechable. El kit puede comprender adicionalmente al menos una muestra de PPD. El reactivo de diagnóstico es capaz de detectar una infección por tuberculosis en un animal, o una exposición de un animal a un agente de la tuberculosis, por ejemplo, puede ser capaz de detectar una infección por o una exposición a *M. bovis* o *M. tuberculosis*. Particularmente, cuando el reactivo de diagnóstico comprende una o más de las SEQ ID NO: 1-9 y/o 50-69, permite a un usuario diferenciar entre un animal infectado con tuberculosis y un animal que ha sido vacunado contra una infección por tuberculosis, mediante métodos tales como se describe en el presente documento. Como se ha mencionado anteriormente, esto permite al usuario basarse en resultados de pruebas positivas al usar el reactivo de diagnóstico como una indicación de infección por tuberculosis en lugar de vacunación.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido (que puede aislarse) que consiste en la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 7, o que consiste en una variante de la misma que es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan. El polipéptido puede tener adicionalmente hasta 10 aminoácidos añadidos al extremo N o C. Dicho polipéptido puede formar un componente de un reactivo de diagnóstico de acuerdo con el primer aspecto de la invención. La expresión "variante funcional" indica un polipéptido en el que la secuencia aminoacídica difiere de la secuencia base a partir de la cual se deriva en que uno o más aminoácidos en la secuencia están sustituidos por otros aminoácidos. La variante es una variante funcional porque las características funcionales del polipéptido del que se obtiene la variante se mantienen. Por ejemplo, se desencadena una respuesta inmunitaria similar por la exposición de un animal, o una muestra de un animal, al polipéptido variante en comparación con la no variante. En particular, cualquier sustitución, adición o eliminación 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 experto en la técnica es capaz de determinar fácilmente variantes funcionales apropiadas sin la aplicación de habilidades inventivas.

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 el que las clases se definen como se indica a continuación:

<u>Clase</u>	<u>Ejemplos de aminoácidos</u>
No polar:	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polar no cargado:	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácido:	Asp, Glu
Básico:	Lys, Arg, His.

Como se conoce bien conocido por los expertos en la técnica, 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

Como se ha mencionado 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. En particular, la adición o eliminación de un pequeño número (por

ejemplo, hasta aproximadamente 10, o hasta aproximadamente 5, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5) de aminoácidos en el extremo N o C de un polipéptido puede no afectar adversamente a la inmunogenicidad del péptido y dichas variantes para una secuencia aminoacídica se contemplan particularmente como incluidas dentro del término "variante" o "variante funcional" de un polipéptido.

5 En términos generales, serán posibles menos sustituciones no conservativas sin alterar la actividad biológica del polipéptido. De forma adecuada, las variantes pueden ser al menos aproximadamente un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o aproximadamente un 99 % idénticas a la secuencia base, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan.

10 La identidad de secuencia entre secuencias aminoacídicas puede determinarse mediante comparación de un alineamiento de las secuencias. Cuando está ocupada una posición equivalente en las secuencias comparadas por el mismo aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Puntuar un alineamiento como porcentaje de identidad va en función del número de aminoácidos idénticos en posiciones compartidas por las
15 secuencias comparadas. Cuando se comparan secuencias, los alineamientos óptimos pueden requerir introducir huecos en una o más de las secuencias para tener en cuenta posibles inserciones y deleciones en las secuencias. Los métodos de comparación de secuencias pueden emplear penalizaciones de hueco de manera 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
20 mayor puntuación que aquel con muchos huecos. El cálculo de la identidad porcentual máxima implica la producción de un alineamiento óptimo teniendo en cuenta las penalizaciones de hueco. El porcentaje de la identidad de secuencia puede determinarse usando el software BLASTP, disponible públicamente en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (consultado el 14 de julio de 2011), usando una configuración de parámetros por defecto. La comparación debe determinarse para la secuencia de longitud completa del polipéptido, para evitar
25 una alta identidad de secuencia sobre un fragmento corto del polipéptido.

La invención también incluye proteínas de fusión que comprenden el polipéptido de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención y una o más de la SEQ ID NO: 1-6, 8-10 y/o 50-69. Las proteínas de antígeno de longitud completa enumeradas en la Tabla 3 pueden excluirse (por ejemplo, Rv1038c, Rv1197, Rv1792, etc.).

30 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido (que puede aislarse) que consiste en la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 7 o que consiste en una variante de la misma que es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan. El polipéptido puede tener adicionalmente hasta 10
35 aminoácidos añadidos al extremo N o C. El ácido nucleico forma parte de un vector y también se proporciona una célula transformada con tal vector.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprender" y "contener" y variaciones de las palabras, por ejemplo, "que comprende" y "comprende", significan "incluyendo, pero
40 sin limitación", y no excluyen otros restos, actividades, componentes, números enteros o etapas. A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular incluye el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, se entenderá que la memoria descriptiva contempla la pluralidad, así como la singularidad, a menos que el contexto requiera otra cosa.

45 Las características de cada aspecto de la invención pueden ser como se describe en relación con cualquiera de los demás aspectos.

Otras características de la presente invención se harán evidentes a partir de los siguientes ejemplos. En términos generales, la invención se extiende a cualquier característica novedosa, o cualquier combinación novedosa, de las
50 características desveladas en esta memoria descriptiva (incluyendo las reivindicaciones y dibujos adjuntos). Por lo tanto, las funciones, números enteros, características, compuestos o restos químicos que se describen junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención se entenderán como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento, a menos que sea incompatible con el mismo.

55 Además, a menos que se indique otra cosa, cualquiera característica desvelada en el presente documento puede reemplazarse por una característica alternativa que sirva para el mismo fin o similar.

Breve descripción de las figuras

Ahora se describirán los ejemplos no limitantes particulares de la presente invención con referencia a las siguientes figuras, en las que:

- 5 La figura 1 muestra la frecuencia de respuesta de 23 animales reactivos a TB (TB) y 8 animales vacunados con BCG (BCG) a los agrupamientos peptídicos de secretoma reconocidos con más frecuencia; la figura 2 muestra las frecuencias de respuesta de 22 animales reactivos a TAMBIÉN (barras de color blanco) y 23 animales vacunados con BCG (barras de color negro) a péptidos de secretoma individuales (*indica los péptidos seleccionados para inclusión en el agrupamiento peptídico Sec#1);
- 10 la figura 3 (A) muestra la frecuencia de respuesta de 22 animales reactivos a TB y 21 animales vacunados con BCG al agrupamiento peptídico Sec#1 ($p < 0,05$, prueba exacta de Fisher) y la figura 3 (B) muestra respuestas IFN- γ (ΔOD_{450}) de 8 animales reactivos a TB y 3 animales vacunados con BCG tanto a los agrupamientos peptídicos Sec#1 y Sec#2, representando la línea horizontal discontinua el corte para una respuesta positiva;
- 15 la figura 4 muestra respuestas de prueba cutánea a cócteles peptídicos en ganado expuesto de forma natural a infección por *M. bovis*; y la figura 5 muestra respuestas de prueba cutánea de un cóctel peptídico de referencia que contiene péptidos de ESAT6, CFP10 y Rv3615c en solitario o en combinación con un cóctel peptídico de Rv2346c
- 20 (agrupamiento peptídico n.º 11) o Rv3020c (agrupamiento peptídico n.º 14) (significación entre los grupos determinada por ANOVA con medidas repetidas, * $p < 0,05$), en ganado expuesto de forma natural a infección por *M. bovis*.

Ejemplos

25 Materiales y métodos

Ganado

30 Todos los animales se mantuvieron en la Veterinary Laboratories Agency en el momento de la toma de muestras sanguíneas y los procedimientos se realizaron dentro de los límites de una Licencia del Ministerio del Interior de Reino Unido en virtud de la Ley sobre procedimientos científicos en los que se utilizan animales de 1986, que se aprobó por el comité de revisión de ética local. Se usaron los siguientes grupos de animales en este estudio:

35 (i) Reactores a tuberculosis (reactores a TB)

Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada de reactivos positivos a SICCT infectados de forma natural de rebaños que se sabía que tenían tuberculosis bovina (TBB) según se determinó por la Animal Health Agency. También se obtuvieron muestras de sangre heparinizada de 4 animales que se infectaron experimentalmente aprox.

40 6 meses con una cepa de campo de *M. bovis* de Gran Bretaña (AF 2122/97) por instilación intratraqueal de 1×10^3 UFC como se ha descrito previamente (Dean y col. (2005) Infect. Immun. vol. 73 págs. 6467-6471). Un examen *post mortem* detallado de 36 animales reactivos a TB reveló lesiones por TB visibles en todos menos cuatro animales, confirmando la presencia de enfermedad activa.

45 (ii) Vacunados con BCG

Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada de animales vacunados con BCG como se ha descrito previamente (Vordermeier y col. (1999) Clin. Diagn. Lab. Immunol. vol. 6 págs. 675-682). En resumen, los terneros (aprox. 6 meses de edad) de rebaños sin TBB se vacunaron con BCG Pasteur por inyección subcutánea de 1×10^6 UFC en

50 el lateral del cuello.

Producción y preparación de péptidos y antígenos

Se seleccionaron 119 proteínas secretadas, o potencialmente secretadas, de *Mycobacterium bovis* para el cribado de antígenos como se ha descrito previamente (Jones y col. (2010) Infect. Immun. vol. 78 págs. 1326-1332). Los péptidos se sintetizaron (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania) en agrupamientos de 20-mers solapando 12 aminoácidos para cada uno de los genes de interés. En total, se evaluaron 379 agrupamientos peptídicos que contenían un total de 4129 péptidos. Estos agrupamientos peptídicos se disolvieron en RPMI 1640 (Gibco, Reino Unido) que contenía sulfóxido de dimetilo al 20 % (DMSO) para obtener una concentración de

1 mg/ml/péptido, y los agrupamientos peptídicos se usaron para estimular sangre entera a una concentración final de 5 µg/ml/péptido. Los péptidos que comprendían los agrupamientos para algunos antígenos se sintetizaron individualmente (Mimotopes Pty Ltd, Clayton, Australia), se disolvieron en RPMI 1640 que contenía DMSO al 20 % para obtener una concentración de 5 mg/ml y se usaron individualmente para estimular sangre entera a una concentración final de 10 µg/ml, o se formularon en agrupamientos peptídicos adicionales a una concentración de 10 µg/ml/péptido. Los péptidos de ESAT-6 y CFP-10 se formularon para obtener un cóctel peptídico como se ha descrito previamente (Vordermeier y col. (2001) Clin. Diagn. Lab. Immunol. vol. 8 págs. 571-578) y se usaron a una concentración final de 5 µg/ml/péptido. Este cóctel peptídico se usó como un "estándar de oro" con el que comparar las inmunogenicidades de los demás antígenos.

10

Se suministró tuberculina bovina (PPD-B) por la Tuberculin Production Unit en la Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Surrey, Reino Unido, y se usó a una concentración final de 1 µg/ml. Se incluyó una enterotoxina B estafilocócica (SEB; Sigma-Aldrich, Reino Unido) como un control positivo a una concentración final de 1 µg/ml, mientras que la sangre entera se incubó con RPMI 1640 en solitario como un control negativo.

15

Ensayo inmunoabsorbente ligando a enzimas (ELISA) de IFN-γ

Se añadieron alícuotas de sangre entera (250 µl) por duplicado a antígeno en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante 24 horas, después de lo cual se recogieron los sobrenadantes plasmáticos y se almacenaron a -80 °C hasta que se necesitaron. La cuantificación de IFN-γ en los sobrenadantes plasmáticos se determinó usando el kit Bovigam ELISA (Prionics AG, Suiza). Un resultado se consideró positivo si la densidad óptica a 450 nm (DO₄₅₀) con el antígeno menos la DO₄₅₀ sin el antígeno (ΔDO₄₅₀) era ≥0,1 en ambos de los pocillos duplicados.

25 *Evaluación de prueba cutánea de Rv2346c (agrupamiento peptídico n.º 11) o Rv3020c (agrupamiento peptídico n.º 14)*

La evaluación de prueba cutánea de los antígenos proteicos y peptídicos definidos se realizó en ganado expuesto de forma natural a infección por *M. bovis* (n = 17). Este ganado se incluyó como resultado de proporcionar repuestas positivas a la prueba cutánea de tuberculina comparativa cervical intradérmica simple (SICCT) durante operaciones de vigilancia en el terreno habituales.

Los antígenos se administraron en 8 sitios por animal (4 en cada lado del cuello). Los antígenos se administraron en un volumen de 100 µl. Todos los cócteles de antígenos proteicos o peptídicos definidos se administraron a una concentración de 5 µg/ml por componente de cóctel. El espesor de la piel se midió en el sitio de inyección inmediatamente antes de la administración intradérmica del antígeno. El espesor de la piel en el sitio de inyección se midió de nuevo 72 horas después de la administración del antígeno, y se determinó el aumento del espesor de la piel en este tiempo. Este método también es adecuado para determinar la reacción en ganado no infectado con *M. bovis*, ya esté vacunado o sin vacunar contra tal infección.

40

Los antígenos proteicos recombinantes purificados se suministraron por Lionex GmbH. La composición del cóctel de ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c era SEQ ID NO: 11-43. Se usó una combinación de 11 péptidos que proporcionaban un solapamiento de la secuencia completa para cada uno de los antígenos Rv3020c y Rv2346c, como se enumera en la Tabla 2 a continuación (las SEQ ID NO: 7 y 50-59 proporcionan un solapamiento de la secuencia completa para Rv2346c y las SEQ ID NO: 8 y 60-69 proporcionan un solapamiento de la secuencia completa para Rv3020c). Los cócteles Rv3020c y Rv2346c (es decir, los agrupamientos peptídicos n.º 14 y n.º 11, respectivamente, como se muestra en la Tabla 2) se ensayaron individualmente y en combinación con un cóctel que contenía los péptidos solapantes de ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c (es decir, las SEQ ID NO: 11-43), que por su parte es el objeto de la solicitud de patente pendiente junto con la presente PCT/GB2011/050843.

50

Resultados

Para probar la hipótesis de que las proteínas secretadas por *M. bovis* es probable que contengan antígenos inmunógenos que pueden usarse para aumentar la especificidad de las pruebas diagnósticas, se cribaron 379 agrupamientos de péptidos solapantes (4129 péptidos en total que representaban 119 antígenos) para comprobar su capacidad para estimular una respuesta a IFN-γ *in vitro* usando sangre entera tanto de animales reactivos a TB (n = 23) como animales vacunados con BCG (n = 8). Como se esperaba, todos los animales reactivos a TB y los animales vacunados con BCG respondieron a PPD-B y al antígeno de control positivo SEB, mientras que 22

- animales reactores de TB (96 %) y 2 animales vacunados con BCG (25 %) respondieron al cóctel peptídico ESAT-6/CFP-10 (datos no mostrados). De los 379 agrupamientos peptídicos, aproximadamente la mitad (n = 184) no indujeron IFN- γ en ninguno de los animales reactores a TB ni vacunados con BCG. Para los 195 agrupamientos peptídicos restantes, se reconocieron 163 y 77 por los animales reactores a TB y los animales vacunados con BCG respectivamente, reconociéndose 45 por ambos grupos de animales (Tabla 1). De forma alentadora, con respecto a los reactores de diagnóstico diferenciales, se reconocieron 118 agrupamientos peptídicos diferentes por los animales reactores a TB pero no se indujo ninguna respuesta a IFN- γ en ninguno de los animales vacunados con BCG estudiados.
- 10 Se apreció una jerarquía de respuestas a diferentes agrupamientos peptídicos, con frecuencias de respuesta que variaban del 4 % al 65 % en los animales reactores a TB, y del 13 % al 38 % en los animales vacunados con BCG (Tabla 1).

Tabla 1: Reconocimiento de los agrupamientos peptídicos de antígenos secretados.

	Número de agrupamientos peptídicos reconocidos (%)		Número de agrupamientos peptídicos no reconocidos (%)	
	Reactores a TAMBIÉN	Vacunados con BCG	Reactores a TAMBIÉN	Vacunados con BCG
Todos los agrupamientos peptídicos (379 en total)	163 (43 %)	77 (20 %)	216 (57 %)	302 (80 %)
Agrupamientos de reactores a TB (163 en total)	163 (100 %)	45 (28 %)	N.A.	118 (72 %)

- 15 La figura 1 detalla las frecuencias de respuesta para los 8 agrupamientos peptídicos reconocidos con más frecuencia, es decir, aquellos que indujeron una respuesta a IFN- γ en más de la mitad de los animales reactores a TB estudiados. Sorprendentemente, todos menos un agrupamiento peptídico (n.º 30-2) representaron antígenos que pertenecían a la familia de proteínas ESAT-6. De manera interesante, los agrupamientos peptídicos n.º 11 y n.º 14 no se reconocieron por ninguno de los animales vacunados con BCG, lo que sugería que contenían péptidos con aplicación potencial como reactivos DIVA. Los péptidos incluidos en estos agrupamientos se indican en la Tabla 2.
- 20

Tabla 2: Secuencias de los agrupamientos peptídicos n.º 11 y n.º 14.

Secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
<i>Agrupamiento peptídico n.º 11 (agrupamiento Rv2346c)</i>		<i>Agrupamiento peptídico n.º 14 (agrupamiento Rv3020c)</i>	
MTINYQFGDVEDAHGAMIRAQ	50	MSLLDAHIPQLIASHTAFAA	60
DVEDAHGAMIRAQAGLLEAEH	51	PQLIASHTAFAAKAGLMRHT	61
IRAQAGLLEAEHQAIVRDVL	52	AFAAKAGLMRHTIGQAEQQA	62
EAEHQAIVRDVLAAGDFWGG	53	MRHTIGQAEQQAMSAQAFHQ	63
RDVLAAGDFWGGAGSVACQE	7	EQQAMSAQAFHQGESAAAFQ	64
FWGGAGSVACQEFITQLGRN	54	AFHQGESAAAFQGAHARFVA	65
ACQEFITQLGRNFQVIYEQA	55	AAFQGAHARFVAAAAKVNTL	66
LGRNFQVIYEQANAHGQKVQ	56	RFVAAAAKVNTLLDIAQANL	67
YEQANAHGQKVQAAGNNMAQ	57	VNTLLDIAQANLGEAAGTYV	68
QKVQAAGNNMAQTDSAVGSS	58	QANLGEAAGTYVAADAAAAS	8
VQAAGNNMAQTDSAVGSSWA	59	EAAGTYVAADAAAASSYTGF	69

- 25 Aunque 6 de los 8 agrupamientos peptídicos reconocidos con más frecuencia indujeron una respuesta a IFN- γ en algunos animales vacunados con BCG, los inventores razonaron a continuación que una investigación al mínimo detalle de la inmunogenicidad de los componentes de estos agrupamientos puede revelar péptidos individuales adicionales con uso potencial como reactivos DIVA. Para este fin, los péptidos solapantes contenidos en estos agrupamientos peptídicos se cribaron individualmente para determinar su capacidad para inducir la producción de IFN- γ tanto en animales reactores a TB (n = 22) como vacunados con BCG (n = 23). En estos experimentos, 19 animales reactores a TB (86 %) pero ningún animal vacunado con BCG (0 %) respondieron al cóctel peptídico (datos no mostrados). Se identificaron cincuenta y tres péptidos individuales como inmunógenos en animales reactores a TB, con frecuencias de respuesta que variaban del 5 % al 50 % (figura 2). De estos péptidos, seis (péptidos n.º 17, n.º 32, n.º 48, n.º 58, n.º 67 y n.º 69) también indujeron respuestas a IFN- γ en animales vacunados con BCG con frecuencias de respuesta que variaban del 4 % al 17 % (figura 2).
- 30
- 35

Con el fin de evaluar si una combinación de péptidos individuales de diferentes antígenos de secretoma es suficiente

para inducir diferencialmente una respuesta a IFN- γ en animales reactivos a TB, se construyó un agrupamiento peptídico (Sec#1) que consistía en 10 péptidos. En primer lugar, se seleccionaron los péptidos n.º 42 y n.º 55 (SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente) ya que eran los dos péptidos reconocidos con más frecuencia (frecuencias de respuesta del 50 % y del 36 % respectivamente) y también porque pertenecían a agrupamientos peptídicos no reconocidos por los animales vacunados con BCG (agrupamientos n.º 11 y n.º 14 respectivamente, Figura 1). A continuación, se seleccionaron cuatro péptidos adicionales (péptidos n.º 20, n.º 29, n.º 33 y n.º 64) ya que se reconoció en los animales reactivos a TAMBIÉN que no pudieron responder a los péptidos n.º 42 o n.º 55 (datos no mostrados). Por último, se incluyeron cuatro péptidos más (péptidos n.º 16, n.º 19, n.º 25 y n.º 57) debido a su ubicación en regiones de homología entre múltiples proteínas ESAT-6 (véase la Tabla 3).

10

Tabla 3: Identificación de péptidos en los agrupamientos Sec#1 y Sec#2

Agrupamiento	Péptido	SEQ ID	Secuencia	Ubicado en los antígenos:
Sec#1	Pep#16	1	MWASAQNISGAGWSGMAEAT	Rv1038c, Rv1197, Rv1792, Rv2347c, Rv3620c
	Pep#19	2	MTQMNQAFRNIVNMLHGVRD	Rv1038c, Rv3620c
	Pep#20	3	RNIVNMLHGVRDGLVRDANN	Rv1038c, Rv1197, Rv1792, Rv2347c, Rv3620c
	Pep#25	4	MAQMNQAFRNIVNMLHGVRD	Rv1197, Rv2347c
	Pep#29	5	EAEHQAIIRDVLASDFWGG	Rv1198
	Pep#33	6	LGRNFQVIYEQANAHGQKQVQ	Rv1198, Rv2346c, Rv3619c, Rv1037c, Rv1793
	Pep#42	7	RDVLAAGDFWGGAGSVACQE	Rv2346c, Rv1793
	Pep#55	8	QANLGEAAGTYVAADAAAAS	Rv3020c
	Pep#57	9	DVDAHGAMIRAQAGSLEAEH	Rv3619c, Rv1037c
	Pep#64	10	SAELPDWLAANRGLAPGGHA	Rv3803c
Sec#2	Como anteriormente pero omitiendo Pep#64			

Como se muestra en la figura 3A, la frecuencia de respuesta al agrupamiento peptídico Sec#1 fue significativamente mayor en animales reactivos a TB ($p < 0,05$, prueba exacta de Fisher), reconociendo 14 de 22 (64 %) animales reactivos a TB el agrupamiento peptídico en comparación con 6 de 21 (29 %) animales vacunados con BCG. Para optimizar el agrupamiento peptídico para su uso como reactivo DIVA, los componentes peptídicos individuales del agrupamiento peptídico Sec#1 se cribaron de nuevo para determinar su capacidad para inducir una respuesta a IFN- γ en los animales vacunados con BCG. Estos experimentos identificaron únicamente un único péptido (péptido n.º 64) como inmunógeno en algunos animales vacunados con BCG (datos no mostrados). Por lo tanto, se construyó un segundo agrupamiento peptídico (Sec#2) que carecía de este péptido, y la capacidad de tanto Sec#1 como Sec#2 para inducir IFN- γ se comparó tanto en los animales reactivos a TB ($n = 8$) como en los animales vacunados con BCG ($n = 3$) que habían demostrado previamente reconocer el anterior agrupamiento peptídico. La omisión del péptido #64 del agrupamiento apenas tuvo efecto sobre la frecuencia de respuesta para los animales reactivos a TB, produciendo aún 7 de los 8 animales IFN- γ por enzima del corte (figura 3B). En total, 7 de 13 (54 %) animales reactivos a TB produjeron IFN- γ en respuesta a Sec#2 (datos no mostrados). Por el contrario, la eliminación del péptido #64 anuló completamente la respuesta en todos los animales vacunados con BCG ensayados (figura 3B).

Los datos de la prueba cutánea se muestran en la figura 4. Un animal no pudo inducir una reacción cutánea en la prueba cutánea de tuberculina comparativa y, de forma similar, este mismo animal no proporcionó ninguna respuesta de la prueba cutánea a ninguna de las combinaciones de antígeno definidas. La adición del cóctel de péptidos de Rv3020c (SEQ ID NO: 8 y 60-69) al cóctel de referencia que contenía péptidos de ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c (SEQ ID NOs: 11-43) demostró respuestas significativamente más fuertes que el cóctel de referencia en solitario, véase la figura 5.

35 Análisis

Los resultados presentados en el presente documento tenían una importancia significativa con respecto al desarrollo de reactivos DIVA. El cribado de 119 proteínas secretadas, o potencialmente secretadas, por *M. bovis* reveló tres agrupamientos peptídicos únicos que se reconocieron con frecuencia por ganado infectado por *M. bovis* pero no se pudo inducir una respuesta a IFN- γ en ninguno de los animales vacunados con BCG estudiados. Dos de estos

agrupamientos peptídicos consistían en péptidos solapantes que representaban la secuencia aminoacídica completa para dos antígenos individuales, Rv2346c y Rv3020c, mientras que el tercero (Sec#2) consistía en un cóctel de 9 péptidos obtenidos de múltiples antígenos.

- 5 El mecanismo subyacente para el reconocimiento diferencial de Rv2346c y Rv3020c sigue sin estar claro. En primer lugar, ambos genes se localizan en los genomas de *M. bovis* (cepa AF2122/97) y, de forma más importante, en el BCG Pasteur (cepa 1173P2), que se usó para inmunizar el ganado. En segundo lugar, el análisis del genoma reveló secuencias aminoacídicas idénticas de las dos proteínas entre las dos cepas. Por lo tanto, la falta de respuestas inmunitarias a Rv2346c y Rv3020c observada en los animales vacunados con BCG es improbable que se explique por las delecciones o alteraciones de las secuencias aminoacídicas en estas dos proteínas en la cepa BCG Pasteur usada para la vacuna.

- Es improbable que las respuestas de IFN- γ a un antígeno proteico individual sean suficientes para la detección de infección por *M. bovis* en el ganado. De hecho, la prueba QuantiFERON[®]-TB Gold para la infección por *M. tuberculosis* humana utiliza péptidos sintéticos de dos antígenos de *M. tuberculosis* diferentes (ESAT-6 y CFP-10). Con esto en mente, los inventores desarrollaron un cóctel (Sec#2) que contenía péptidos individuales aislados de diversos agrupamientos peptídicos que representaban los antígenos reconocidos con más frecuencia. De forma interesante, se descubrió que estos antígenos pertenecían a la familia de proteínas ESAT-6, destacando la inmunodominancia de estos antígenos. El cóctel Sec#2 contenía varios péptidos inmunodominantes con expresión restringida entre las proteínas ESAT-6; por ejemplo, el péptido n.º 55 se localiza únicamente en Rv3020c mientras que el péptido n.º 42 se localiza en Rv2346c y Rv1793 (Tabla 3). Sin embargo, dando el alto grado de similitud aminoacídica entre los miembros de la familia de proteínas de ESAT-6, varias de estas secuencias peptídicas representaban múltiples antígenos. Por ejemplo, los péptidos n.º 16 y n.º 20 se localizaron en Rv1038c, Rv1197, Rv1792, Rv2347c y Rv3620c, mientras que el péptido n.º 33 se localiza en Rv1198, Rv2346c, Rv3619c, Rv1037c y Rv1793. Por lo tanto, sin desear quedar ligado a la teoría, el direccionamiento de estas secuencias compartidas no sólo reduce el número de los diferentes componentes en el reactivo DIVA, sino que también puede explotar una potencial carga antigénica mayor para estas regiones.

- El cóctel peptídico de ESAT-6/CFP-10 usado en los estudios presentados en el presente documento se ha desarrollado como un reactivo DIVA en ganado, con sensibilidades notificadas de aproximadamente el 78 % en animales infectados por *M. bovis* (Sidders y col. (2008) Infect. Immun. vol. 76 págs. 3932-3939; Vordermeier y col. (2001) Clin. Diagn. Lab. Immunol. vol. 8 págs. 571-578). Por lo tanto, un área de investigación de alta importancia es la identificación de reactivos que puedan complementar el cóctel peptídico de ESAT-6/CFP-10 en el diagnóstico de la TB bovina.

- 35 Recientemente, los inventores han demostrado que 4 de los 7 (57 %) animales infectados por *M. bovis* que no pudieron reconocer el cóctel peptídico ESAT-6/CFP-10 prepararon una respuesta a IFN- γ para el antígeno Rv3615c, aumentando teóricamente la sensibilidad diagnóstica al 91 % sin comprometer la especificidad en los animales vacunados con BCG (Sidders y col. (2008) Infect. Immun. vol. 76 págs. 3932-3939). En el estudio actual, 5 de los 13 (38 %) animales reactivos a TB reconocieron Rv3615c (datos no mostrados), resultados similares a los indicados previamente (Sidders y col. (2008)). Los 5 animales reconocieron el cóctel peptídico Sec#2, que también indujo respuestas en dos animales más (frecuencia total de respuesta del 54 %), lo que sugiere que el cóctel peptídico Sec#2 puede ser tan bueno, si no mejor, en la complementación de ESAT-6/CFP-10 en el diagnóstico de TB bovina sin comprometer la especificidad en los animales vacunados con BCG.

- 45 Finalmente, los datos de pruebas cutáneas mostraron que los péptidos mejoraron la sensibilidad de la detección de las pruebas cutáneas de ganado infectado con *M.* al usar un cóctel de péptidos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c.

- 50 En resumen, los resultados de este estudio demuestran que los cócteles de péptidos sintéticos obtenidos a partir de antígenos secretados o potencialmente secretados tienen la capacidad de distinguir entre animales infectados por *M. bovis* y animales vacunados con BCG en ensayos de cribado basados en sangre.

LISTA DE SECUENCIAS

- 55 <110> The Secretary of State for Environment, Food and Rural Affairs acting through the Animal Health and Veterinary Laboratories Agency Jones, Gareth J Vordermeier, Hanns M

<120> Reactivos de diagnóstico

<130> RT/P1821GB00

<150> GB1012072.3
<151> 19-07-2010

5

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

15

<400> 1

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

Ala Glu Ala Thr
20

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

20

<400> 2

25

<400> 2

Met	Thr	Gln	Met	Asn	Gln	Ala	Phe	Arg	Asn	Ile	Val	Asn	Met	Leu	His
1				5					10					15	

Gly Val Arg Asp
20

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

30

<400> 3

Arg	Asn	Ile	Val	Asn	Met	Leu	His	Gly	Val	Arg	Asp	Gly	Leu	Val	Arg
1				5					10					15	

Asp Ala Asn Asn
20

35

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

40

<400> 4

ES 2 600 907 T3

Met Ala Gln Met Asn Gln Ala Phe Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His
1 5 10 15

Gly Val Arg Asp
20

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

5

<400> 5

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

Phe Trp Gly Gly
20

10

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

15

<400> 6

Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly
1 5 10 15

Gln Lys Val Gln
20

20

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

25

<400> 7

Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Val
1 5 10 15

Ala Cys Gln Glu
20

30

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

35

<400> 8

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

Ala Ala Ala Ser
20

ES 2 600 907 T3

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
5 <213> Mycobacterium bovis

<400> 9

Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Gly Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ala Glu His
20
10

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis
15

<400> 10

Ser Ala Glu Leu Pro Asp Trp Leu Ala Ala Asn Arg Gly Leu Ala Pro
1 5 10 15

Gly Gly His Ala
20
20

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis
25

<400> 11

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
1 5 10 15
30

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis
35

<400> 12

Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser
1 5 10 15
40

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis
45

<400> 13

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

<210> 14

ES 2 600 907 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

5 <400> 14

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

10 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 <400> 15

15 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
 1 5 10 15

20 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 16

25 Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln
 1 5 10 15

30 <210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 17

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu
 1 5 10 15

35 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 18

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

45 <210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 19

50 Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

ES 2 600 907 T3

<400> 20

Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly
 1 5 10 15

5 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

10 <400> 21

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

15 <210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

20 <400> 22

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

Asn Phe

25 <210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 23

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

35 <210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 24

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

Thr Ala

40 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 45 <213> Mycobacterium bovis

<400> 25

ES 2 600 907 T3

Ile Asp Gln Val Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 26

Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gln
 1 5 10 15

Ala Ala

<210> 27
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 27

Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Asn Lys

<210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 28

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

Glu Ile

<210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<400> 29

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

Val Gln Tyr Ser
 20

<210> 30
 <211> 18
 <212> PRT

ES 2 600 907 T3

<213> Mycobacterium bovis

<400> 30

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

5 Gln Gln

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Mycobacterium bovis

<400> 31

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

15

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

20

<400> 32

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

25

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

30

<400> 33

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

35

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

40

<400> 34

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

ES 2 600 907 T3

5 <210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

<400> 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
10

<210> 36
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis
15

<400> 36

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
20

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis
25

<400> 37

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
30

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis
35

<400> 38

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
40

<210> 39
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

ES 2 600 907 T3

<400> 39

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

5

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

10

<400> 40

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

15

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

20

<400> 41

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

25

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

30

<400> 42

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

35

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

<400> 43

ES 2 600 907 T3

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

Gly Leu Phe Tyr
20

<210> 44

<211> 95

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

<400> 44

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> 45

<211> 100

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

<400> 45

ES 2 600 907 T3

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

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

<210> 46
<211> 103
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

5

<400> 46

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

10

<210> 47
<211> 220

ES 2 600 907 T3

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

<400> 47

5

```

Met Ile Asn Val Gln Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Ser Leu Ala Ala
 1                               5                               10                               15

Ile Ala Ile Ala Phe Leu Ala Gly Cys Ser Ser Thr Lys Pro Val Ser
 20                               25                               30

Gln Asp Thr Ser Pro Lys Pro Ala Thr Ser Pro Ala Ala Pro Val Thr
 35                               40                               45

Thr Ala Ala Met Ala Asp Pro Ala Ala Asp Leu Ile Gly Arg Gly Cys
 50                               55                               60

Ala Gln Tyr Ala Ala Gln Asn Pro Thr Gly Pro Gly Ser Val Ala Gly
 65                               70                               75                               80

Met Ala Gln Asp Pro Val Ala Thr Ala Ala Ser Asn Asn Pro Met Leu
 85                               90                               95

Ser Thr Leu Thr Ser Ala Leu Ser Gly Lys Leu Asn Pro Asp Val Asn
 100                              105                              110

Leu Val Asp Thr Leu Asn Gly Gly Glu Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr
 115                              120                              125

Asn Ala Ala Phe Asp Lys Leu Pro Ala Ala Thr Ile Asp Gln Leu Lys
 130                              135                              140

Thr Asp Ala Lys Leu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Tyr His Val Ile Ala
 145                              150                              155                              160

Gly Gln Ala Ser Pro Ser Arg Ile Asp Gly Thr His Gln Thr Leu Gln
 165                              170                              175

Gly Ala Asp Leu Thr Val Ile Gly Ala Arg Asp Asp Leu Met Val Asn
 180                              185                              190

Asn Ala Gly Leu Val Cys Gly Gly Val His Thr Ala Asn Ala Thr Val
 195                              200                              205

Tyr Met Ile Asp Thr Val Leu Met Pro Pro Ala Gln
 210                              215                              220

```

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

10

ES 2 600 907 T3

<400> 48

Gly Leu Val Cys Gly Gly Val His Thr Ala Asn Ala Thr Val Tyr Met
1 5 10 15

Ile Asp Thr Val
20

5

<210> 49

<211> 193

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

10

<400> 49

Met Lys Val Lys Asn Thr Ile Ala Ala Thr Ser Phe Ala Ala Ala Gly
1 5 10 15

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

Leu Val Gly Pro Gly Cys Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Asn Pro Thr Gly
35 40 45

Pro Ala Ser Val Gln Gly Met Ser Gln Asp Pro Val Ala Val Ala Ala
50 55 60

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

Leu Asn Pro Gln Val Asn Leu Val Asp Thr Leu Asn Ser Gly Gln Tyr
85 90 95

Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Ala Ala Phe Ser Lys Leu Pro Ala Ser
100 105 110

Thr Ile Asp Glu Leu Lys Thr Asn Ser Ser Leu Leu Thr Ser Ile Leu
115 120 125

Thr Tyr His Val Val Ala Gly Gln Thr Ser Pro Ala Asn Val Val Gly
130 135 140

Thr Arg Gln Thr Leu Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Thr Gly Gln Gly
145 150 155 160

Asn Ser Leu Lys Val Gly Asn Ala Asp Val Val Cys Gly Gly Val Ser
165 170 175

Thr Ala Asn Ala Thr Val Tyr Met Ile Asp Ser Val Leu Met Pro Pro
180 185 190

ES 2 600 907 T3

Ala

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium bovis

<400> 50

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

Ile Arg Ala Gln
20

10

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

15

<400> 51

Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Gly Leu Leu
1 5 10 15

Glu Ala Glu His
20

20

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

25

<400> 52

Ile Arg Ala Gln Ala Gly Leu Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val
1 5 10 15

Arg Asp Val Leu
20

30

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> Mycobacterium bovis

35

<400> 53

Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp
1 5 10 15

Phe Trp Gly Gly
20

<210> 54

<211> 20

ES 2 600 907 T3

<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

<400> 54

5

Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Val Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln
1 5 10 15

Leu Gly Arg Asn
20

<210> 55
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

10

<400> 55

Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile
1 5 10 15

Tyr Glu Gln Ala
20

15

<210> 56
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

20

<400> 56

Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly
1 5 10 15

Gln Lys Val Gln
20

25

<210> 57
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

30

<400> 57

Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn
1 5 10 15

Asn Met Ala Gln
20

35

<210> 58
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

40

<400> 58

ES 2 600 907 T3

Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala
 1 5 10 15

Val Gly Ser Ser
 20

<210> 59
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

5

<400> 59

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

Ser Ser Trp Ala
 20

10

<210> 60
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

15

<400> 60

Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu Ile Ala Ser His Thr
 1 5 10 15

Ala Phe Ala Ala
 20

20

<210> 61
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

25

<400> 61

Pro Gln Leu Ile Ala Ser His Thr Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Met Arg His Thr
 20

30

<210> 62
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

35

<400> 62

Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His Thr Ile Gly Gln Ala
 1 5 10 15
 Glu Gln Gln Ala
 20

ES 2 600 907 T3

<210> 63
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 5
 <400> 63
 Met Arg His Thr Ile Gly Gln Ala Glu Gln Gln Ala Met Ser Ala Gln
 1 5 10 15
 Ala Phe His Gln
 20
 10
 <210> 64
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 15
 <400> 64
 Glu Gln Gln Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His Gln Gly Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Phe Gln
 20
 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 25
 <400> 65
 Ala Phe His Gln Gly Glu Ser Ala Ala Ala Phe Gln Gly Ala His Ala
 1 5 10 15
 Arg Phe Val Ala
 20
 30
 <210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 <400> 66
 Ala Ala Phe Gln Gly Ala His Ala Arg Phe Val Ala Ala Ala Ala Lys
 1 5 10 15
 35
 Val Asn Thr Leu
 20
 40
 <210> 67
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

ES 2 600 907 T3

<400> 67

Arg Phe Val Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Ile Ala
1 5 10 15

Gln Ala Asn Leu
20

5

<210> 68
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

10

<400> 68

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

Gly Thr Tyr Val
20

15

<210> 69
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

20

<400> 69

Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Thr Gly Phe
20

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de diagnóstico que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma, o un reactivo de diagnóstico que comprende un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma, y que consiste en 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos,
5 en el que la variante es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan,
estando el reactivo de diagnóstico **caracterizado por que** desencadena un resultado de ensayo de diagnóstico
10 negativo cuando se realiza un ensayo de infección por tuberculosis en una muestra de un animal que ha sido vacunado contra una infección por un agente de la tuberculosis.
2. Un reactivo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un polipéptido que comprende una o más de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y/o
15 9 o que comprende una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 o 9, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan.
3. Un reactivo de diagnóstico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende
20 adicionalmente al menos un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEQ ID NO: 10-69, o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a una de las SEQ ID NO: 10-69, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan.
- 25 4. Un reactivo de diagnóstico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 7, 8, 11-42 y 50-69 o secuencias que tienen al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a las SEQ ID NO: 7, 8, 11-42 y 50-69, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan.
- 30 5. Un reactivo de diagnóstico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de detección de una infección por tuberculosis en un mamífero, o para detectar la exposición de un animal a un agente de la tuberculosis.
6. Un reactivo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el método es una prueba
35 cutánea que desencadena un resultado positivo cuando el mamífero está infectado con un agente de la tuberculosis y que desencadena un resultado negativo cuando el mamífero ha sido vacunado contra una infección con un agente de la tuberculosis, o cuando el mamífero está sin vacunar y/o no infectado.
7. Un método para detectar una infección por tuberculosis en un animal, o la exposición del animal a un
40 agente de la tuberculosis, que comprende las etapas de
- (i) poner en contacto *in vitro* una población de células del animal con al menos un reactivo de diagnóstico como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores; y
45 (ii) determinar si las células de dicha población reconocen el reactivo de diagnóstico.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la población de células incluye linfocitos T.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que comprende un ensayo de inmunidad mediada por células (CMI), por ejemplo, en el que el ensayo CMI detecta interferón gamma (IFN- γ).
50
10. Un kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
11. Un kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en un método de acuerdo con
55 cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
12. Un polipéptido que consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7 o que consiste en una variante de la misma, que es al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 7, que se determina como un porcentaje de la longitud completa del más largo de los polipéptidos que se comparan.

13. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 12 que tiene hasta 10 aminoácidos añadidos al extremo N o C.
- 5 14. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 12 o 13.
15. Un vector que comprende al menos un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 14.
- 10 16. Una célula transformada con el vector de acuerdo con la reivindicación 15.

Figura 1

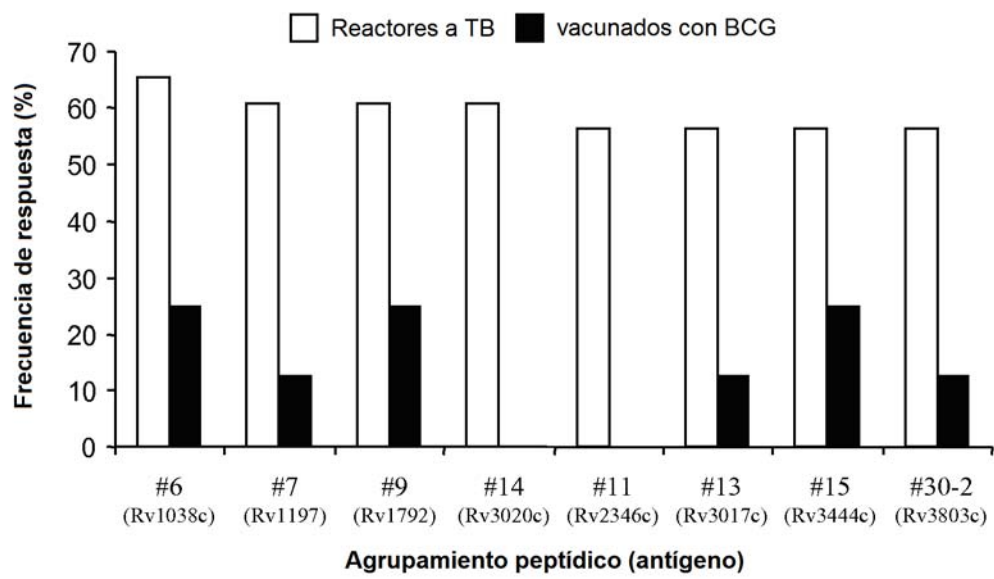


Figura 2

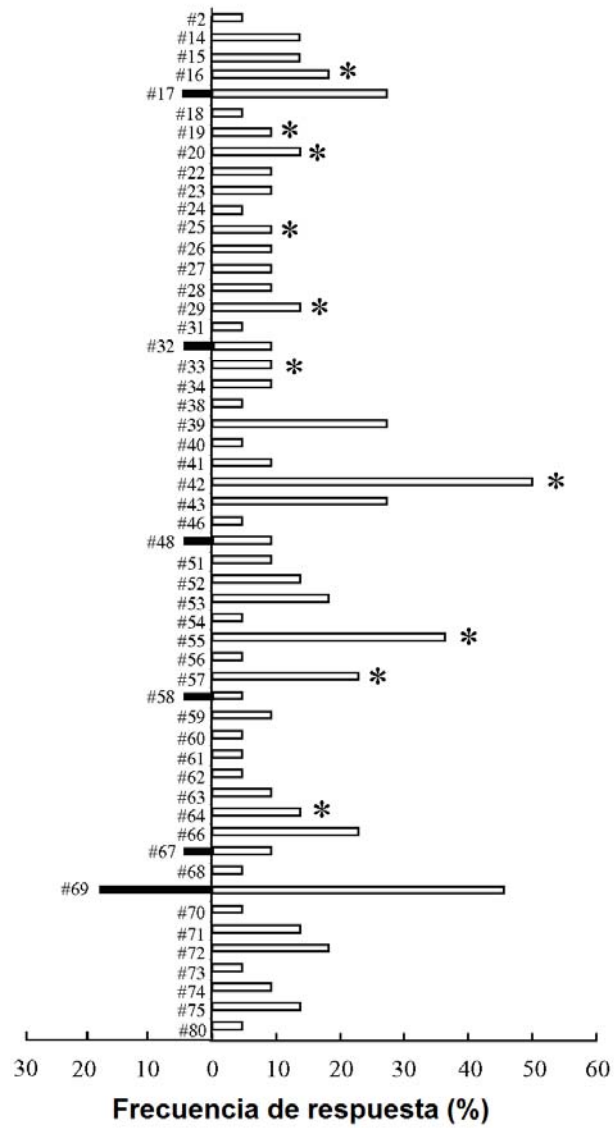


Figura 3

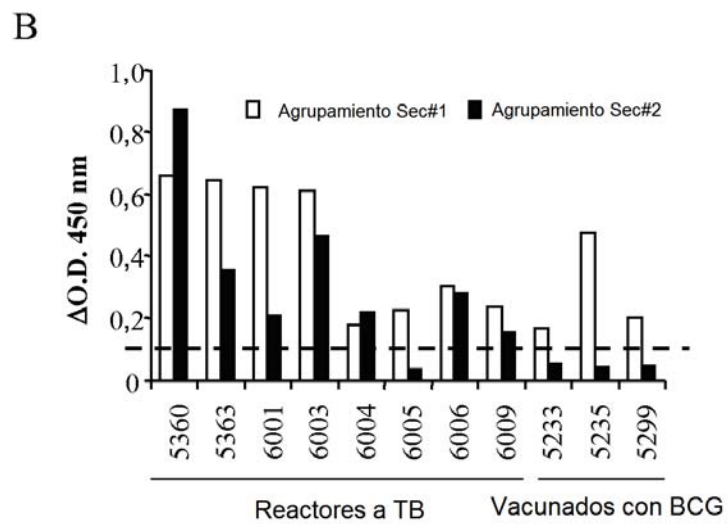
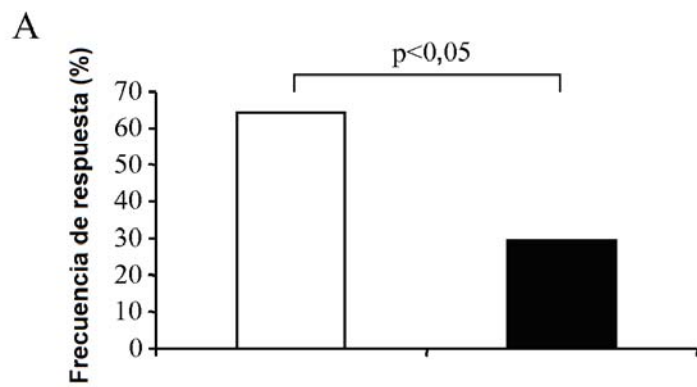


Figura 4

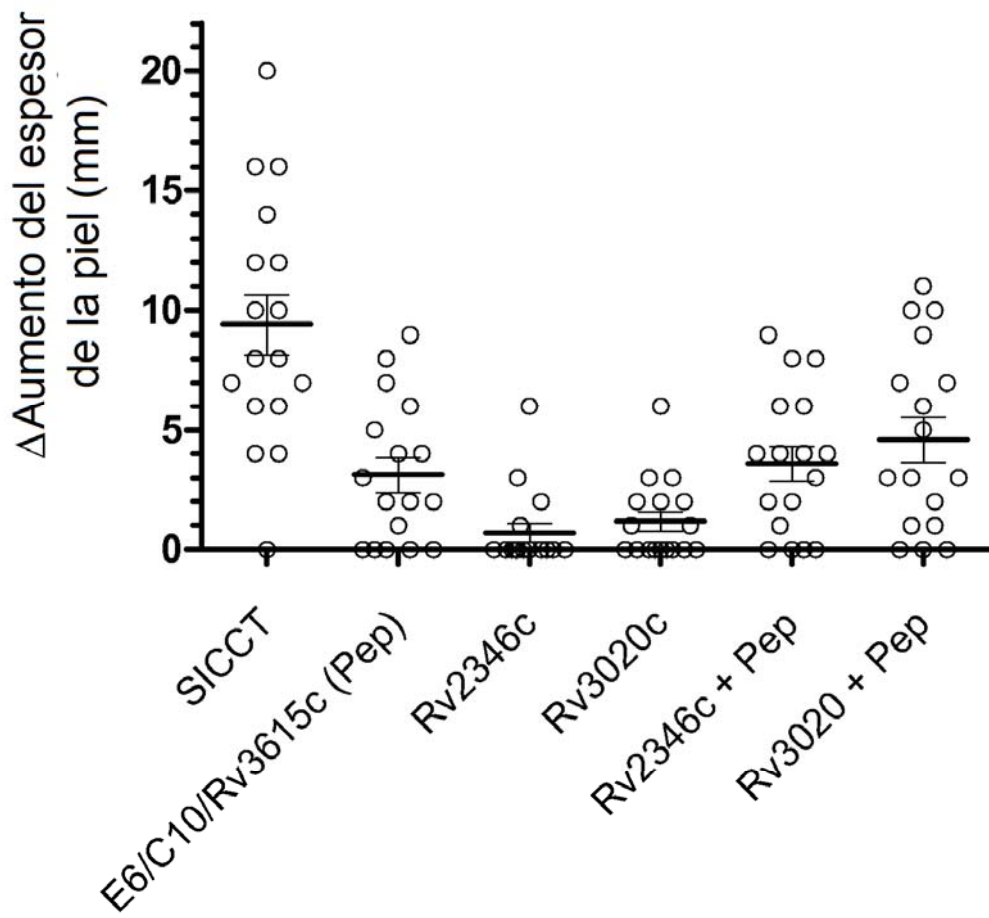


Figura 5

