

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 336**

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 14188545 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2827149**

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:
21.06.2017

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:

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

74 Agente/Representante:

CAMPello ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

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

ES 2 618 336 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.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a antígenos para su uso en la detección de infección por *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* en mamíferos tales como ganado.

10 Antecedentes

M. tuberculosis y *M. bovis* son patógenos importantes del hombre y los 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). *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 el ser humano. La TBB representa una carga económica significativa para la industria agrícola de diversos países incluyendo el Reino Unido (Krebs, 1997; DEFRA, 2006).

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" donde 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 del 0 al 80 % (Colditz y col., 1994; Fine, 1995). Además, la vacunación sensibiliza a los individuos ante la tuberculina, interfiriendo de esta manera con el diagnóstico.

Además de los ensayos cutáneos de TBB, están también bajo consideración los ensayos de diagnóstico basados en sangre que miden la producción de linfocinas inducidas por antígeno tales como el interferón γ (IFN- γ). La citocina IFN- γ parece ser crítica en el desarrollo de inmunidad ante *M. tuberculosis*. Por ejemplo, tanto ratones con un gen de IFN- γ desestabilizado como seres humanos con un receptor de IFN- γ mutado son altamente susceptibles a las infecciones micobacterianas. Sin embargo, se asocian 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 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*.

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 indica 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 del 100 % en ganado vacunado con BCG y no vacunado (Vordermeier y col. 2001).

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

Camus y col. (Microbiology (2002) 148 2967-2973) y el n.º 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 hay ninguna sugerencia del uso del polipéptido Rv3615c o porciones de éste en un reactivo para su uso en la detección de una infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un animal.

Garnier y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 7877-7882) y el n.º de acceso a NCBI asociado NP_857284

es una divulgación de la secuencia genómica de *M. bovis*, incluyendo el gen que codifica Mb3645c. No hay ninguna sugerencia del uso del polipéptido Mb3645c o porciones de éste en un reactivo para su uso en la detección de una infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un animal.

- 5 El documento US2003/0129601 divulga una comparación de las secuencias genómicas de *M. tuberculosis* y *M. leprae* e indica 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 descubierto que una de las secuencias tiene una eficacia particular en el diagnóstico de infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis*.

10

Resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un reactivo de diagnóstico para su uso en la detección de infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un mamífero, que comprende un péptido de hasta 100 aminoácidos de longitud que tiene un epítipo de la proteína que tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, consistiendo el epítipo aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, en el que el péptido consiste en aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1. El mamífero puede ser un ser humano o una especie bovina, por ejemplo, una vaca doméstica. Como alternativa, el mamífero puede ser un tejón. La detección puede tener lugar mediante el análisis de una muestra obtenida del animal, tal como una muestra de sangre, saliva, fecal o de tejido.

20

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un reactivo de diagnóstico para su uso en la detección de infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un mamífero, que comprende un péptido de hasta 100 aminoácidos de longitud que tiene un epítipo de la proteína que tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, consistiendo el epítipo aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, en el que el péptido consiste en aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1. El mamífero puede ser un ser humano o una especie bovina, por ejemplo, una vaca doméstica. Como alternativa, el mamífero puede ser un tejón. La detección puede tener lugar mediante el análisis de una muestra obtenida del animal, tal como una muestra de sangre, saliva, rectal o de tejido.

25

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

MTENLTVQPE RLGVLASHHD NAAVDASSGV EAAAGLGESV AITHGPYCSQ

FNDTLNVYLT AHNALGSSLH TAGVDLAKSL RIAAKIYSEA DEAWRKAI DG

30

LFT (SEQ ID NO: 1).

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

35

"Detección de la infección", como se ha mencionado 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 a 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.

40

Como se describe a continuación, se ha descubierto 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 ha mencionado anteriormente, aunque el gen que codifica Mb3645c está presente en todos de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y la vacuna viva atenuada de BCG, la exposición de un animal o una muestra de un animal a un epítipo de Mb3645c causa únicamente una respuesta inmunitaria detectable en un animal infectado por *M. bovis* o *M. tuberculosis* (o en una muestra de dicho animal). Tal 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.

45

50

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.

55

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" hace referencia a los aminoácidos (típicamente un

grupo de aproximadamente 5 o más aminoácidos) en una secuencia peptídica que son esenciales en 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 anticuerpos, 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 células (CMI). Por lo tanto, el epítipo puede ser uno reconocible por un linfocito T, por ejemplo, mediante la unión de un receptor de linfocitos T al 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 inmunógena 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 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 de la presente divulgación puede comprender un epítipo de (es decir, contenido en) uno o más de los grupos de péptidos que consisten en las SEQ ID NOs 2-13, que se definen como se indica a continuación:

MTENLTVQPE RLGVLASHHD (SEQ ID NO: 2);
 PERLGV LASH HDNAAVDASS (SEQ ID NO: 3);
 SHHDNAAVDA SSGVEAAAGL (SEQ ID NO: 4);
 25 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);
 30 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).

35 Los péptidos de SEQ ID NO: 2-13 son péptidos de 20 unidades superpuestos que incluyen 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*.

40 En un ejemplo, el reactivo de diagnóstico comprende uno o más péptidos seleccionados, cada uno seleccionado del grupo de péptidos que consiste en las SEQ ID NOs: 2-13. El reactivo de diagnóstico puede comprender al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más péptidos con un epítipo de uno o más péptidos seleccionados cada uno del grupo de péptidos que consiste en las SEQ ID NOs: 2-13. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico puede comprender al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más péptidos definido cada uno por cualquiera de las SEQ ID NOs: 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.

50 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 que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, o el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 12 y 13, o el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 12 y 13. Este reactivo de diagnóstico puede comprender, por ejemplo, uno cualquiera o más péptidos seleccionados del grupo de péptidos que consiste en las SEQ ID NOs: 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 que consiste en las SEQ ID NO: 2 y 9-13.

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		

Por lo tanto, el reactivo de diagnóstico de la presente divulgación puede comprender cualquier combinación de péptidos seleccionados de los enumerados anteriormente, o cualquier combinación de las combinaciones 5 enumeradas.

Como alternativa, el reactivo de diagnóstico de la presente divulgación puede comprender péptidos que tienen todos los epítomos del grupo de péptidos que consiste en, por ejemplo, SEQ ID NOs: 12-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 11-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 10-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 9-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 8-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 7-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 2-13. Por ejemplo, el reactivo de diagnóstico puede comprender todos los péptidos del grupo de péptidos que consiste en, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 12-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 11-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 10-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 9-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 8-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 7-13, o que consiste en las SEQ ID NOs: 2-13.

15 El reactivo de diagnóstico desvelado de la presente divulgación también puede comprender un péptido de fusión en el que se han unido los péptidos que se han definido anteriormente.

Los péptidos basados en Mb3645c del reactivo de diagnóstico como se definen en el presente documento pueden usarse por sí 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 ESAT-6 (SEQ ID NO: 14) y/o los polipéptidos CFP-10 (SEQ ID NO: 15), en los que ESAT-6 tiene la secuencia aminoacídica:

MTEQQWNFAG IEAAASAIQG NVTSIHSLLD EGKQSLTKLA AAWGGSGSEA
YQGVQQKWDA TATELNALQ NLARTISEAG QAMASTEGRV TGMFA (SEQ ID

25 NO: 14);
y en la que CFP-10 tiene la secuencia aminoacídica:

MAEMKTDAAT LAQEAGNFER ISGDLKTQID QVESTAGSLQ GQWRGAAGTA
AQAAVRFQE AANKQKQELD EISTNIRQAG VQYSRADEEQ QQALSSQMGE
(SEQ ID NO: 15).

30 Por ejemplo, los péptidos derivados de ESAT-6 pueden ser los péptidos de la 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);
35 KWDATATELN NALQNL (SEQ ID NO: 19); y
GQAMASTEGRV TGMFA (SEQ ID NO: 20).

Los péptidos derivados de CFP-10 pueden ser los péptidos de las SEQ ID NOs 21-25, que son:

MAEMKTDAAAT LAQEAGNF (SEQ ID NO: 21);
 QEAGNFERIS GDLKTQ (SEQ ID NO: 22);
 VVRFQEAANK QKQELDEI (SEQ ID NO: 23);
 NIRQAGVQYS RADEEQQQ (SEQ ID NO: 24); y
 5 RADEEQQQAL SSQMGF (SEQ ID NO: 25).

Los péptidos ESAT-6 y CFP-10 de las SEQ ID NOs 16-25 se han desvelado en Vordemeier y col. (2001) y proporcionan un diagnóstico útil para la detección de animales infectados por *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*. Usados en combinación con los péptidos derivados de Mb3645c, como se definen aquí, se obtiene un reactivo de
 10 diagnóstico más sensible.

Por consiguiente, el reactivo de diagnóstico puede ser específico para *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*.

Se proporciona también de acuerdo con la presente invención un kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-3. El reactivo de diagnóstico es capaz de detectar un mamífero infectado por *M. bovis* o *M. tuberculosis*. El reactivo de diagnóstico es capaz de diferenciar
 20 entre un mamífero infectado por *M. bovis* y/o *M. tuberculosis* y un mamífero vacunado contra *M. bovis* o *M. tuberculosis* (por ejemplo, un mamífero vacunado con una vacuna viva atenuada de BCG).

El kit de diagnóstico es de uso particular en la detección de un mamífero infectado por *M. bovis* y/o *M. tuberculosis* que no es susceptible a diagnóstico por el ensayo de ESAT-6/CFP-10 como se describe en Vordemeier y col.
 25 (2001).

El kit de diagnóstico es adecuado para su uso en un ensayo de inmunidad mediada por células (CMI). Por ejemplo, el ensayo CMI puede usar la detección de interferón gamma (IFN- γ) como sistema de lectura en formato EIA (Wood & Jones, 2001) o ELISPOT (Vordermeier y col., 2002). Como se conoce bien por el experto, dichos ensayos no dependen de la detección de una respuesta a anticuerpos sino, en su lugar, se basan en el reconocimiento de un
 30 epítipo por una célula T, por ejemplo a través de la unión de un receptor de linfocitos T.

En un aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona un péptido aislado de entre 5 a 100 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de 8 a 100, de 8 a 35, de 8 a 25, de 10 a 25 o 12-20 aminoácidos de longitud, en el que el
 35 péptido tiene un epítipo de la proteína hipotética de *M. bovis* Mb3645c (SEQ ID NO: 1) o de un polipéptido que tiene al menos un 76 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, y en el que el péptido tiene propiedades antigénicas y/o inmunógenas específicas de *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*. El péptido aislado puede tener 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 12 o 20 aminoácidos de
 40 longitud.

La presente invención proporciona un péptido aislado de entre 8 a 35 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de 10 a 25 o 12-20 aminoácidos de longitud, en el que el péptido tiene un epítipo de la proteína que tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, en la que el péptido consiste en aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, y en la que el péptido tiene propiedades antigénicas y/o inmunógenas específicas de *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*.
 45

La invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico que codifica un péptido reactivo de diagnóstico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un péptido como se define en la reivindicación 6, un vector que comprende el ácido nucleico como se define en la reivindicación 6, y una célula transformada con el vector como se define en la reivindicación 8.
 50

La expresión "propiedades antigénicas e inmunógenas específicas de *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*" indica que el péptido de acuerdo con este aspecto de la divulgación es detectable por medio de un ensayo inmunogénico, preferiblemente mediante un ensayo de inmunidad mediada por células (CMI).

55 El péptido aislado puede tener una secuencia aminoacídica de cualquiera de las SEQ ID NOs: 2-13, o puede comprender una combinación contigua de una o más de estas secuencias (por ejemplo, cualesquiera dos de las SEQ ID NOs: 2-13 unidas entre sí de extremo a extremo).

El péptido aislado puede ser un péptido en el que, en comparación con la sección correspondiente de SEQ ID NO: 1, se han eliminado diversos aminoácidos. Por lo tanto, el péptido puede limitarse para comprender el número mínimo de aminoácidos requeridos para mantener la especificidad frente a *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*. Por ejemplo,
 60

pueden ser aceptables deleciones de aminoácidos con la condición de que se mantenga la estructura terciaria de un epítipo de SEQ ID NO: 1. Un péptido modificado de esta manera puede estar comprendido en un péptido de fusión.

- La presente divulgación engloba también variantes del péptido reactivo de diagnóstico y el péptido aislado como se define en las reivindicaciones. Como se usa en el presente documento, una "variante" significa un péptido en el que la secuencia aminoacídica difiere de la 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, ya que 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, ninguna sustitución, adición o deleción aminoacídica debe alterar o alterar significativamente la estructura terciaria del uno o más epítipos contenidos en el péptido del que deriva la variante. El experto en la técnica es capaz de determinar fácilmente variantes funcionales apropiadas y de determinar la estructura terciaria de un epítipo y cualquier alteración del mismo, sin la aplicación de habilidades inventivas.
- 15 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 un tipo diferente.

Se entiende por "sustitución conservativa" la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, en la 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.

Como se conoce bien 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 epítipo en el péptido, por ejemplo, que no interrumpan 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 50 % idénticas, 60 % idénticas, por ejemplo, al menos un 75 % idénticas, tal como al menos un 90 % idénticas a la secuencia básica.

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 el presente documento, 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 experto en la técnica un ácido nucleico que codifica un epítipo 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 incluye fragmentos y variantes del ácido nucleico aislado, donde cada uno de tal fragmento o variante codifica un péptido con propiedades antigénicas como se define en el presente documento. Los fragmentos pueden comprender adecuadamente al menos 15, por ejemplo al menos 30, o al menos 60 bases consecutivas de la secuencia básica.

El término "variante" con relación a una secuencia de ácido nucleico significa cualquier sustitución, variación, modificación o reemplazo por deleción 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 a conservar son la capacidad de formar uno o más epítipos 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 el presente documento. 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 producirse en o entre bajas y altas condiciones de rigurosidad. En términos generales, las condiciones de baja rigurosidad pueden definirse como una hibridación en la que la etapa de lavado tiene lugar en una solución tampón de NaCl 0,330-

- 0,825 M a una temperatura de aproximadamente 40-48 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) 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 alta rigurosidad implican un lavado en una solución tampón de NaCl 0,0165-0,0330 M a una temperatura de aproximadamente 5-10 °C por debajo de la T_m calculada o real de la sonda (por ejemplo, aproximadamente a 65 °C). La solución tampón puede ser, por ejemplo, un tampón SSC (NaCl 0,15 M y citrato trisódico 0,015 M), teniendo lugar el lavado de baja rigurosidad con tampón 3 x SSC y teniendo lugar el lavado de alta rigurosidad 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 y col. (1989; Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).
- 10 Típicamente, las variantes tienen un 60 % o más de los 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 un 99 % o más de identidad de secuencia.
- 15 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 huésped adecuada, tal como una
- 20 célula procariótica, tal como *E. coli*. Las células huésped 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 huésped una infección por, o exposición a, *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*, que comprende las etapas de:
- 25
- i) poner en contacto una población de células del huésped con un reactivo de diagnóstico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
 - ii) determinar si las células de dicha población celular reconocen el reactivo de diagnóstico.
- 30 El reactivo de diagnóstico basado en Mb3645c puede ponerse en contacto conjunta o separadamente del reactivo de diagnóstico basado en ESAT-6/CFP-10.
- La población de células puede incluir linfocitos T. El reconocimiento del reactivo de diagnóstico por dichas células puede hacerse, por ejemplo, mediante la unión de un receptor de linfocitos T al reactivo de diagnóstico, por ejemplo,
- 35 la unión del receptor a un epítipo incluido en el reactivo de diagnóstico.
- El método para diagnóstico comprende un ensayo de inmunidad mediada por células (CMI), por ejemplo, un ensayo CMI que detecta IFN- γ como se describe en el presente documento.
- 40 El término "polipéptido" como se usa en el presente documento incluye péptidos de cadena larga, tales como proteínas y fragmentos epitópicos de las mismas. El término "péptido" se refiere a proteínas más pequeñas, por ejemplo de hasta 100 aminoácidos de longitud.
- La identidad de secuencia entre secuencias nucleotídicas y aminoácidas puede determinarse mediante
- 45 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. La puntuación de un alineamiento como un 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
- 50 consideración 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 mayor puntuación que aquel con muchos huecos. El cálculo de la identidad porcentual máxima implica la producción de un alineamiento óptimo teniendo en
- 55 consideración las penalizaciones de hueco.
- Los programas informáticos adecuados para realizar comparaciones de secuencias están ampliamente disponibles en el sector comercial y público. Los ejemplos incluyen el programa Gap (Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) y el programa FASTA (Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410). Gap y FASTA están
- 60 disponibles como parte del paquete CGC Accelrys GCG Versión 11.1 (Accelrys, Cambridge, Reino Unido), 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). 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). 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.

10 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:

- 15 La figura 1 es un histograma que muestra las frecuencias de respuesta de los antígenos candidatos cribados;
la figura 2 es una gráfica que muestra la respuesta ante Mb3645c en ganado no infectado, ganado infectado, vacunas de BCG y muestras negativas a ESAT/CFP;
la figura 3 comprende gráficas que muestran la correlación entre la abundancia y la antigenicidad de ARNm
20 en *M. tuberculosis* (gráfico izquierdo) y *M. bovis* (gráfico derecho);
la figura 4 muestra las respuestas de péptidos usados en la invención, determinadas usando un ensayo de ELISPOT de IFN- γ 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 así sucesivamente); y
la figura 5 muestra un análisis de FACS realizado después de la estimulación de PBMC aisladas de ganado
25 infectado por *M. bovis* con péptidos usados en la divulgación (la secuencia 02 corresponde a la SEQ ID NO:2, la secuencia 03 a la SEQ ID NO: 3, y así sucesivamente, como anteriormente).

Ejemplos

30 Introducción

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 y col., 2002; Ewer y col., 2006). Estos implicaban en gran parte análisis basados en secuencia del genoma del patógeno. Aquí, los inventores tomaron un
35 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 observa en la Tabla 1, se encontró que muchos de los antígenos micobacterianos principales tales como ESAT6, CFP10, Ag85B etc., se expresan altamente de modo consistente. Además de esto, se ha mostrado recientemente que el número de linfocitos T CD4+ sensibles a antígenos micobacterianos conocidos está estrechamente
40 relacionado con el nivel de transcripción de su gen (Rogerson y col., 2006).

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 diversidad de condiciones de crecimiento. Se seleccionaron entonces catorce de estos genes y se cribó su potencial como
45 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
50 pruebas de diagnóstico diferencial descritas anteriormente basadas en ESAT6 y CFP10 (Vordemeier y col. 2001).

Métodos

Selección de antígenos candidatos

55 Se usaron seis conjuntos de datos de micromatrices en este estudio. Se realizaron todas las extracciones de ARN e hibridaciones de micromatrices como se detalla en Bacon y col. (2004). Se usaron el lenguaje informático Perl y el entorno estadístico R para realizar todos los análisis de datos y estadísticos adicionales.

60 Para cada conjunto de datos, se calcularon las abundancias de ARNm en el genoma como se indica a continuación. 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, como se determinó 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.

- 5 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} :

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

- 10 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:

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

- Se volvieron a convertir los valores de Rn_i corregidos a la escala original y, para facilitar la comprensión, se ilustran como un 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 (ARN_m) en la muestra:

$$\text{ppm} = (\text{Rn}_i / \sum_{i-\text{ésimo}} \text{Rn}) \times 10^6$$

- 25 Se seleccionaron entonces los antígenos candidatos basándose en su expresión consistente alta en los seis conjuntos de datos que proceden de una diversidad de condiciones experimentales: *M. tuberculosis* en quimiostatos aeróbicos y bajos en oxígeno, *M. tuberculosis* en cultivo en lotes, *M. tuberculosis* en macrófagos, *M. bovis* en quimiostatos aeróbicos, y *M. bovis* en cultivo en lotes. Usando estos conjuntos de datos, se seleccionaron los genes que estaban consistentemente entre el 15 % de transcritos de ARN_m 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).

35

Ganado

- Se obtuvieron 10 animales de control no infectados de rebaños de regiones de ensayo durante 4 años sin historial de brote de TBB en los últimos 4 años y se ensayó la ausencia de respuesta de IFN γ *in vitro* ante PPD-A y PPD-B, para confirmar la ausencia de infección. Se vacunaron 20 animales más de rebaños exentos de TBB similares al menos 6 meses antes del muestreo con 10⁶ 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).

- 45 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 γ *in vitro* a PPD-B y se registró la presencia o ausencia de respuesta a ESAT6 y CFP10. Se alojaron estos animales en VLA en el momento de la toma de muestra de sangre. Se confirmó la infección por necropsia y/o cultivo de *M. bovis*.

50

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, Reino Unido, y se usaron para estimular la sangre completa a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se incluyó enterotoxina B estafilocócica como control positivo a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

- 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 en 12 residuos aminoacídicos (Pepscan, Lelystad, Holanda). Estos se disolvieron en solución salina equilibrada de Hanks (Gibco) y DMSO al 20% a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se agruparon por genes en 26 grupos de 8 a 12 péptidos, con algunos genes representados por más de un grupo. Los grupos se usaron para estimular la sangre completa a una concentración final de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 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 ha descrito previamente (Vordermeier y col., 2001).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de *IFN- γ*

5

Se realizaron cultivos de sangre completa en placas de 96 pocillos donde se mezclaron 250 μ l de alícuotas de sangre completa con una solución que contenía antígeno a una concentración final de 10 μ g. ml^{-1} . Se recogieron los sobrenadantes que contenían suero después de 24 horas de cultivo a 37 °C y con CO₂ al 5 % en una incubadora humidificada. Se determinó la concentración de IFN γ usando el kit BOVIGAM ELISA (Prionics AG, Suiza). Los resultados se consideraron positivos cuando las densidades ópticas a 450 nm (DO₄₅₀) con antígenos menos la DO₄₅₀ sin antígenos fueron $\geq 0,1$. Para el análisis comparativo de respuestas de PPD-B frente a PPD-A, se definió un resultado positivo como una DO₄₅₀ de PPD-B menos DO₄₅₀ de PPD-A de $\geq 0,1$ y una DO₄₅₀ de PPD-B menos DO₄₅₀ no estimulada de $\geq 0,1$.

15 *Análisis de datos BOVIGAM*

Todos los datos sin procesar del cribado BOVIGAM se manipularon usando un programa PERL, boviAnalyser.pl, que evocó rutinas analíticas en el entorno estadístico R (R-Development-Core-Team, 2006). Se generaron gráficas usando tanto R como Graph-Pad Prism v4.

20

Ensayo de inmunoabsorción de puntos ligado a enzimas (ELISPOT) de IFN- γ ex vivo

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada tomada de tres cabezas de ganado que habían mostrado previamente una respuesta *in vitro* al agrupamiento de péptidos Rv3615c. La separación se realizó usando centrifugación en gradiente con Histopaque 1077 (Sigma), y las células se suspendieron de nuevo en medio de cultivo de tejido RPMI 1640 que contenía HEPES 25 mM (Gibco), suero fetal de ternero al 10 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, β -mercaptoetanol 5 x 10⁻⁵ M, penicilina 100 U/ml y 100 μ g ml^{-1} de estreptomycin. Se enumeraron las células y se prepararon suspensiones que contenían 2 x 10⁶ células ml^{-1} . Se analizó la producción de IFN- γ por PBMC usando un kit ELISPOT de IFN- γ bovina Mabtech (Mabtech, Estocolmo, Suecia). Las placas de ELISPOT (Multiscreen HTS-IP; Millipore) se recubrieron a 4 °C durante una noche con un anticuerpo monoclonal específico de IFN- γ bovino, después de lo cual las células se bloquearon durante 2 horas usando suero fetal de ternero al 2 % 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 x 10⁵ células pocillo⁻¹) y se incubaron durante una noche a 37 °C con CO₂ al 5 % en presencia de antígenos individuales. Se realizó la estimulación usando los péptidos a una concentración de 5 μ g ml^{-1} o un grupo de los 12 péptidos que contenía 5 μ g ml^{-1} de cada péptido. Los pocillos se lavaron usando una solución salina tamponada con fosfato más Tween 80 al 0,05 %. Se usó un anticuerpo secundario biotinilado a una concentración de 0,025 μ g ml^{-1} seguido de una incubación con peroxidasa de rábano picante ligada a estreptavidina. Después de un lavado adicional, las células que formaban puntos se visualizaron 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 de células activadas por fluorescencia (FACS)

Se aislaron PBMC de sangre recién heparinizada como se ha descrito anteriormente para el ensayo ELISPOT y se enumeraron. Se preparó entonces una suspensión que contenía 2 x 10⁶ células ml^{-1} y se incubaron durante una noche en una placa de 24 pocillos (Nunc) a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % con medio RPMI (control no estimulado), PPD- B, mitógeno de hierba carmín (control positivo), péptidos individuales a una concentración de 5 μ g ml^{-1} , o un grupo de los 12 péptidos a una concentración de 5 μ g ml^{-1} . Después de la incubación, se añadió brefeldina A (Sigma) a una concentración de 10 μ g ml^{-1} , y la preparación se incubó durante 4 h más. La placa se centrifugó a 300 x g durante 5 min, y las células se resuspendieron en 250 μ l (volumen final) para su transferencia a una placa de 96 pocillos. Se realizó la tinción de anticuerpos 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 realizó una tinción diferencial "vivo/muerto" usando Vivid (Invitrogen). Después de la incubación durante 15 min a 4 °C, las células se lavaron y se centrifugaron antes de que se permeabilizasen usando Cytofix/Cytoperm (BD) a 4 °C durante 20 min, y se almacenaron durante una noche a 4 °C. Se realizó una tinción intracelular para IFN- γ usando anti-IFN- γ conjugado con R-ficoeritrina (Serotec) durante 30 min a 4 °C. Finalmente, las células se suspendieron en 600 μ l de tampón y se analizaron usando un instrumento Cyan ADP y el software Summit 4.3 (Dako, Dinamarca).

60

Resultados

Los genes que se había encontrado que estaban altamente expresados de modo consistente en *M. tuberculosis* y *M. bovis* en una diversidad de condiciones de crecimiento (denominados miembros de invarioma abundante) se evaluaron para determinar la presencia de antígenos conocidos. Se encontró que 10 antígenos previamente 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.

10 **Tabla 1: Antígenos micobacterianos que se encontraron altamente expresados en una diversidad de condiciones de crecimiento**

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

Teniendo esto en mente, se generó una lista de 14 antígenos candidatos basándose en su alta expresión consistente en una variedad de condiciones de crecimiento. Estos incluían quimiostato *in vitro* y cultivos en lotes tanto para *M. tuberculosis* como de *M. bovis*, así como para *M. tuberculosis* que infectaban macrófagos y que crecían en condiciones microaerófilas. En la mayoría de casos, se seleccionaron también los candidatos basándose en la estrecha homología entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* pero con poca homología con respecto a otras especies micobacterianas (Tabla 2). La mayoría de los candidatos se clasifican como proteínas hipotéticas conservadas. Sin embargo, tres son presuntas proteínas de membrana, una es una escisionasa y otra un miembro de la familia PE de proteínas. Se sintetizaron péptidos de 20 unidades superpuestos para la secuencia de codificación completa de cada gen y se agruparon en 26 grupos de 8 a 12 péptidos, con algunos péptidos representados por más de un grupo. Después, estos grupos se cribaron para determinar su capacidad para estimular la respuesta *in vitro* de IFN γ usando sangre completa de 30 cabezas de ganado infectadas por *M. bovis* (positivas a tuberculina bovina (PPD-B)) y 10 cabezas no infectadas por *M. bovis* (negativas a PPD-B).

Tabla 2: Antígenos candidatos cribados. % de homología de sec. aa con respecto a *M. tuberculosis* ("M. tb") H37Rv si >50 %

Rv	Mb	M. tb	M. bovis	M. avium	M. paratb	M. leprae	M. marinum	M. smegmatis	C. glutamicum	N. facinica	Altamente expresado en [†] :	Función
Rv1211	Mb1243	100	100			94	93	80	52	72	M. tb*	CHP
Rv1222	Mb1254	100	100	64	64	71	67	64			Mb	CHP
Rv1398	Mb1433	100	100								Mtb y Mb	CHP
Rv2081	Mb2107	100	100								Mb	POSIBLE TP
Rv2876	Mb2901	100	99			68	75	58		50	Mb	POSIBLE TP CONSERVADA
Rv3271	Mb3299	100	100				78				Mtb	IMP PROB. 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)
Rv3613	Mb3643	100	100								M. tb*	HP
Rv3614	Mb3644	100	100	81	73	51					Mtb y Mb	CHP
Rv3615	Mb3645	100	100	67	79						Mtb y Mb	CHP
Rv3633	Mb3657	100	100								Mb	CHP
Rv3750	Mb3776	100	100								Mtb	POSIBLE ESCISIONASA
Rv3866	Mb3896	100	100		89	78					Mb	CHP

†: Expresado en las 4 condiciones de Mtb (cultivo en lotes, quimiostatos aerobios y bajos en oxígeno, macrófagos) 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 a PPD-B y además 23 de las 30 cabezas de ganado infectadas respondieron a un cóctel de péptidos ESAT6/CFP10 (Vordermeier y col., 2001). Se muestran en la figura 1 las frecuencias de respuesta para los 14 antígenos candidatos en ganado infectado por *M. bovis* y no infectado por *M. bovis*. Siete de los candidatos no consiguieron estimular ninguna respuesta de IFN γ significativa ni en ganado infectado por *M. bovis* ni no infectado. Cuatro de los antígenos candidatos estimulaban una respuesta positiva en un 10 % o más de los animales no infectados por *M. bovis*. Esto sugirió una reactividad cruzada con otras especies ambientales aunque los inventores hubieran seleccionado contra homología significativa en micobacterias distintas de *M. tuberculosis* o *M. bovis*. Cuatro de los candidatos estimularon respuestas significativas en ganado infectado por *M. bovis*, aunque dos de estas se reconocieron en un 10 % o menos del ganado ensayado y tenían frecuencias de respuesta similares o mayores en animales negativos a PPD-B. De los dos candidatos restantes, *Rv3750c/Mb3776c* estimularon 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 positiva de IFN γ cuando se estimularon con este grupo 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 y col., 2005, Fortune y col., 2005), se observó que las respuestas positivas al grupo peptídico *Mb3645c* de animales infectados por *M. bovis* se enriquecieron en las cabezas de ganado que no respondieron 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 las pruebas de diagnóstico basadas en ESAT6/CFP10 desarrolladas previamente (Vordermeier y col., 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. A diferencia de los animales infectados por *M. bovis*, ninguna de las cabezas de ganado vacunadas con BCG generó una respuesta de IFN γ significativa a los 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 y col., 2006, Cockle y col., 2002, Mustafa y col., 2006). En conjunto, estas 94 proteínas tenían frecuencias de respuesta que variaban del 0 al 86 %, con una media del 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* cultivadas en quimiostato: 0,01 (Spearman, $p = 0,38$) y 0,06 (Spearman, $p = 0,56$) respectivamente, sugiriendo que el nivel de ARNm en solitario no es un factor de predicción importante de potencial antigénico en el ganado.

Para confirmar la presencia y localización de los epítomos de linfocitos T en *Rv3615c*, la respuesta a los péptidos constituyentes del agrupamiento *Rv3615c* se determinó usando un ensayo ELISPOT de IFN- γ 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 incluyen 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, estimuló una respuesta en los tres animales, con una media de 509 unidades formadoras de punto (UFP) por 106 PBMC (desviación estándar, 185 3 UFP por 106 PBMC), que es comparable con los resultados para el agrupamiento en conjunto (414 UFP por 106 PBMC; desviación estándar, 135,6 UFP por 106 PBMC) (figura 4).

Para caracterizar adicionalmente la respuesta linfocítica específica a *Rv3615c*, se realizó 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- γ intracelular y la presencia de los marcadores de diferenciación celular CD4 y CD8. Se descubrió que, reflejando los datos de ELISPOT, los péptidos de SEQ ID NO: 2-8 estimularon poca producción de IFN- γ . Se observaron niveles notablemente superiores de IFN- γ 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- γ al 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 propio péptido causó la apoptosis inducida por IFN- γ , lo que podría ser acorde con las respuestas positivas observadas en el ensayo ELISPOT.

Análisis

Ha habido muchas estrategias para la identificación de inmunógenos micobacterianos usando métodos postgenómicos, incluyendo la predicción de epítomos de linfocitos T (Vordermeier y col., 2003) y comparaciones genómicas para identificar marcos de lectura abiertos específicos de patógenos (Ewer y col., 2006). El trabajo previo 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 la antigenicidad.

Una selección de genes altamente expresados de forma consistente se cribó para determinar su capacidad para estimular respuestas de IFN γ en ganado infectado por *M. bovis*. Se seleccionaron catorce candidatos basándose en su alta expresión tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis* en una diversidad 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 lo tanto, la mayoría de antígenos candidatos no tenían ninguna anotación funcional. 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 mayor frecuencia de respuesta 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 y col., 2005, Fortune y col., 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 al 37 % (Mustafa y col., 2006). Rv3616c se secreta de manera mutuamente dependiente con ESAT6 y CFP10 (Fortune y col., 2005), mientras que Rv3615c parece interactuar con otras proteínas del sistema de secreción (Macgurn y col., 2005) y, por lo tanto, puede 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 y col., 2001). Se ha indicado que el ensayo tiene una sensibilidad de aproximadamente un 77,9 % en ganado infectado. Se ha descubierto que Rv3615c no se reconocerá por los sistemas inmunitarios de animales no infectados por *M. bovis* o vacunados con BCG, a diferencia de Rv3616c, al que responden un 40 % de los individuos vacunados (Mustafa y col., 2006), y es por lo tanto, altamente específico. Además, un 57 % del ganado infectado por *M. bovis* que no responde al cóctel peptídico de ESAT6/CFP10 usado generó una respuesta de IFN γ significativa a Rv3615c. Por lo tanto, la inclusión de Rv3615c en el cóctel de diagnóstico de ESAT6/CFP10 aumenta la sensibilidad de un ensayo 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 del ensayo.

De los 14 candidatos iniciales, únicamente uno era significativamente antigénico, mientras que observaciones previas habían conducido a los investigadores a creer que muchos genes altamente expresados podrían ser inmunógenos potentes. Se conoce bien que los procesos de transcripción y traducción están estrechamente acoplados en procariotas (Miller y col., 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 huésped y es más probable que se procesen y se presenten mediante 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 en solitario 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. and Coates, A. R. M. (1988) Nucl. Acids Res., 16, 9047.
 Berthet, F., Rasmussen, P., Rosenkrands, I., Andersen, P. and Gicquel, B. (1998) Microbiology, 144,3195-3203.
 Cockle, P. J., Gordon, S. V., Lalvani, A., Buddle, B. M., Hewinson, R. G. and 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. and Mosteller, F. (1994) *JAMA*, 271, 698-702.

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

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

DEFRA (2006) The UK Government Department for Environment, Food and Rural Affairs Bovine TB Expenditure Factsheet 1999 - 2005 [online]. Available from: <http://www.defra.gov.uk/animalh/tb/stats/expenditure.htm> [Accessed 23/08/2006].

10 Ewer, K., Cockle, P., Gordon, S., Mansoor, H., Govaerts, M., Walravens, K., Marche, S., Hewinson, G. and Vordermeier, M. (2006) *Clin. Vaccine Immunol.*, 13, 90-97. Fine, P. E. M. (1995) *The Lancet*, 346, 1339-1345.

Fortune, S. M., Jaeger, A., Sarracino, D. A., Chase, M. R., Sasseti, C. M., Sherman, D. R., Bloom, B. R. and Rubin, E. J. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10676-10681.

15 Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, M. E., Torres, M. L., Ramirez, C. and Cruz, N. (1986) *Infect. Immun.*, 52, 293-302.

Harth, G., Lee, B., Wang, J., Clemens, D. and Horwitz, M. (1996) *Infect. Immun.*, 64, 3038-3047.

Krebs, J. (1997) Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Publications, London, United Kingdom.

Macgurn, J. A., Raghavan, S., Stanley, S. A. and Cox, J. S. (2005) *Mol Microbiol*, 57, 1653-63.

20 Miller, O. L., Jr., Hamkalo, B. A. and Thomas, C. A., Jr. (1970) *Science*, 169, 392-395.

Mustafa, A. S., Skeiky, Y. A., Al-Attayah, R., Alderson, M. R., Hewinson, R. G. and 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, Vienna, Austria.

25 Rogerson, B. J., Jung, Y.-J., LaCourse, R., Ryan, L., Enright, N. and 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. and Andersen, P. (2002) *Infect. Immun.*, 70, 5446-5453.

30 Sorensen, A., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P. and Andersen, A. (1995) *Infect. Immun.*, 63, 1710-1717.

Vordermeier, H. M., Whelan, A., Cockle, P. J., Farrant, L., Palmer, N. and 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

35 Vordermeier, M., Whelan, A. O. and Hewinson, R. G. (2003) *Infect. Immun.*, 71, 1980-1987.

Wood PR, Jones SL. (2001) *Tuberculosis (Edinb)*, 81, 147-55).

Lista de secuencias

- 40 <110> The Secretary of State for Environment, Food and Rural Affairs
- <120> Antígenos de micobacterias
- <130> P1416EP02
- 45 <140> 13182794.1
- <141> 06-11-2008
- <150> 08848298.9
- 50 <151> 06-11-2008
- <150> PCT/GB2008/003724
- <151> 2008-11-06
- 55 <150> 0722105.4
- <151> 2007-11-10
- <160> 25
- 60 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 618 336 T3

5

<210> 1
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

<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

10

<210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

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

<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

20

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

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

<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

ES 2 618 336 T3

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

10 <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

15 <210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 5
 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

25 <210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<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

35 <210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 7

ES 2 618 336 T3

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

5 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> fragmento de proteína de longitud completa

<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

15 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 9
 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

25 <210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<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

35 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

ES 2 618 336 T3

<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

5
<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> fragmento de proteína de longitud completa

<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

15
<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 13

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

25
<210> 14
<211> 95
<212> PRT
30 <213> Mycobacterium bovis

<400> 14

ES 2 618 336 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
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

5

<400> 15
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

10

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

15

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

<400> 16

ES 2 618 336 T3

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 17
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> fragmento de proteína de longitud completa
 10
 <400> 17
 Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser
 1 5 10 15
 <210> 18
 15 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> fragmento de proteína de longitud completa
 <400> 18
 Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
 1 5 10 15
 <210> 19
 25 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> fragmento de proteína de longitud completa
 <400> 19
 Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu
 1 5 10 15
 <210> 20
 35 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> fragmento de proteína de longitud completa
 <400> 20
 Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 1 5 10 15
 45 <210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> fragmento de proteína de longitud completa
 <400> 21

ES 2 618 336 T3

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

Asn Phe

5 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> fragmento de proteína de longitud completa

<400> 22
 Gln Glu Ala Gly Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln
 1 5 10 15

15 <210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 23
 Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu Leu Asp
 1 5 10 15

Glu Ile

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

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

<400> 24
 Asn Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln
 1 5 10 15

Gln Gln

35 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 25
 Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser Gln Met Gly Phe
 1 5 10 15

45

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de diagnóstico para su uso en la detección de infección por *M. bovis* o *M. tuberculosis* en un mamífero, que comprende un péptido de hasta 100 aminoácidos de longitud que tiene un epítipo de linfocitos T de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, consistiendo el epítipo en aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, en el que el péptido consiste en aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, en el que además el reactivo de diagnóstico es un reactivo de diagnóstico de ensayo de inmunidad mediada por células (CMI).
- 10 2. Un reactivo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido tiene hasta 20 aminoácidos.
3. El reactivo de diagnóstico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además uno o más polipéptidos, teniendo cada uno la secuencia aminoacídica de SEQ ID NOs: 14-25.
- 15 4. Un kit de diagnóstico que comprende un reactivo de diagnóstico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el reactivo de diagnóstico es capaz de detectar una infección por *M. tuberculosis* en un mamífero y es capaz de diferenciar entre un mamífero infectado por *M. tuberculosis* y un mamífero vacunado contra una infección por *M. tuberculosis*.
- 20 5. Un péptido aislado de entre 8 a 35 aminoácidos de longitud, por ejemplo de 10 a 25 o 12-20 aminoácidos de longitud, en el que el péptido tiene un epítipo de la proteína que tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, en el que el péptido consiste en aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1 y en el que el péptido tiene propiedades antigénicas y/o inmunógenas específicas de *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*.
- 25 6. Un ácido nucleico que codifica un péptido reactivo de diagnóstico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o un péptido como se define en la reivindicación 5.
7. Un vector adecuado para expresar un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 30 2 o 5, comprendiendo el vector el ácido nucleico como se define en la reivindicación 6.
8. Una célula transformada con el vector como se define en la reivindicación 7.
9. Un método *in vitro* para diagnosticar en un huésped una infección de, o exposición a, *M. bovis* y/o *M. tuberculosis*, que comprende las etapas de:
- 35 i) poner en contacto una población de células del huésped con un reactivo de diagnóstico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
- ii) determinar si las células de dicha población celular reconocen el reactivo de diagnóstico.
- 40

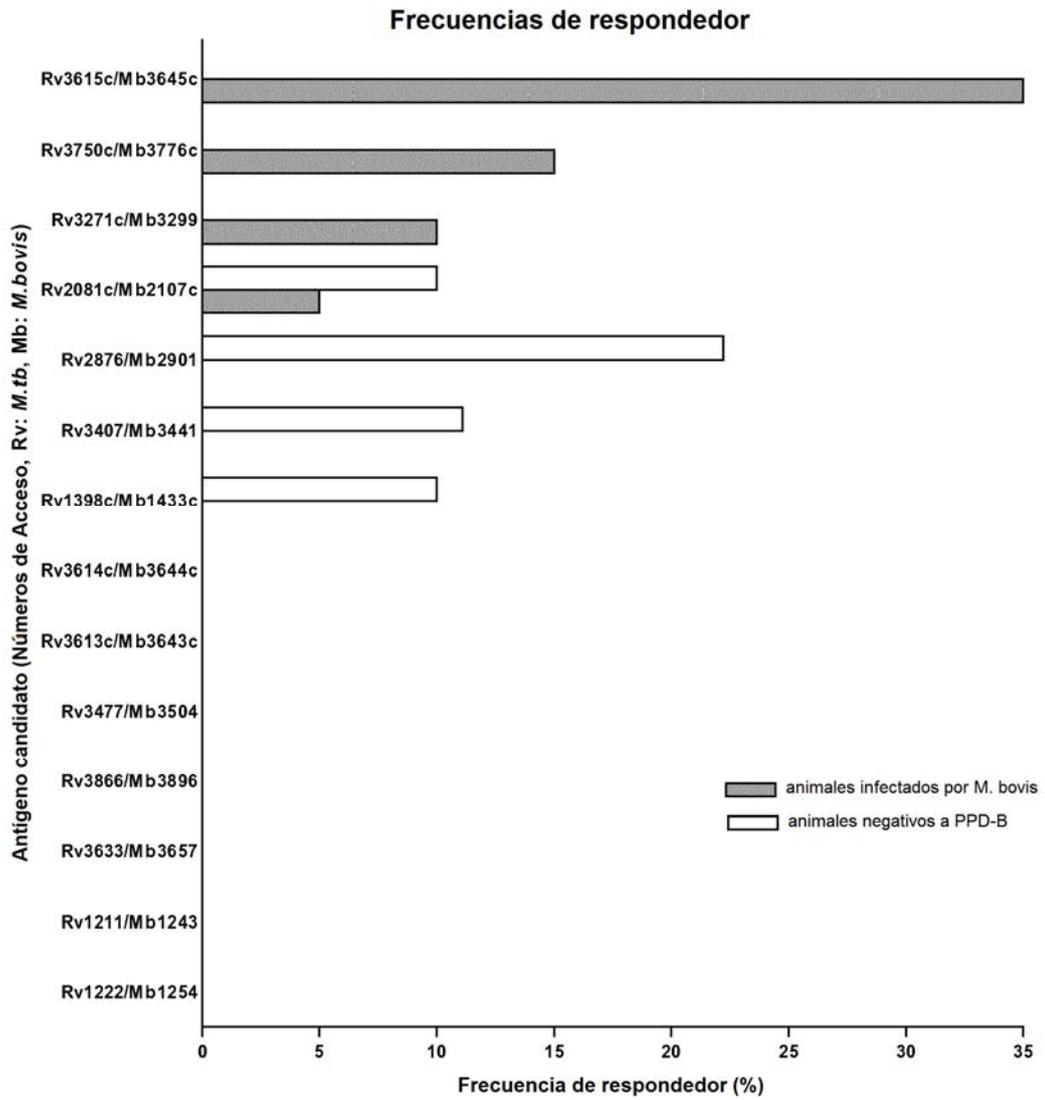


Figura 1

ARNm frente a Antigenicidad

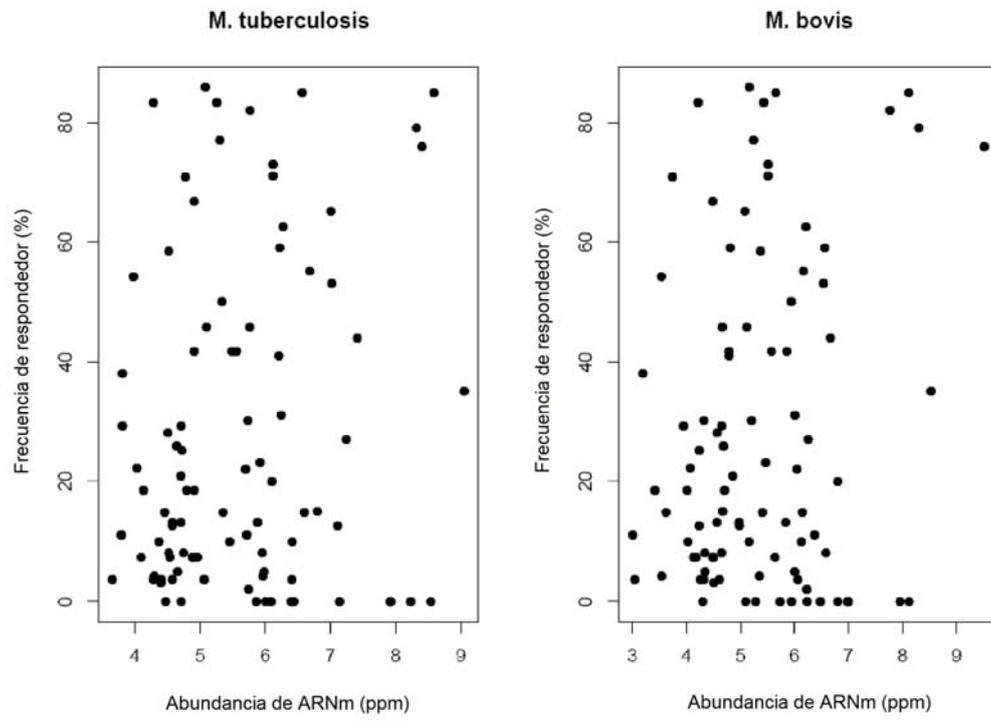


Figura 3

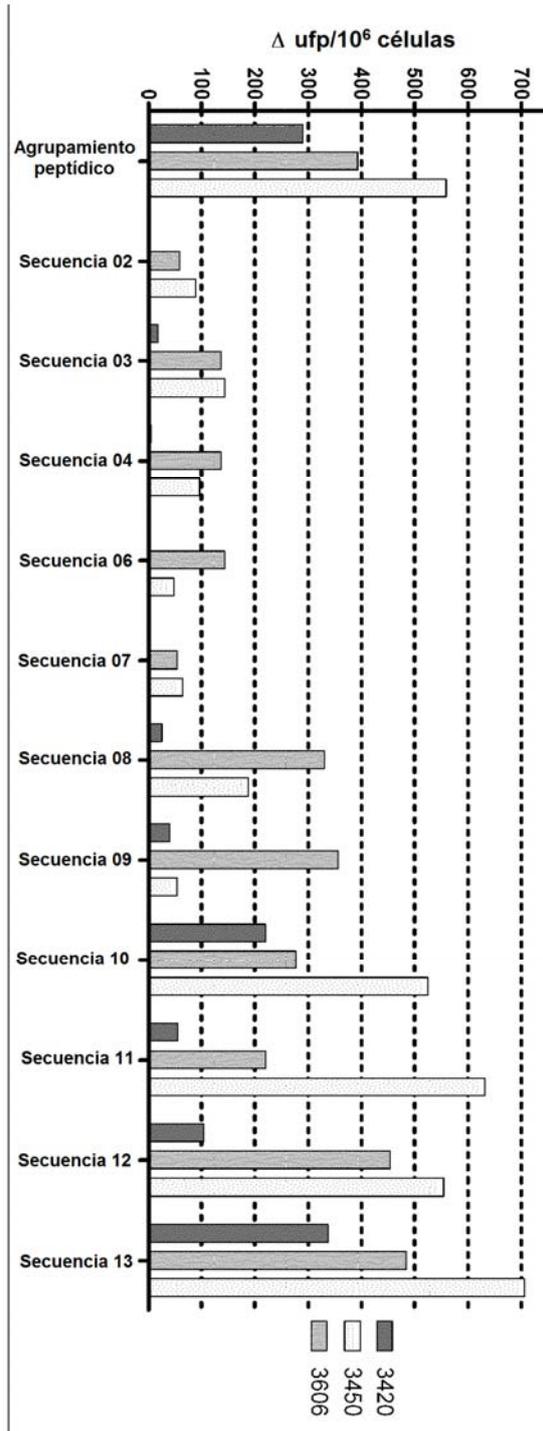


Figura 4

Figura 5

