(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 671 709**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/04 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2008** **PCT/IB2008/003396**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2009** **WO09053844**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2008** **E 08841534 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** **EP 2203182**

(54) Título: **Péptidos y lipopéptidos antigénicos sintéticos derivados de mycobacterium avium subsp. paratuberculosis**

(30) Prioridad:

26.10.2007 EP 07291296

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2018

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (33.3%) y
INSTITUT PASTEUR (33.3%)

(72) Inventor/es:

REYRAT, JEAN-MARC;
BAY, SYLVIE y
BIET, FRANCK

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 671 709 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

Péptidos y lipopéptidos antigénicos sintéticos derivados de *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

La presente invención se refiere al diagnóstico y tratamiento de enfermedades resultantes de infecciones por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Las micobacterias son bien conocidas por su resistencia a los ácidos y su peculiar pared celular rica en lípidos. Las especies patógenas más estudiadas incluyen (i) *M. tuberculosis*, (ii) *M. ulcerans* y (iii) *M. leprae* (OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD), Informe de la OMS 2006 Ginebra, WHO/HTM/TB/2006.2362, 2006; LOCKWOOD y SUNEETHA, Bull World Health Organ, 83, 230 - 235, 2005), la enfermedad que causa los agentes de (i) tuberculosis, (ii) nódulos indolentes no ulcerados, placas y lesiones ulceradas, y (iii) lepra respectivamente.

M. avium subsp. *avium* (Mav) y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) son dos especies estrechamente relacionadas que pertenecen al complejo M. avium-intracellulare (MAC) que incluye también *M. avium* subsp. *intracellulare* (Mai), *M. avium* subsp. *hominissuis* (Mah) y *M. avium* subsp. *sylvaticus* (Mas).

Las infecciones por *Mav* están entre las infecciones oportunistas más frecuentes que se encuentran en pacientes con infecciones respiratorias crónicas y en pacientes que padecen síndrome de inmunodeficiencia adquirida (INDERLIED et al., Clin Microbiol Rev, 6, 266 - 310, 1993; HORSBURGH, N. Engl. J. Med, 324, 1332 - 1338, 1991).

Map es el agente causante de la paratuberculosis o la enfermedad de Johne en rumiantes, y enfermedades similares en otros animales. Esta bacteria es responsable de pérdidas económicas significativas en el sector agrícola en todo el mundo debido a la enfermedad debilitante característica asociada con la infección por esta bacteria. *Map* es una micobacteria de crecimiento lento y requiere unas meticulosas condiciones de cultivo para crecer. En general se necesitan más de 2 meses para obtener una colonia en una placa de Petri, a partir de la cual se pueden realizar estudios bioquímicos o genéticos, y también requiere suplementación con micobactina para su crecimiento (THOREL et al., Int J Syst Bacteriol, 40, 254 - 260, 1990).

Además de los animales de granja domesticados, *Map* infecta también a animales salvajes tales como ciervos rojos, conejos, bisontes y búfalos (BIET et al., Vet Res, 36, 411 - 436, 2005).

Map se dirige al sistema digestivo, lo que conduce a la pérdida de peso y a la muerte (CLARKE, J Comp Pathol, 116, 217 - 261, 1997). Los mecanismos de virulencia de *Map* no están aun totalmente caracterizados, aunque se espera que, mediante la secuenciación de su genoma y la creación de herramientas genéticas, se abrirá el camino para tales estudios.

Aunque en la actualidad están aún por confirmar, se han sugerido también varios informes de que *Map* está asociado con la enfermedad de Crohn en seres humanos (CHACON et al., Annu Rev Microbiol, 58, 329 - 363, 2004).

Pese al hecho de que *Map* y *Mav* inducen fenotipos de enfermedad completamente diferentes, la comparación de sus secuencias genómicas completas ha confirmado que son altamente homólogas y están estrechamente relacionadas (BANNANTINE et al., J Clin Microbiol, 40, 1303 - 1310, 2002).

Esta estrecha relación plantea problemas para la inmunodetección específica de *Map*. Hasta ahora, la detección de anticuerpos de suero contra *Map* se logra usando diferentes fracciones crudas de la bacteria como antígeno (COLLINS et al., Clin Diagn Lab Lab Immunol, 12, 685 - 692, 2005). Sin embargo, pueden presentarse reacciones falsas positivas como resultado de la presencia de bacterias relacionadas en el entorno. Para disminuir los anticuerpos con reacción cruzada y aumentar la especificidad del ELISA, el suero es generalmente preabsorbido con fracciones en bruto de otra micobacteria, *M. phlei* (YOKOMIZO et al., J Vet Med Sci, 53, 577-584, 1991). Sin embargo, este paso suplementario es costoso y lento, y es otra barrera para el establecimiento de una prueba de diagnóstico reproducible.

Las pruebas de diagnóstico dirigidas a la detección de una respuesta inmunitaria temprana (mediada por células T), p. ej. una prueba cutánea y un ensayo de gamma-interferón, adolecen del mismo inconveniente. Los antígenos utilizados rutinariamente para estas pruebas, PPD aviar o de Johnin, producen reacciones no específicas en animales jóvenes (STABEL et al., J Vet Diagn Invest, 8, 469 - 473, 1996).

Los glicopeptidolípidos (GPLs) representan los antígenos principales de *Mav*. Los GPLs pueden representar más del 70% de los lípidos expuestos en la superficie bacteriana y son altamente antigénicos (BILLMAN-JACOBE, Current Science, 86, 11 - 114, 2004). Tienen un núcleo de lipopéptido glicosilado que se modifica de forma variable por metilación y acetilación. Más exactamente, la estructura de GPL se basa en un tripéptido-aminoalcohol (D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala-L-alaninol) unido a un resto acilo graso. Este núcleo de lipopéptido está sustituido con una unidad de 6-desoxitalosilo (dTal) unida al resto *allo*-Thr y con una unidad ramnosilo *O*-metilada unida al residuo de alaninol terminal. El residuo dTal puede ser acetilado en la posición 3 o 4, mientras que el resto acilo graso y el resto ramnosilo se pueden modificar con uno y dos grupos metilo en la posición 3 o 4, respectivamente. En algunos casos,

los GPLs pueden glucosilarse adicionalmente mediante la adición de un apéndice sacarídico adicional en la talosa existente. Se ha demostrado que los GPLs inducen la liberación de prostaglandina E2 y que interfieren con la interacción de las micobacterias con monocitos/macrófagos humanos (BARROW et al., Infect Immun, 63, 126 - 133, 1995; VILLENEUVE et al., J Biol Chem, 278, 51291 - 51300, 2003). Los GPLs también influyen en la agregación bacteriana (DESHAYES et al, J Bacteriol, 187, 7283 - 7291, 2005; ETIENNE et al, Microbiology, 148, 3089 - 3100, 2002) y son necesarios para la motilidad, la formación de biopelículas de deslizamiento y para el mantenimiento de la integridad de la pared celular (ETIENNE et al., Microbiology, 148, 3089 - 3100, 2002; RECHT y KOLTER, J Bacteriol, 183, 5718 - 5724, 2001). El mecanismo de síntesis de GPL implica aproximadamente quince genes. En *M. smegmatis*, estos genes son contiguos y delinean un locus GPL (RIPOLL et al., BMC Genomics, 8, 114, 2007). La mayoría de estos genes han sido caracterizados experimentalmente mientras que la función de otros varios genes se ha deducido *in silico* hasta la fecha.

Los GPLs han sido usados para diagnosticar infecciones por *Mav*, y se han explotado las diferencias en su estructura para clasificar cepas *Mav* relacionadas.

Aunque *Mav* y *Map* están estrechamente relacionados filogenéticamente, ha habido informes contradictorios concernientes a la producción de GPLs por cepas de la subespecie *Map* (LANÉELLE y ASSELINEAU, Biochim Biophys Acta, 59, 731 - 732, 1962; OHENE-GYAN et al ., Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 18, 161 - 170, 1995; CAMPHAUSEN et al., Proc Natl Acad Sci USA, 82, 3068 - 3072, 1985; LANEELLE et al., Bull Soc Chim Biol (Paris), 2133 - 2134, 1965).

Se ha publicado recientemente por ECKSTEIN et al. (ECKSTEIN et al., J Biol Chem, 281, 5209 - 5215, 2006) que la cepa *Map* K-10, que carece de GPLs y le faltan algunos de los genes responsables de su biosíntesis, produce un componente lipídico asociado a la pared celular, llamado Para-LP-01, que está ausente de la cepa *Mav* 2151. Estos autores caracterizaron además Para-LP-01 como un complejo o familia de lipopéptidos, que comprende una mezcla de lipopéptidos que tienen un mismo núcleo pentapéptido (D-Phe-N-Me-L-Val-L-Ile-L-Phe-L-Ala) unido a una serie de ácidos grasos saturados que oscilan desde C16 a C22, y dominados por C20. También probaron la reactividad de una preparación Para-LP-01 contra sueros bovinos de animales infectados o no con *Mycobacterium paratuberculosis*. Entre 6 sueros de animales infectados, 5 reaccionaron positivamente, aunque a niveles distintos, con Para-LP-01; por otra parte, uno entre 3 sueros de animales no infectados reaccionó ligeramente con Para-LP-01. La reactividad de los sueros de animales infectados con micobacterias distintas de *Mycobacterium paratuberculosis* no fue ensayada.

Estos resultados sugieren el papel de Para-LP-01 en la iniciación de una respuesta inmunológica en el hospedador,y eran consistentes con lo que había sido publicado anteriormente con respecto al efecto estimulador de las células T de antígenos lipopeptídicos de *Mycobacterium tuberculosis* por Moody et al. (Science, 303 (5657): 527 – 531 (2004). Moody et al demostraron realmente que los lipopéptidos que se encuentran en las paredes celulares de *Mycobacterium tuberculosis* eran capaces de iniciar una respuesta de las células T en el hospedador. La respuesta de las células T estaba intensamente correlacionada con la longitud y saturación de la cadena acilo graso del lipopéptido, por cuanto los lipopéptidos que tienen ácidos grasos cortos o saturados estaban entre los menos estimuladores.

Los autores de la presente invención han tratado de establecer si la producción de lipopéptidos, y más específicamente de Para-LP-01, era una particularidad de la cepa K-10, o estaba más extendida en *Map*. Para ello, analizaron un panel grande (véase la Tabla 1) de aislados de *Map* bien caracterizados obtenidos de diferentes hospedadores y de diferentes orígenes geográficos (THIBAULT et al., J Clin Microbiol, 45, 2404 - 2410, 2007) para la producción de Para-LP-01.

Encontraron que todos estos aislados *Map* eran capaces de producir compuestos lipídicos, que identificaban usando cromatografía en capa fina y espectrometría de masas MALDI-TOF, de forma similar a Para-LP-01. En cambio, no encontraron estos compuestos en extractos lipídicos de cepas de las especies *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium avium*, utilizadas como testigos.

Por consiguiente, parece que la producción de estos lipopéptidos es un rasgo distintivo entre *Map* y *Mav*, que podría usarse para determinar si un animal ha sido infectado con *Map*.

Sin embargo, estos lipopéptidos obtenidos de cultivos de organismos *Map* eran como máximo de un 85% de pureza. Así pues, no se pudo excluir que la inmunorreactividad de estos compuestos se debía a contaminantes no identificados.

Los inventores han sintetizado por tanto el pentapéptido D-Phe-N-Me-L-Val-L-Ile-L-Phe-L-Ala, unido N-terminalmente a un ácido graso saturado C_{20} (ácido eicosanoico).

Este pentapéptido sintético se designará en adelante como L5P.

Encontraron que la inmunorreactividad de L5P es similar a la de la preparación nativa de Para-LP-01. Además, descubrieron que, sorprendentemente, el ácido graso saturado C_{20} no era necesario para la inmunorreactividad del L5P, y que el pentapéptido solo (designado en adelante como 5P) era reconocido al menos tan eficazmente como todo el L5P, y en algunos casos cada vez mejor reconocido.

Estos hallazgos de los inventores les permiten proponer el uso de 5P o L5P, así como variantes y derivados de los mismos para el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades asociadas a *Map*.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere al uso del péptido sintético 5P que tiene la siguiente fórmula:

DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 1)

para la detección *in vitro* o cuantificación de anticuerpos *Map* específicos en una muestra biológica.

La invención se refiere además al uso de un antígeno elegido entre:

a) un péptido sintético que consiste en:

AcNH-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 9);

b) un péptido sintético que consiste en:

AcNH-DPhe-Val-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 10),

para la detección *in vitro* o la cuantificación de anticuerpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* específicos en una muestra biológica, en donde dicha muestra biológica es de una especie de mamífero elegida entre la lista que consiste en vacas, bisontes y búfalos.

Se describe además en el presente texto el uso de un antígeno elegido entre:

a) un lipopéptido L5P consistente en el péptido sintético a) en donde el resto fenilalanina N-terminal está N-acetilado con una cadena acilo de ácido eicosanoico;

b) una variante del péptido a) o lipoproteína b) capaz de reaccionar con anticuerpos anti-*Map*;

para la detección o cuantificación *in vitro* de anticuerpos anti-*Map* específicos en una muestra biológica.

"Anticuerpos anti-*map* específicos" en el presente texto se refiere a anticuerpos que están dirigidos contra determinantes antigénicos presentes en *Mycobacterium paratuberculosis* y ausentes en otras especies de micobacterias, es decir, dichos anticuerpos reaccionan con *Mycobacterium paratuberculosis* y no presentan reacción cruzada con otras micobacterias. Preferiblemente, dichos anticuerpos pertenecen a la clase IgM, IgG1 o IgG2.

De acuerdo con una realización particular, se proporciona un método para detectar o cuantificar anticuerpos anti-*Map* específicos en una muestra biológica, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un péptido sintético 5P que tiene la siguiente fórmula:

DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 1),

bajo unas condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, y detectar o cuantificar dicho complejo antígeno-anticuerpo.

En el presente texto se describe además un método para detectar o cuantificar anticuerpos anti-*Map* específicos en una muestra biológica, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto elegido entre:

a) un lipopéptido L5P que consiste en el péptido sintético a) en donde el resto fenilalanina N-terminal está N-acetilado con una cadena acilo de ácido eicosanoico;

b) una variante de péptido 5P o lipopéptido L5P capaz de reaccionar con dichos anticuerpos anti-*Map.*

Los ejemplos de variantes de péptido 5P o lipopéptido L5P incluyen los siguientes péptidos:

Phe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 2);

DPhe-Val-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 3);

Phe-Val-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 4);

DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala (SEC ID Nº: 5);

DPhe-Val-Ile-Phe-Ala (SEC ID Nº: 6);

Phe-Val-Ile-Phe-Ala (SEC ID Nº: 7);

Phe-NMeVal-Ile-Phe-Ala (SEC ID Nº: 8).

Otros ejemplos de variantes del péptido 5P o el lipopéptido L5P incluyen las variantes que pueden obtenerse a partir de los péptidos SEC ID Nº: 1 a SEC ID Nº: 8 mediante una o más de las siguientes modificaciones:

a) N-acilación del resto fenilalanina N-terminal con un grupo acilo C1 a C30, preferiblemente un grupo acilo alifático; los ejemplos no limitantes de las variantes N-aciladas preferidas incluyen:

- variantes N-acetiladas tales como:

AcNH-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 9) también designada en adelante como Ac5P;

AcNH-DPhe-Val-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 10)

AcNH-Phe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 11)

AcNH-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 12)

- lipopéptidos derivados de los péptidos SEC ID Nº: 1 a SEC ID Nº: 8 por N-acilación con una cadena acilo de ácido graso saturado o no saturado (es decir, cadena acilo C4 a C28), preferiblemente una cadena acilo de ácido graso C18 a C22, aún más preferiblemente una cadena acilo de ácido eicosanoico;

b) reemplazo del éster metílico del resto alanina C-terminal por otro éster de alquilo, en particular un éster de etilo o éster de butilo, o amidación del resto alanina C-terminal;

c) reemplazo de uno o más de los L-aminoácidos de la cadena peptídica mediante un D-aminoácido;

d) modificación de los enlaces peptídicos con el fin de asegurar una mejor estabilidad del péptido, etc.

En las fórmulas indicadas en el presente texto, los aminoácidos se designan por sus símbolos habituales en el código de tres letras; DPhe designa D-fenilalanina, NMeVal designa valina N-metilada, Ala-OMe designa alanina O-metilada, AcNH-DPhe designa D-fenilalanina N-acetilada.

El péptido 5P así como las variantes del péptido 5P o lipopéptido L5P indicados anteriormente pueden prepararse por procedimientos convencionales para la síntesis de proteínas, tales como, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida.

Si se desea, se pueden marcar o acoplar a un soporte sólido. Los marcadores y los soportes sólidos adecuados para inmunoensayos, y los métodos para marcar péptidos así como para acoplarlos a dichos soportes, son conocidos en sí mismos. Un experto en la técnica elegirá el marcador o soporte más apropiado dependiendo de la técnica que pretenda usar para detectar el complejo antígeno/anticuerpo.

El complejo antígeno/anticuerpo formado se puede detectar o cuantificar mediante una diversidad de métodos utilizando técnicas estándar que incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otros inmunoensayos en fase sólida, radioinmunoensayo, electroforesis, inmunofluorescencia o transferencia Western.

La muestra biológica es preferiblemente una muestra de suero o plasma. También puede ser una muestra fecal o una muestra de leche.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del péptido sintético 5P que tiene la fórmula DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 1) para evaluar *in vitro* la respuesta inmunitaria de las células T dirigida contra *Mycobacterium paratuberculosis*.

La invención se refiere además al uso de un antígeno elegido entre :

a) un péptido sintético que consiste en: AcNH-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 9),

b) un péptido sintético que consiste en: AcNH-DPhe-Val-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 10),

para evaluar *in vitro* la respuesta inmunológica de las células T dirigida contra *Mycobacterium paratuberculosis*, en una muestra biológica, en donde dicha muestra biológica es de una especie de mamífero elegida entre la lista formada por vacas, bisontes y búfalos. Como se ha descrito en el presente texto, el lipopéptido L5P o variantes del mismo, o variantes del péptido 5P como se definió antes pueden también ser usados para evaluar *in vitro* o *in vivo* la respuesta inmunológica de las células T, dirigida contra *Map*. Esto puede hacerse mediante las técnicas usuales para la detección *in vitro* o *in vivo* de la respuesta inmunológica celular.

Por ejemplo, un método *in vitro* que usa el péptido 5P, el lipopéptido L5P, o una variante del mismo para evaluar la respuesta inmunológica de las células T de un individuo con respecto a *Map*, comprende incubar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de dicho individuo con dicho péptido 5P, dicho lipopéptido L5P, o dicha variante, bajo condiciones que permiten la activación de los linfocitos T presentes en dichas PBMC, y detectar los linfocitos T activados.

La detección de los linfocitos T activados se puede llevar a cabo por métodos convencionales, generalmente mediante la determinación de las citoquinas, en particular gamma-interferón, producidas por los linfocitos al tener lugar la activación. De acuerdo con una realización preferida, dicha detección se lleva a cabo mediante un ensayo ELISPOT.

En otro aspecto más, la invención se refiere al uso de un péptido sintético 5P que tiene la fórmula siguiente DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 1) para preparar una composición para detectar respuestas inmunológicas mediadas por células con hipersensibilidad de tipo retardado, contra *Mycobacterium paratuberculosis*.

La invención se refiere además al uso de un antígeno elegido entre :

a) un péptido sintético que consiste en AcNH-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 9),

b) un péptido sintético que consiste en : AcNH-DPhe-Val-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 10), para preparar una composición para detectar respuestas inmunológicas mediadas por células con hipersensibilidad de tipo retardado, contra *Mycobacterium paratuberculosis* en una muestra biológica, en donde dicha muestra biológica es de una especie de mamífero elegida entre la lista que consiste en vacas, bisontes y búfalos.

Para la detección *in vivo*, se puede usar el péptido 5P, el lipopéptido L5P o variantes del mismo para preparar una composición para detectar respuestas inmunitarias mediadas por células de hipersensibilidad de tipo retardado, mediante pruebas cutáneas.

Los métodos descritos en el presente texto son en particular útiles para diagnosticar si un mamífero ha sido infectado con *Map*, y para establecer un diagnóstico diferencial entre la infección con *Map* y la infección con otras micobacterias tales como *Mai, Mav* y *M. bovis*.

Son aplicables a cualquier especie de mamífero propensa a la infección por *Map*, incluyendo en particular animales de granja, tales como vacas, ovejas y cabras, así como animales salvajes tales como ciervos rojos, conejos, bisontes, búfalos, incluyendo también seres humanos.

Los 5P, L5P sintetizados químicamente y derivados de la invención tienen muchas ventajas sobre las preparaciones extraídas o purificadas que se propusieron en la técnica anterior para la detección de *Map*. En particular, permiten evitar que se produzcan reacciones positivas falsas debidas a la contaminación por compuestos compartidos por otras especies de micobacterias. La preparación de péptidos y lipopéptidos sintéticos es menos costosa y puede normalizarse, al contrario que la preparación de extractos crudos que requieren un cultivo complicado de diversas cepas de *Map*. Además, 5P y L5P son mucho más específicos que el extracto de pared celular en bruto de *Map* actualmente empleado como prueba diagnóstica de paratuberculosis, aun siendo tan sensibles, aunque implican un único antígeno.

También se describen *kits* para llevar a cabo los métodos descritos anteriormente, de detección de inmunidad humoral o celular contra *Map*. Estos *kits* comprenden típicamente, además del 5P, L5P o derivado del mismo, otros reactivos que permiten realizar el inmunoensayo.

Como se describe en el presente texto, el péptido 5P, el lipopéptido L5P, o sus variantes también se pueden usar para preparar composiciones inmunogénicas, por ejemplo vacunas dirigidas contra *Map*.

Con este propósito, pueden asociarse con vehículos y/o inmuno-coadyuvantes. Tales vehículos e inmuno-coadyuvantes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los portadores son típicamente grandes macromoléculas tales como proteínas, polisacáridos, copolímeros de aminoácidos o liposomas. Aunque estos vehículos a menudo tienen en sí mismos una función inmuno-coadyuvante, se pueden usar coadyuvantes adicionales, tales como, por ejemplo, sales de aluminio, muramilpéptidos u oligodesoxinucleótidos CpG. La elección

del vehículo o coadyuvante más apropiado depende, en particular, del tipo de respuesta inmunológica que se desea inducir. Por ejemplo, para inducir preferiblemente una respuesta inmunológica humoral, se elegirá alumbre, saponinas o toxinas bacterianas. Para inducir una respuesta inmunológica celular, se elegirán oligonucleótidos que comprenden motivos CpG, o análogos de nucleósidos tales como imidazoquinoleínas.

Si se desea, también se pueden asociar con cualquier otro antígeno de vacuna.

Se describen además anticuerpos dirigidos contra el péptido 5P, el lipopéptido L5P, o sus variantes. Dichos anticuerpos se pueden obtener inmunizando un animal contra el péptido 5P, el lipopéptido L5P o sus variantes. También pueden purificarse mediante afinidad, a partir del suero de animales infectados con *Map*, por ejemplo mediante cromatografía de afinidad usando el péptido 5P, el lipopéptido L5P o sus variantes.

Los autores de la presente invención han identificado además regiones genéticas de *Map* implicadas en la biosíntesis del lipopéptido específico de *Map*, y han diseñado cebadores que permiten diferenciar el *Map* de las micobacterias relacionadas. Este conjunto de cebadores permite la amplificación de la unión *mps1-mps2* en el genoma de micobacterias distintas de *Map,* aunque no da ningún producto de amplificación en cepas de *Map*.

Se describe además un conjunto de cebadores definidos por las siguientes secuencias:

5 'CGA GGA CTT CGG CGA GCC GGT (SEC ID Nº: 13)

5' TCA TGT AGG CGA TGT CGT CGG GC (SEC ID Nº: 14)

Se describe además un método para determinar si una micobacteria pertenece a la familia *Map*, en donde dicho método comprende realizar la amplificación por PCR en una muestra biológica que contiene ácido nucleico procedente de dicha micobacteria, usando un conjunto de cebadores que permiten la detección de la unión *mps1-mps2* en el genoma micobacteriano. Preferiblemente, dicho conjunto de cebadores consiste en un cebador que tiene la secuencia 5' CGA GGA CTT CGG CGA GCC GGT (SEC ID Nº: 13) y un cebador que tiene la secuencia 5' TCA TGT AGG CGA TGT CGT CGG GC (SEC ID Nº: 14).

Se describe además un método para detectar la presencia de *Micobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en una muestra, que comprende las etapas de :

a) amplificación de una mezcla de reacción que comprende ADN aislado de dicha muestra y al menos un conjunto de cebadores para la detección de la unión *gap-mbtH*;

b) amplificación de una mezcla de reacción que comprende ADN aislado de dicha muestra y al menos un conjunto de cebadores para la detección de la unión *mps1-mps2*;

c) determinación de la presencia de *Micobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en una muestra, si se produce en la etapa a) un producto de un tamaño predeterminado, pero ausente de la etapa b).

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante la descripción adicional que sigue, que se refiere a ejemplos que describen la síntesis de antígenos de la invención, y su reactividad específica con anticuerpos anti-*Map*. Debe entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se dan solo a título de ilustración de la invención y no constituyen en modo alguno una limitación de los mismos.

Figuras.

Figura 1. Análisis de cromatografía en capa fina de los extractos crudos de lípidos de *M. smegmatis (Ms)*, *M. avium* subsp. *avium* 104 (*Mav*), *M. avium* subsp. *intracelullare* ATCC 13950 (*Mai*) y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Los números de la cepa de *Map* se refieren a la cepa de números detallada en la Tabla 1. (A) Se hicieron correr TLC en cloroformo/metanol (90:10) y se desarrollaron pulverizando las placas con 0,2% de antrona. (B) Se hicieron correr TLC en cloroformo/metanol (96:4) y los lípidos fueron identificados y desarrollados pulverizando las placas con sulfato de cobre al 10%. Se indican las localizaciones de GPLs y de L5P (puntas de flecha). Las cepas de *Map* Nº 20 a 39 producían patrones similares a las cepas de *Map* presentadas en esta figura (datos no mostrados).

Figura 2. Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de los lípidos nativos de *M. smegmatis* (*Ms*), *M. avium* subsp. *avium* (*Mav*104) y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) y del lipopéptido (L5P) sintetizados químicamente.

Figura 3. Organización genética del locus L5P en *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Las flechas que comprenden una línea horizontal simple son miembros de la familia *mmpSL*, las flechas que comprenden líneas horizontales verticales están implicadas en la biosíntesis, activación, transferencia y modificación del azúcar, las flechas que comprenden líneas diagonales están implicadas en biosíntesis y activación de lípidos.

Figura 4. Inmunogenicidad del L5P. A). ELISA realizado en lipopentapéptido (L5P) y derivados de proteína purificados (PPD) usando sueros de bovinos y cabras infectados naturalmente con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: B). ELISA realizado en L5P y PPD utilizando sueros de ratones infectados experimentalmente con *M. avium* subsp. *avium*, sueros de bovinos infectados naturalmente con *M. bovis*, sueros de seres humanos infectados naturalmente con *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *intracellulare*. Los resultados se expresan como los valores medios de triplicados.

Figura 5. Isotipificación de la Ig en sueros de animales infectados *con M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). A) Actividad del anticuerpo IgG1 anti-lipopentapéptido (L5P), B) actividad del anticuerpo IgG2 anti-L5P y C) actividad del anticuerpo IgM anti-L5P. Dilución en serie al 1/2 de sueros reactivos de dos bovinos diferentes, infectado por *Map* naturalmente. Cada animal está representado por un color distinto.

Figura 6. Inmunorreactividad del pentapeptidilo (5P) o los restos lipídicos del lipopentapéptido. A) Bovinos infectados naturalmente con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), B) cabras infectadas naturalmente con *Map*. Dilución en serie al 1/2 de sueros reactivos de dos animales, infectados naturalmente con *Map*.

Figura 7. Antigenicidad del L5P y derivados. Se realizó el ELISA en lipopentapéptido 1 (L5P), derivados 4 (SEC ID Nº: 1) y 8 (SEC ID Nº: 10) usando sueros de bovinos y de cabras infectados naturalmente con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Los resultados se expresan como los valores medios de triplicados.

EJEMPLO 1: La producción de un lipopentapéptido es un distintivo de las cepas *map*.

Para ensayar si todas las cepas *Map* producen lipopéptidos, se analizó un gran panel de aislados de *Map* (véase la Tabla 1). Esta colección de *Map* consiste en aislados provenientes de diversos animales (vaca, oveja, cabra, ciervo rojo, conejo) y seres humanos, y de diversos orígenes geográficos (Argentina, República Checa, Italia, Países Bajos, Reino Unido, EE. UU., Eslovenia) (THIBAULT et al., J Clin Microbiol, 45, 2404 - 2410, 2007). Para añadir un nivel de diversidad de cepas, se incluyeron aislados que tenían perfiles distintos de mini satélite y RFPL (*IS*900). También se incluyeron *M. smegatis* mc^2155 y *Mav* 104 como cepas de control productoras de GPL.

M. smegmatis mc^2155, las cepas *Mav* y las cepas *Map* se cultivaron todas ellas en 7H9 suplementado con 10% de ADC a 37 °C. Para *Map* se añadió también Mycobactin J (2 µg/ml) (Institut Pourquier, Montpellier, Francia). Todos los cultivos bacterianos se desarrollaron hasta la fase estacionaria. *Mav* 104 y *Map* K-10 fueron suministrados por R. Barletta de la Universidad de Nebraska.

Se extrajeron los lípidos de las células con una mezcla de cloroformo y metanol como se describió previamente (VILLENEUVE et al., J Biol Chem, 278, 51291 - 51300, 2003). Los GPL y los lipopéptidos se identificaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de gel de sílice previamente cubiertas con Durasil 25 (Macherey-Nagel) en cloroformo-metanol (90:10 y 96:4 [vol/vol], respectivamente) (VILLENEUVE et al. al., J Biol Chem, 278, 51291 - 51300, 2003). Los GLPs que contenían azúcar se revelaron pulverizando las placas con 0,2% de antrona en ácido sulfúrico concentrado (ETIENNE et al., Microbiology, 148, 3089 – 3100, 2002), mientras que los lipopéptidos se detectaron usando sulfato de cobre al 10% en ácido fosfórico al 8%; entonces los lípidos se visualizaron calentando a 110 ºC. La identificación de los lípidos se confirmó por análisis de espectrometría de masas de desorción/ ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

Como se muestra en la Figura 1A, las cepas *Ms* y *Mav* produjeron lípidos similares a los GPLs. Todos los iones pseudomoleculares asociados a GPL ($[M + Na]^+$) detectados en estas cepas coincidían perfectamente con el peso molecular calculado de los GPLs descritos anteriormente para estas cepas (Figura 2) (ETIENNE et al., Microbiology, 148, 3089 - 3100, 2002; ECKSTEIN et al., J Biol Chem, 2005; MCNEIL et al., J Biol Chem 262 (6): 2630 - 5, 1987; BRENNAN et al., J Biol Chem 254 (14) 4205-11, 1979).

En consecuencia, los GPLs producidos por *Ms* correspondieron principalmente a la forma diglicosilada de los GPLs no específicos (nsGPLs), lo que confirma trabajos anteriores (VILLENEUVE et al., J Biol Chem, 278, 51291 - 51300, 2003; ETIENNE et al., Microbiology, 148, 3089 - 3100, 2002). *Mav* 104 (serotipo 1) produjo nsGPLs apolares, pero también GPLs triglicerilados específicos de serovar (ssGPLs) (Tabla 2). Curiosamente, ninguna de las cepas de *Map* probadas produjo GPLs como se observó por TLC (Figura 1A). Esta falta de producción de GPLs se observó incluso cuando se usaron técnicas especializadas de extracción de lípidos que se habían adaptado a *Map* (CAMPHAUSEN et al., Proc Natl Acad Sci USA, 82, 3068 - 3072, 1985).

Estos extractos lipídicos fueron también analizados utilizando la espectrometría de masas MALDI-TOF, un método altamente sensible y preciso para detectar y caracterizar los metabolitos parietales. No se detectó ningún ion pseudomolecular que correspondiera posiblemente a GPL en los extractos de lípidos de *Map*, confirmando los resultados de TLC. Sin embargo, fue fácilmente detectable un pico iónico pseudomolecular $[M + Na]^+$ a *m/z* 940,73 unidades de masa atómica (Fig. 2). Esta señal, que da cuenta del lipopentapéptido Para-LP-01 descrito en *Map* K-10 (ECKSTEIN et al., J Biol Chem, 281, 5209 - 5215, 2006), fue detectada en todas las cepas *Map* incluyendo la cepa de vacuna 316F. Esto llevó a los autores de la presente invención a analizar los extractos de lípidos de todas las cepas de *Map* utilizando las condiciones de TLC reportadas por ECKSTEIN et al. como específicas de Para-LP-01.

Se detectó un compuesto similar a Para-LP-01 en todas las cepas *Map* (Figura 1B y datos no mostrados), incluso si la mancha era apenas detectable en algunos casos (p. ej. la línea 2 o 4 ~ 6, Figura 1B). Este compuesto fue purificado de acuerdo con ECKSTEIN et al. (Figura 1B) y analizado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Mostró un pico iónico $[M + Na]^+$ pseudomolecular importante a *m/z* 940,73, y además picos iónicos menores que difieren en 14 unidades de masa atómica, es decir, una unidad de metileno (datos no mostrados), que podría asignarse a la variabilidad en la longitud de cadena del resto acilo graso del lipopentapéptido. Estas moléculas eran estables a los álcalis (datos no mostrados), una característica de los lípidos con grupos acilo grasos unidos a N tales como GPL y lipopéptidos (BELISLE et al., J Biol Chem, 268, 10517 - 10523, 1993). Finalmente, el espectro de ^1H RMN del lipopentapéptido purificado se presenta idéntico al del L5P sintético (véase a continuación) y al publicado por ECKSTEIN et al. (datos no mostrados). Este conjunto de experimentos confirma que *Map* no produce GPLs, sino que produce en su lugar compuestos lipídicos con una masa compatible con los lipopentapéptidos que se han descrito en el pasado (LANEELLE y ASSELINEAU, Biochim Biophys Acta, 59, 731 - 732, 1962; OHENE-GYAN et al., Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 18, 161 - 170, 1995; CAMPHAUSEN et al., Proc Natl Acad Sci USA, 82, 3068 - 3072, 1985; LANEELLE et al., Bull Soc Chim Biol (París), 2133 - 2134, 1965; ECKSTEIN et al., J Biol Chem, 281, 5209 - 5215, 2006).

En conclusión, el análisis de este gran panel de cepas clínicas indicó que la producción de un lipopentapéptido es un distintivo de la subespecie *paratuberculosis* que la distingue fácilmente de *Mav*.

Ejemplo 2: Identificación del locus genético implicado en la síntesis de lipopéptidos cepas *Map*.

Todas las cepas *Mav* se caracterizan por la producción de glicopéptidolípido aunque, como se muestra anteriormente, solo las cepas *Map* producen un lipopentapéptido. Se puede apreciar la relación estructural entre el GPL y el lipopentapéptido, estando ambos compuestos formados por un resto acilo graso unido en N a un oligopéptido corto, del cual el primer aminoácido es una fenilalanina de la serie D. Por otra parte, se puede ver una serie de diferencias. En primer lugar, el lipopentapéptido está constituido por 5 aminoácidos, ninguno de los cuales contiene un grupo hidroxilo libre. En segundo lugar, al contrario que el GPL, el ácido graso del lipopentapéptido es más corto, es saturado y no está metilado. El locus GPL está bien descrito en *Mav* y en varias micobacterias de crecimiento rápido. En consecuencia, los presentes autores investigaron si estaba presente un locus de tipo GPL en *Map*.

En la mayoría de los casos, un ortólogo de cada uno de los bloques de construcción de la biosíntesis de GPL estaba presente en *Map*. Este fue el caso de la región similar a *pks-gap* que interviene en la biosíntesis del ácido graso, activación y transferencia en el resto peptidilo. Este fue también el caso para *mmpS4*, *mmpLa* y *mmpL4b* que se cree que juegan un papel en la biosíntesis y la exportación de los GPLs. Sin embargo, varios genes se perdieron o se inactivaron por mutación. *Rmt2*, y *3* que están implicados en la metilación de la unidad de ramnosilo en *Mav* estaban ausentes. La glicosiltransferasa (*gtf1, gtf2* y *gtf3*) estaba presente y era aparentemente funcional. El hecho de que el lipopentapéptido no esté glicosilado probablemente estriba en la ausencia de un grupo hidroxilo libre en los aminoácidos. El gen *fmt* que está involucrado en la metilación del resto de ácido graso de los GPLs contenía una deleción grande (438/822 nt) en *Map*, lo que probablemente conduce a una enzima inactiva. Esta observación es consistente con el hecho de que el resto acilo graso del lipopentapéptido no está metilado.

La organización genética del locus L5P en *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) se esquematiza en la Figura 3.

Una característica distintiva principal en Map es el operón potencial putativo *mbtH-mps1-mps2*, que se divide en 2 regiones en esta especie. Además, tanto los genes *mps1* como *mps2* son sorprendentemente más grandes en esta especie, aproximadamente un 50% más grandes que en las especies productoras de GPL. En *Mav*, pero también en *Ms*, *M. chelonae* y *M. abscessus*, los genes *mps1* y *mps2* son responsables de la síntesis del resto peptidilo del GPL. Estos genes pertenecen a la familia de síntesis de proteínas no ribosómicas (nrp). Las enzimas de esta familia son muy grandes (> 3000 aminoácidos) y están involucradas en la síntesis de compuestos farmacéuticos tales como la vancomicina y la ciclosporina. Nrp se compone de módulos que son responsables de la selección, la modificación y la formación de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos de los péptidos sintetizados no ribosomalmente. El número y el orden de los módulos generalmente reflejan el número y la secuencia del péptido sintetizado. En *Ms* y *Mav*, los genes *mps1* y *mps2* codifican colectivamente 4 módulos, de los cuales los tres primeros contienen un dominio de epimerasa que convierte un L-aminoácido en la forma D no natural. Por tanto, el número y la estructura de los módulos está de acuerdo con la estructura del tetrapéptido producido por *Ms* y *Mav*, que es D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala-L-Alaninol. Un análisis bioinformático de la composición de dominio de la proteína Mps1 de *Map* K-10 muestra que está hecho de 5 módulos y por tanto codifica potencialmente una proteína que tiene la capacidad de sintetizar un pentapéptido. El análisis *in silico* de la composición del dominio de estos módulos sugiere que el primer aminoácido debe ser una forma D (aparición de un dominio epimerasa) y el segundo aminoácido debería ser una forma L N-metilada (aparición de un dominio de metilación) mientras que los otros 3 aminoácidos deberían ser de una forma L no modificada. Contrariamente al gen *mps1* de *Ms* y *Mav*, un dominio TE que es responsable de la liberación de la cadena peptídica (LAUTRU y CHALLIS, Microbiology, 150, 1629 - 1636, 2004) es claramente identificable en *Map*. La proteína Mps2 de *Map* K-10 tiene un contenido de módulo que permite la síntesis de un tripéptido, el primer aminoácido debe ser una forma D. En conclusión, el módulo y la composición de dominio de las

proteínas Mps1 y Mps2 de *Map* son drásticamente diferentes de los de *Ms* y *Mav*. Además, dependiendo de si las proteínas Mps1 y Mps2 actúan colectivamente, *Map* tiene el potencial de producir un lipooctapéptido (L8P) o un lipopentapéptido más eventualmente un lipotripéptido.

Posteriormente se ensayó si el locus genético encontrado en *Map* K-10 se conservaba también en varios aislados de *Map*. Se diseñaron cebadores que permiten la distinción entre GPL y productores de lipopentapéptidos y se usaron para investigar mediante PCR todas las cepas caracterizadas previamente por la producción de lipopentapéptidos.

Se diseñaron oligonucleótidos que se hibridan con los genes *mps1* y *mps2* (amplificando la unión *mps1-mps2*): 5'mps1S como directo 5' CGA GGA CTT CGG CGA GCC GGT (SEC ID Nº: 13) y 3' mps2 como inverso 5' TCA TGT AGG CGA TGT CGT CGG GC (SEC ID Nº: 14). Como control, se diseñaron también oligonucleótidos que se hibridan con los genes *gap* y *mbtH* (amplificando la unión *gap-mbtH*): gap-mbtH como directo (5' ATT GAG CGC AGC CAG CAT CCC CAA GCC C) SEC ID Nº: 15, gap-mbtH como inverso (5' TTG ACC AGG ACG AAA AAT CGG CCG CC) SEC ID Nº: 16.

La mezcla de PCR se compuso de la siguiente manera usando la ADN polimerasa Go Taq Flexi (Promega). Se añadieron dos microlitros de soluciones de ADN 10 µg ml^{-1} a un volumen final de 25 µL conteniendo 0,25 µL de ADN polimerasa Go Taq Flexi (5 U), 5 µL de solución Q, 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dATP (Promega), 5 µl de tampón de PCR 5X, cebadores 1 µM y $MgCl_2$ 1,5 mM. Las reacciones se llevaron a cabo usando una máquina de ciclado térmico iCycler (BioRad). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 94 ºC, 30 segundos a 58 ºC y 30 segundos a 72 ºC; y 1 ciclo de 7 min a 72 ° C.

Mientras que la amplificación por PCR con 5'mps1S y 3'mps2 da una banda del tamaño correcto (1618 pb) en los productores de GPL (*Ms, Mav, Mai*), no se observa ninguna banda en el caso de las cepas *Map*. En cambio, la amplificación con oligonucleótidos que se hibridan con los genes *gap* y *mbtH* da una banda del tamaño correcto (1618 pb) en todas las cepas *Map* ensayadas. La ausencia de amplificación en *Map* se debe a la larga distancia que separa los genes *mps1* y *mps2* en esta subespecie. Estos datos muestran que los genes *mps1* y *mps2* están desconectados en todas las cepas *Map* analizadas y sugieren que esta peculiar organización genómica es un distintivo de las cepas *Map*, a pesar de la variabilidad existente entre aislados (mini satellite y RFLP).

Otro objetivo era confirmar que se produce L5P por la totalidad de subespecies *Map* incluyendo aislados de cerdo y oveja del tipo S. Por consiguiente, los autores de la presente invención recogieron cepas y realizaron PCR en el locus L5P putativo. Como se describió anteriormente, la amplificación con oligonucleótidos que se hibridan con los genes *gap* y *mbth* da una banda de un tamaño de 1618 pb correspondiente al locus L5P que es un distintivo de la subespecie *Map*. Este resultado sugiere que L5P se produce también en cepas tipo S atípicas, y puede usarse en pruebas de diagnóstico para todas las subespecies *Map*.

En conclusión, este análisis muestra que la subespecie *Map* se puede distinguir fácilmente de la subespecie *Mav* mediante un simple ensayo de PCR, y que esta organización se correlaciona estrictamente con la producción del lipopentapéptido.

Ejemplo 3: El lipopentapéptido es el objetivo de una respuesta inmunológica humoral específica en animales infectados con *Map*.

Se purificó una pequeña cantidad de lipopentapéptido a partir de un cultivo de *Map* con el fin de evaluar su reactividad contra sueros de animales infectados.

El lipopentapéptido se purificó como se describe previamente por Belisle et al (BELISLE et al., J Biol Chem, 268, 10510 - 10516, 1993) con algunas modificaciones. Brevemente, después de extraer los lípidos de los sedimentos de células (VILLENEUVE et al., J Biol Chem, 278, 51291 - 51300, 2003), la fracción lipídica total lavada se hidrolizó con KOH 0,1 N a temperatura ambiente para seleccionar lípidos estables en álcalis. Estos lípidos se cromatografiaron después en una columna Florisil (malla 60 - 100) (1,5 x 25 cm) regada con cloroformo y luego con un gradiente por etapas de concentraciones crecientes de metanol en cloroformo. La purificación del lipopéptido se logró a partir de la fracción de metanol al 2% en cloroformo mediante cromatografía en capa fina preparativa (ECKSTEIN et al., J Biol Chem, 281, 5209 - 5215, 2006).

El lipopentapéptido purificado mostró una alta reactividad contra los sueros (datos no mostrados), lo que sugiere una posible utilidad en el diagnóstico de paratuberculosis. Sin embargo, se presentaron dos inconvenientes principales. En primer lugar, el lipopentapéptido purificado tenía solo un 85% de pureza y por tanto no podía excluirse que la serorreactividad se debiera a contaminantes. En segundo lugar, purificar el lipopentapéptido era realmente una tarea desafiante y el rendimiento de la recuperación no era compatible con una tecnología de diagnóstico de alto rendimiento. Para soslayar estos problemas, el lipopentapéptido se sintetizó químicamente mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando la química Fmoc, que permite la producción a gran escala de lipopentapéptido puro.

Síntesis de L5P.

El lipopéptido (L5P) se sintetizó manualmente usando el protocolo de química de Fmoc estándar sobre una resina de 4-hidroximetilbenzoílo (resina HMBA-AM, Novabiochem). El ácido eicosanoico (L) se adquirió de Acros Organics. Brevemente, el aminoácido C-terminal (Fmoc-Ala-OH) se unió a la resina usando el anhídrido simétrico (5 equiv). Después de 30 minutos de acoplamiento, la sustitución de la resina se estimó por análisis UV de una muestra de resina. Después de tapar con Ac_2O en DMF, los siguientes aminoácidos protegidos con N^{α}-Fmoc y el ácido eicosanoico (3 equivalentes) se incorporaron a la cadena peptídica usando DMF como disolvente y hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU)/*N, N*-diisopropiletilamina (DIEA) como reactivos de acoplamiento. La protección de Fmoc se eliminó con 20% de piperidina en DMF. El producto se escindió de la resina en DMF/MeOH/ DIEA (5/5/1 v/v/v) durante 16 horas a 60 °C. Después de la purificación del producto crudo en una columna de gel de sílice usando CH_2Cl_2/MeOH como eluyente (de 100/0 a 97/3), se obtuvieron 27 mg del lipopéptido L5P (60% de rendimiento basado en la sustitución de resina Fmoc-Ala).

El compuesto se caracterizó por espectrometría de masas (Q-Tof Micro Waters) y RMN (instrumento Bruker 400MHz). Aunque la masa y los espectros de ^{1}H RMN se ven idénticos a los publicados por ECKSTEIN et al., se encuentran diversas discrepancias en las asignaciones de señales de RMN. Se presentan a continuación las asignaciones detalladas de los autores de la presente invención.

ESMS para $C_{54}H_{87}N_5O_7$ (calculado 917,6606) m/z 918,6778 [M + H^+], 940,6540 [M + Na^+].

^{1}H RMN (MeOD): δ 0,53 (d, 1H, CH_3γ Val, J = 6,63Hz); 0,79 - 0,83 (m, 9H, CH_3γ Val, CH_3δ Ile, CH_3γ Ile); 0,93 (t, 3H, CH_3 lipido, J = 6,6 Hz); 1,03 (m, 1H, 1 CH_2γ Ile); 1,22 - 1,35 (m, 33H, 16 CH_2 lípido, 1 CH_2γ Ile); 1,37 (d, 3H, CH_3β Ala, J = 7,27Hz); 1,45 - 1,55 (m, 2H, CH_2 CH_2CO lípido); 1,77 (m, 1H, CHβ Ile); 2,06 - 2,21 (m, 3H, Iıpido CH_2CO, CHβ Val); 2,88 - 2,96 (m, 2H, 1 CH_2β D-Phe, 1 CH_2β Phe); 3,04 (s, 3H, NCH_3); 3,02 - 3,05 (1H, 1 CH_2βD-Phe); 3,12 - 3,17 (dd, 1H, 1 CH_2β Phe, $J_{1\ CH2\beta,\ 1\ CH2\beta}$ = 14,03 Hz); 3,70 (s, 3H, O CH_3); 4,19 (d, 1H, CHαIe, J = 7,45 Hz); 4,40 (q, 1H, CHα Ala); 4,46 (d, 1H, CHα Val, J = 11,02 Hz); 4,69 (dd, 1H, CHα Phe, $J_{CH\alpha,\ 1CH2\beta}$ = 5,69Hz, $J_{CH\alpha,\ 1\ CH2\beta}$ = 8,74 Hz); 5,19 (t, 1H, CHα D-Phe, J = 7,58 Hz); 7,18-7,28 (10H, Ph).

^{13}C RMN (MeOD): δ 10,31 (CH3δ Ile); 13,41 (CH_3 lípido), 14,93 (CH_3γ Ile); 16,50 (CH_3β Ala); 18,07, 19,10 (CH_3γ Val); 22,71 (lípido CH_2); 24,62 (CH_2γ Ile); 25,84 (Iıpido CH_2CH_2CO); 26,41 (CHβ Val); 29,24, 29,42, 29,44, 29,53, 29,69, 29,75, 32,05 (Iıpido CH_2); 30,67 (NCH_3); 35,75 (Iıpido CH_2CO), 37,09 (CHβ Ile); 37,83 (CH_2β Phe); 38,43 (CH_2β D- Phe); 48,42 (CHα Ala); 51,09 (CHα D- Phe); 51,73 (OCH_3); 54,49 (CHαPhe); 57,69 (CHαIle)); 63,29 (CHα Val); 128,10, 128,36, 129,81, 129,99, 130,76, 130,85, 138,37, 138,67 (Ph); 171,98 (CO Val); 173,32 (CO Phe); 173,55 (CO Ile); 174,67 (CO Ala) , 175,32 (CO D-Phe); 175,77 (CO lípido).

Para ensayar si el L5P sintético era reconocido por el suero de animales infectados, se probó en ELISA frente a un panel de sueros de animales infectados por *Map* o por *M. bovis* o por *Mav*. Se usaron sueros humanos de pacientes infectados por *Mav* y *Mai* como control negativo. Se usó como control positivo PPD (derivado parcialmente purificado), un extracto de pared celular crudo de *Map* ampliamente empleado como prueba diagnóstica de paratuberculosis. El PPD se produjo a partir de muestras obtenidas de Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, Países Bajos. El PPD se preparó usando el método de Seibert FB, Am Rev Tuberc, 44: 9 - 24, 1941.

Para la isotipificación adicional de la inmunoglobulina producida contra el L5P, se usó un panel de anticuerpos secundarios que reconocen específicamente IgA, IgM, IgG1 o IgG2.

Ensayo ELISA.

Se obtuvieron sueros de rumiantes infectados por *Map* o por *M. bovis*. Los diagnósticos se establecieron mediante ELISA (Bovigam Prionics Zurich Suiza y ELISA Paratuberculosis, Institut Pourquier Montpellier Francia) y cultivo positivo para *Map* o *M. bovis*. Los sueros de seres humanos infectados por *Mav* o por *Mai* fueron proporcionados por Pr. Alain Goudeau (Hôpital Bretonneau, Tours, Francia). Para el ELISA, se recubrieron placas de microtitulación Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 50 µL de PPD a razón de 25 mg/ml en PBS a 37 °C durante la noche o se cargaron en cada pocillo 50 µg de L5P sintético suspendido en metanol y se secaron al aire. Se añadieron diluciones en serie al 1/2 de antisueros en PBS/Tween que contenían 0,5% (p/v) de gelatina, a las placas recubiertas con PPD o L5P. Las placas se lavaron cinco veces con PBS/Tween y se incubaron durante 90 min a 37 °C con 50 µL de IgG anti-rumiante conjugada con peroxidasa (Dr. Bommeli AG, Berna, Suiza) en una dilución 1/600, IgM anti-bovina de oveja, conjugada con peroxidasa (Serotec Oxford, Reino Unido) (1/100.000), IgG anti-Ig humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante, (GAHu/Ig/PO Nordic Immunological Laboratories, Países Bajos) (1/500), IgG1 anti-bovina de ratón (KPL Gaithersburg, Maryland, EE. UU.) (1/5.000), IgG2 de ratón (KPL Gaithersburg, Maryland, EE. UU.) (1/200) y IgA anti-bovina/ovina de ratón (Serotec Oxford, RU) (1/250) y se incubaron 90 min a 37 ºC con 50 µL de IgG + IgM anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa (H + L) (Jackson Immunoresearch, Baltimore, EE. UU.). Las placas se lavaron cinco veces con PBS/Tween y se añadieron 50 µL de sustrato de peroxidasa. La reacción se detuvo con 50 µL de HCl 2 N, y las placas se leyeron fotométricamente a 414 nm.

Como se muestra en la Figura 4A, los sueros de animales infectados con *Map* reaccionaron con el L5P sintético (OD superior a 1,5) y la sensibilidad fue similar a PPD. Por el contrario, no se obtuvo ningún O.D. significativo (O.D. por

debajo de 0,2) con sueros de animales bovinos infectados con *M. bovis* o de pacientes humanos infectados con *Mav* o *Mai*, en contraste con PPD que reaccionó con todos estos sueros, demostrando la muy baja especificidad de esta prueba. Además, los autores de la presente invención ensayaron ratones que fueron infectados experimentalmente con *Mav* y, en todos los casos, sus sueros presentaron reacción cruzada con PPD, mientras que ninguno reaccionó con L5P (Fig. 4B).

En conclusión, el L5P muestra una sensibilidad que es similar a la del antígeno PPD, pero demuestra ser mucho más específico que el PPD, permitiendo el diagnóstico específico y de bajo coste de la infección por *Map*.

Aunque no se detectó IgA (datos no mostrados), una mezcla compuesta hecha de IgM, IgG1 e IgG2 estaba presente en los sueros de los animales infectados (Figura 5).

Ejemplo 4: La respuesta humoral implica IgM, IgG1 e IgG2 y dirige al resto pentapeptidilo del L5P.

Seguidamente los autores de la presente invención intentaron determinar el resto de L5P que fue el objetivo predominante de la respuesta humoral del hospedador. Se obtuvo un péptido acetilado (Ac5P) con un protocolo similar al utilizado para L5P, con una acetilación final en vez de la última etapa de acoplamiento con el ácido eicosanoico.

L5P, Ac5P y el resto de ácido eicosanoico de L5P fueron ensayados individualmente frente a sueros de animales infectados con *Map*. Los resultados se muestran en la Figura 6.

El ELISA de sueros de bovino o caprino que son infectados con *Map* mostró que el resto peptídico es altamente reactivo. El pentapéptido acetilado fue reconocido tan eficientemente como el L5P por los animales infectados por *Map*. En algunos casos, el pentapéptido fue incluso mejor reconocido que el L5P entero. De forma consistente con esta observación, el resto lipídico fue escasamente reconocido por el suero del hospedador (Figura 6). En conclusión, este conjunto de experimentos demuestra que los principales epítopes del L5P están basados en péptidos.

Ejemplo 5: Preparación y ensayo de análogos de L5P.

Con el fin de optimizar la prueba diagnóstica específica de *Map*, es decir para mejorar la sensibilidad y la especificidad de la detección, se enfocó el interés sobre la identificación de la mejor imitación sintética del antígeno o antígenos Map nativos (es decir, la estructura química “necesaria y suficiente”), partiendo del L5P como “compuesto de referencia”.

Por consiguiente, se prepararon diversos análogos (véase la Tabla 3) del lipopentapéptido L5P llevando a cabo modificaciones específicas de su estructura química.

El reconocimiento de los compuestos 4 (5P: grupo amino N-terminal libre; SEC ID Nº: 1), 8 (SEC ID Nº: 10) y 9 - 10 (SEC ID Nº: 20 y 12) (grupo carboxílico C-terminal libre) fue analizado mediante ELISA. Estos análisis usando antisuero específico de *Map* procedente de animales bovino y caprino infectados indican que todos los compuestos reaccionan específicamente. La mejor respuesta antigénica se obtuvo con el compuesto 4 (5P) que puede ser retenido como un hapteno para la conjugación con proteína con el fin de mejorar la sensibilidad del inmunoensayo. Resultados preliminares sugieren que, en comparación con L5P (1), 4 permite una sensibilidad más alta para la detección de anticuerpos específicos de *Map* (Figura 7).

Tabla 1: Descripción de las cepas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) usadas en este estudio.

Nº	número de lab de cepas *Map*	Origen del hospedador	País de origen	Perfiles minisatélite[1]	Perfiles IS900 RFLP[1]
1	(K-10) ATCC BAA-968	Bovino	EE. UU.	INVM 2	R01
2	ATCC 19698	Bovino	EE. UU.	INVM 2	R01
3	(Linda) ATCC 43015	Humano	EE. UU.	INVM 2	R10
4	7912	Bovino	Francia	INVM 9	R01
5	316F[2] Weybridge	Bovino	RU	INVM 17	R01
6	316F[2] Merial	Bovino	Francia	INVM 2	C7
7	13	Bovino	Francia	INVM 6	R01
8	20	Bovino	Francia	INVM 2	C18
9	47	Bovino	Francia	INVM 7	C18
10	54	Bovino	Francia	INVM 4	R01
11	60	Bovino	Francia	INVM 5	C2
12	64	Bovino	Francia	INVM 6	R01
13	85	Bovino	Francia	INVM 3	R01
14	104	Bovino	Francia	INVM 2	R01
15	115	Bovino	Francia	INVM 2	C
16	159	Bovino	Francia	INVM 8	R01
17	186A	Caprino	Francia	INVM 1	R01
18	190	Caprino	Francia	INVM 1	R01
19	199	Ovino	Francia	INVM 2	R01
20	200	Ovino	Francia	INVM 2	R24
21	201	Humano	Países Bajos	INVM 9	R01
22	205	Bovino	Suecia	INVM 13	R13
23	210	Bovino	Países Bajos	INVM 2	R35
24	218	Bovino	Países Bajos	INVM 2	R25
25	220	Bovino	Países Bajos	INVM 2	R01
26	225	Bovino	Argentina	INVM 1	R09
27	226	Bovino	Argentina	INVM 11	R31
28	231	Ciervo rojo	República Checa	INVM 1	R34
29	234	Bovino	Venezuela	INVM 3	R04
30	247	Gamo	República Checa	INVM 34	R10
31	267	Conejo	RU	INVM 33	R01
32	282	Bovino	Italia	INVM 2	R01
33	284	Bovino	Venezuela	INVM 3	R04
34	286	Bovino	Eslovenia	INVM 33	R06
35	289	Conejo	RU	INVM 33	R09
36	290	Bovino	Países Bajos	INVM 33	R09
37	304	Ciervo	Argentina	INVM 8	R10
38	310	Bovino	Países Bajos	INVM 2	R22
39	335	Bovino	Países Bajos	INVM 1	R24
40	6756	Ovino	Nueva Zelanda	ND	S1
41	6758	Ovino	Nueva Zelanda	ND	S1
42	P133/79	Ovino	Islas Feroe	ND	S3
43	6759	Ovino	Nueva Zelanda	ND	S5
44	85/14	Ovino	Canadá	ND	S6
45	LN20	Porcino	Canadá	ND	S2

[1] Los métodos de tipificación han sido descritos en Thibault et al. (THIBAULT et al., J Clin Microbiol, 45, 2404 - 2410, 2007).

[2] Cepa de vacuna.

Tabla 2. Identificación de los metabolitos de lipídos producidos por las cepas micobacterianas mediante espectrometría MALDI-TOF. ns: no signiticativo; nd: no detectado; *Ms: M. smegmatis*; *Mav: M. avium* subsp. *avium* 104; *Map*: *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K10.

	Principales picos iónicos ($[M + Na]^+$) pseudomoleculares			
	nsGPLs		ssGPLs	lipopentapéptido
	forma diglicosilada	forma triglicosilada		
Ms	1257,90	ns	nd	nd
Mav	1295,93	nd	1574,09	nd
Map	nd	nd	nd	940,73

Tabla 3. Variantes químicos de L5P.

Antígeno sintético (Abreviatura) [a]	Número derivado	SEC ID Nº:	Objetivo a ensayar:
LípidoC20-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (L5P)	1[b]	17	Compuesto de referencia
AcNH- DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (Ac5P)	2[b]	9	Especificidad atribuible al lípido?
LípidoC20 (L)[c]	3[b]	N/A	Especificidad atribuible al esqueleto peptídico?
DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe[e] (5P)	4	1	Especificidad atribuible al lípido?
LípidoC20-**Phe**-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe	5	18	Especificidad atribuible al (D)Phe?
AcNH-Phe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe	6	11	Especificidad atribuible al lípido y al (D)Phe?
LípidoC20-DPhe-**Val**-Ile-Phe-Ala-OMe	7	19	Especificidad atribuible al (NMe)Val?
AcNH-DPhe-Val-Ile-Phe-Ala-OMe	8	10	Especificidad atribuible al lípido y al (NMe)Va?
LípidoC20-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-**Ala**	9	20	Especificidad atribuible al éster metílico?
AcNH-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-**Ala**	10	12	Especificidad atribuible al lípido y al éster metílico?

[a] Las modificaciones del L5P están resaltadas en negrita en los análogos subsiguientes. Los restos de aminoácidos pertenecen a la serie L, a menos que se especifique otra cosa; [b] estos compuestos han sido ya descritos en el ejemplo 4; [c] ácido eicosanoico; [e] el grupo NH_2 de DPhe N-terminal es no sustituido.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
INSTITUT PASTEUR
REYRAT, Jean-Marc
BAY, Sylvie
BIET, Franck

<120> Péptidos y lipopéptidos antigénicos sintéticos derivados de *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

<130> MJP/DT/mad-F598/99-WO

<150> EP 07 291 296.7
<151> 26-10-2007

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 1
Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 2
Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 3
Phe Val Ile Phe Val
1 5

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 4
Phe Val Ile Phe Val
1 5

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<400> 5
Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<400> 6
Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 7
Phe Val Ile Phe Val
1 5

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<400> 8
Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> N-acetilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 9
Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> N-acetilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 10
Phe Val Ile Phe Val
1 5

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> N-acetilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 11

Phe Val Ile Phe Val
1 5

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> N-acetilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<400> 12
Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador 1

<400> 13
cgaggacttc ggcgagccgg t 21

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador 2

<400> 14
tcatgtaggc gatgtcgtcg ggc 23

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador 3

<400> 15
attgagcgca gccagcatcc ccaagccc 28

<210> 16

<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador 4

<400> 16
ttgaccagga cgaaaaatcg gccgcc 26

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> N- acilación con ácido eicosanoico

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 17

Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> N- acilación con ácido eicosanoico

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 18
Phe Val Ile Phe Val
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> N- acilación con ácido eicosanoico

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (5)..(5)
<223> O-metilación

<400> 19
Phe Val Ile Phe Val
1 5

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> N-acilación con ácido eicosanoico

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> D-fenilalanina

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> N-metilación

<400> 20
Phe Val Ile Phe Val
1 5

REIVINDICACIONES

1ª. El uso de un péptido sintético 5P que tiene la siguiente fórmula:

DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 1), en donde DPhe designa D-fenilalanina, NMeVal designa valina N-metilada, y Ala-OMe designa alanina O-metilada,

para la detección *in vitro* o cuantificación de anticuerpos anti-*Mycobacterium paratuberculosis* específicos en una muestra biológica.

2ª. El uso de un antígeno elegido entre:

a) un péptido sintético que consiste en:

AcNH-DPhe-NMeVal-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 9) en donde AcNH-DPhe designa D-fenilalanina N-acetilada, NMeVal designa valina N-metilada, y Ala-OMe designa alanina O-metilada;

b) un péptido sintético que consiste en:

AcNH-DPhe -Val-Ile-Phe-Ala-OMe (SEC ID Nº: 10), en donde AcNH-DPhe designa D-fenilalanina N-acetilada, y Ala-OMe designa alanina O-metilada,

para la detección *in vitro* o la cuantificación de anticuerpos anti- *Mycobacterium paratuberculosis* específicos en una muestra biológica, en donde dicha muestra biológica es de una especie de mamífero elegida entre la lista formada por vacas, bisontes y búfalos.

3ª. El uso de un péptido sintético como se define en la reivindicación 1ª, para evaluar *in vitro* la respuesta inmunológica de la células T dirigida a *Mycobacterium paratuberculosis*.

4ª. El uso de un antígeno como se define en la reivindicación 2ª, para evaluar *in vitro* la respuesta inmunológica de la células T dirigida a *Mycobacterium paratuberculosis*, en una muestra biológica, en donde dicha muestra biológica es de una especie de mamífero elegida entre la lista que consiste en vacas, bisontes y búfalos.

5ª. El uso de un péptido sintético según se define en la reivindicación 1ª, para preparar una composición para detectar respuestas inmunológicas mediadas por células con hipersensibilidad de tipo retardado, contra *Mycobacterium paratuberculosis*.

6ª. El uso de un antígeno como se define en la reivindicación 2ª, para preparar una composición para detectar respuestas inmunológicas mediadas por células con hipersensibilidad de tipo retardado, contra *Mycobacterium paratuberculosis* en una muestra biológica, en donde dicha muestra biológica es de una especie de mamífero elegida en la lista que consiste en vacas, bisontes y búfalos.

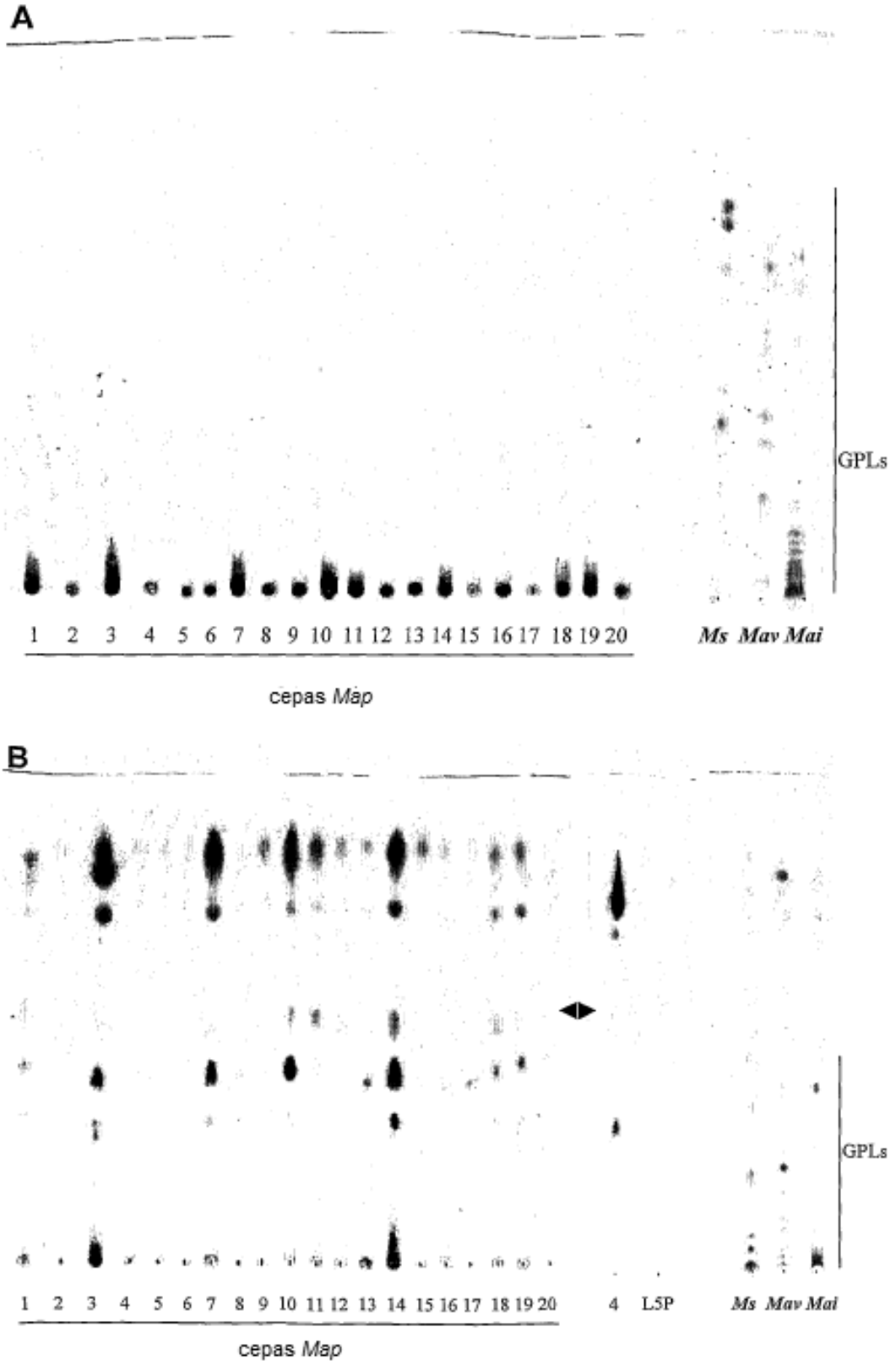

A
GPLs
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Ms Mav Mai
cepas Map
B
GPLs
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
4 L5P
Ms Mav Mai
cepas Map

Figura 1

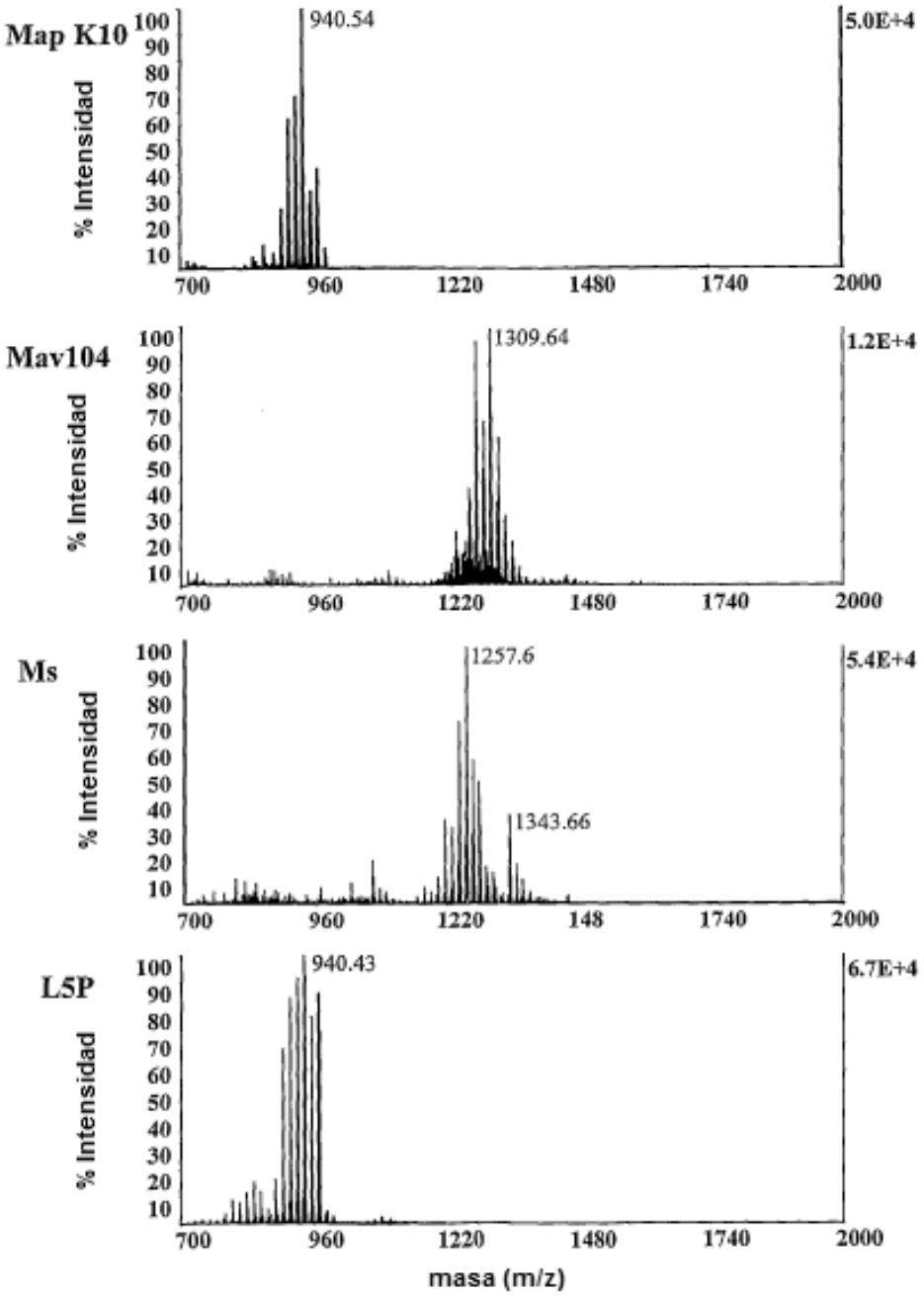

Map K10
% Intensidad
940.54
5.0E+4
Mav104
% Intensidad
1309.64
1.2E+4
Ms
% Intensidad
1257.6
1343.66
5.4E+4
L5P
% Intensidad
940.43
6.7E+4
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
700
960
1220
1480
1740
2000
148
masa (m/z)

Figura 2

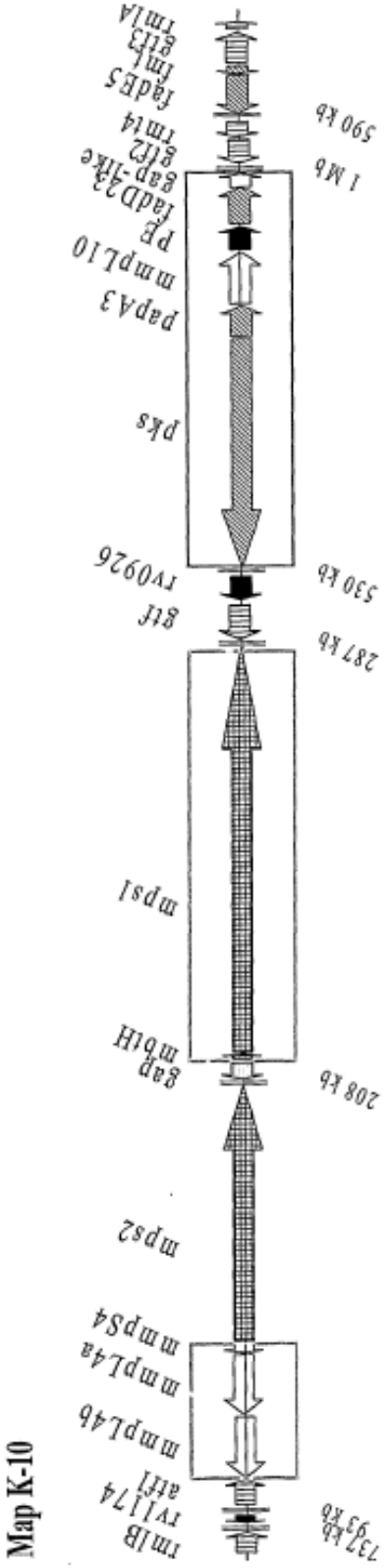

Map K-10
rmlB
rvl174
atfI
mmpL46
mmpL4a
mmpS4
mpS2
gap
mbiH
mpsI
gtf
rv0926
pks
papA3
mmpL10
pE
fadD23
gap-like
glf2
rmlA
glf3
rmlL
fadE5
rmlA
737 kb
953 kb
208 kb
287 kb
530 kb
590 kb
1 Mb

Figura 3

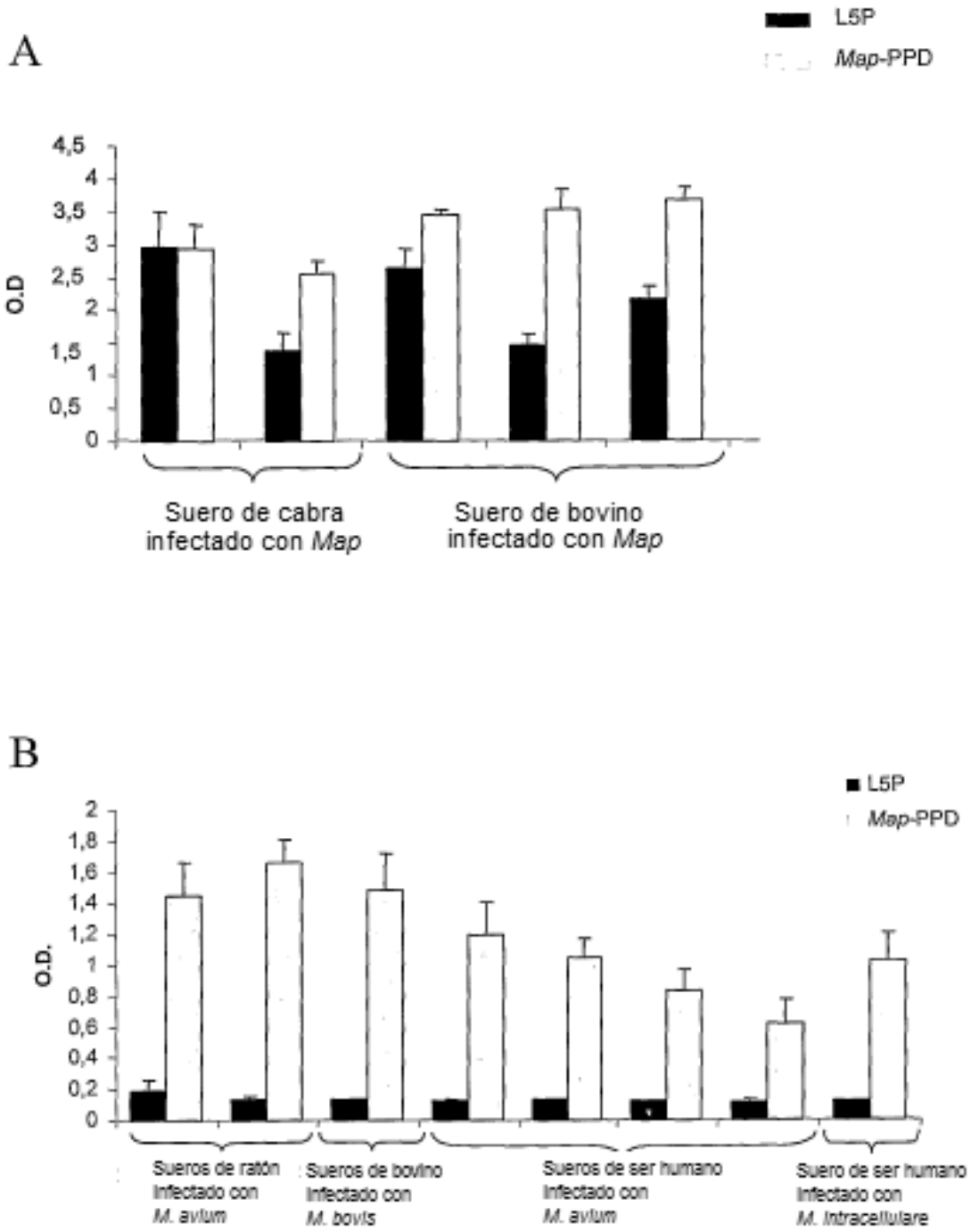

A
L5P
Map-PPD
O.D
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Suero de cabra infectado con Map
Suero de bovino infectado con Map
B
L5P
Map-PPD
O.D.
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Sueros de ratón infectado con M. avium
Sueros de bovino infectado con M. bovis
Sueros de ser humano infectado con M. avium
Suero de ser humano infectado con M. intracellulare

Figura 4

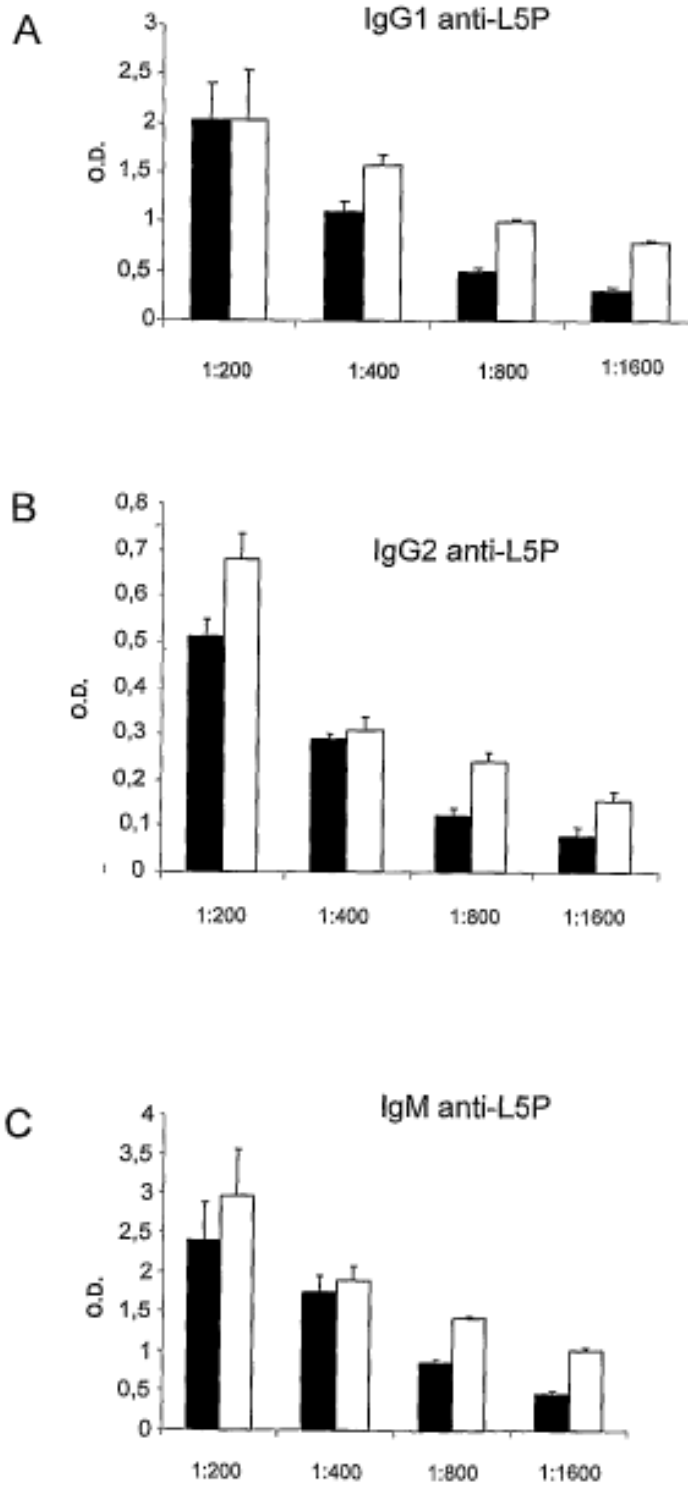
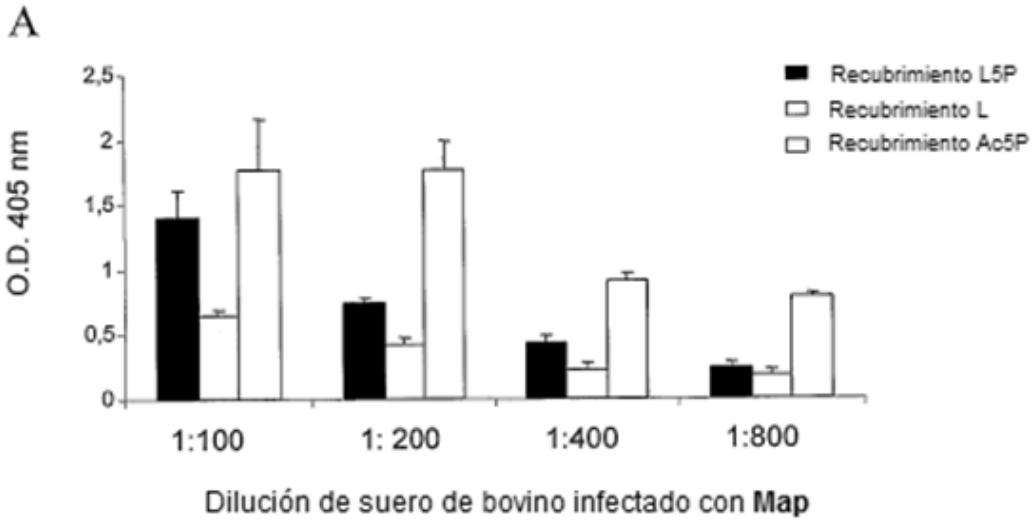

A
IgG1 anti-L5P
O.D.
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1:200
1:400
1:800
1:1600
B
IgG2 anti-L5P
O.D.
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
1:200
1:400
1:800
1:1600
C
IgM anti-L5P
O.D.
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1:200
1:400
1:800
1:1600

Figura 5


A
O.D. 405 nm
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Recubrimiento L5P
Recubrimiento L
Recubrimiento Ac5P
1:100
1: 200
1:400
1:800
Dilución de suero de bovino infectado con Map

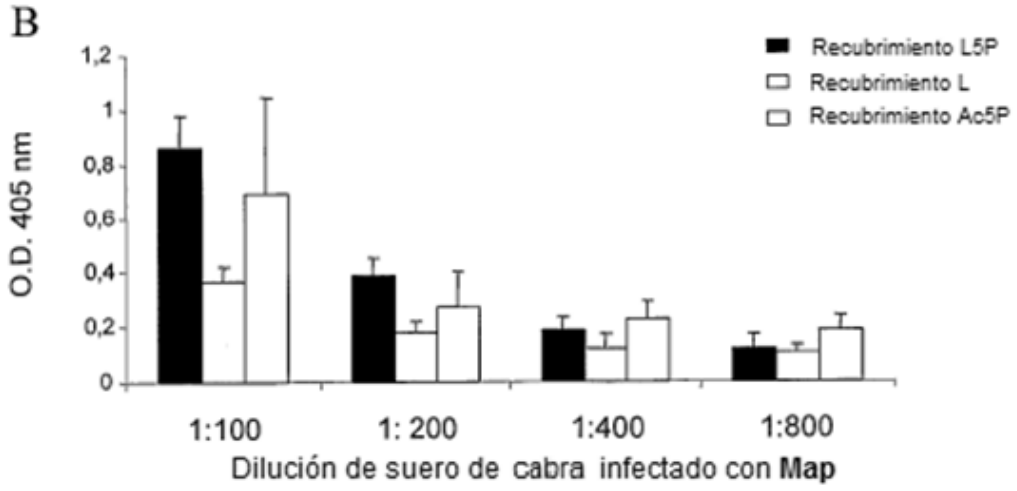

B
O.D. 405 nm
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Recubrimiento L5P
Recubrimiento L
Recubrimiento Ac5P
1:100
1: 200
1:400
1:800
Dilución de suero de cabra infectado con Map

Figura 6

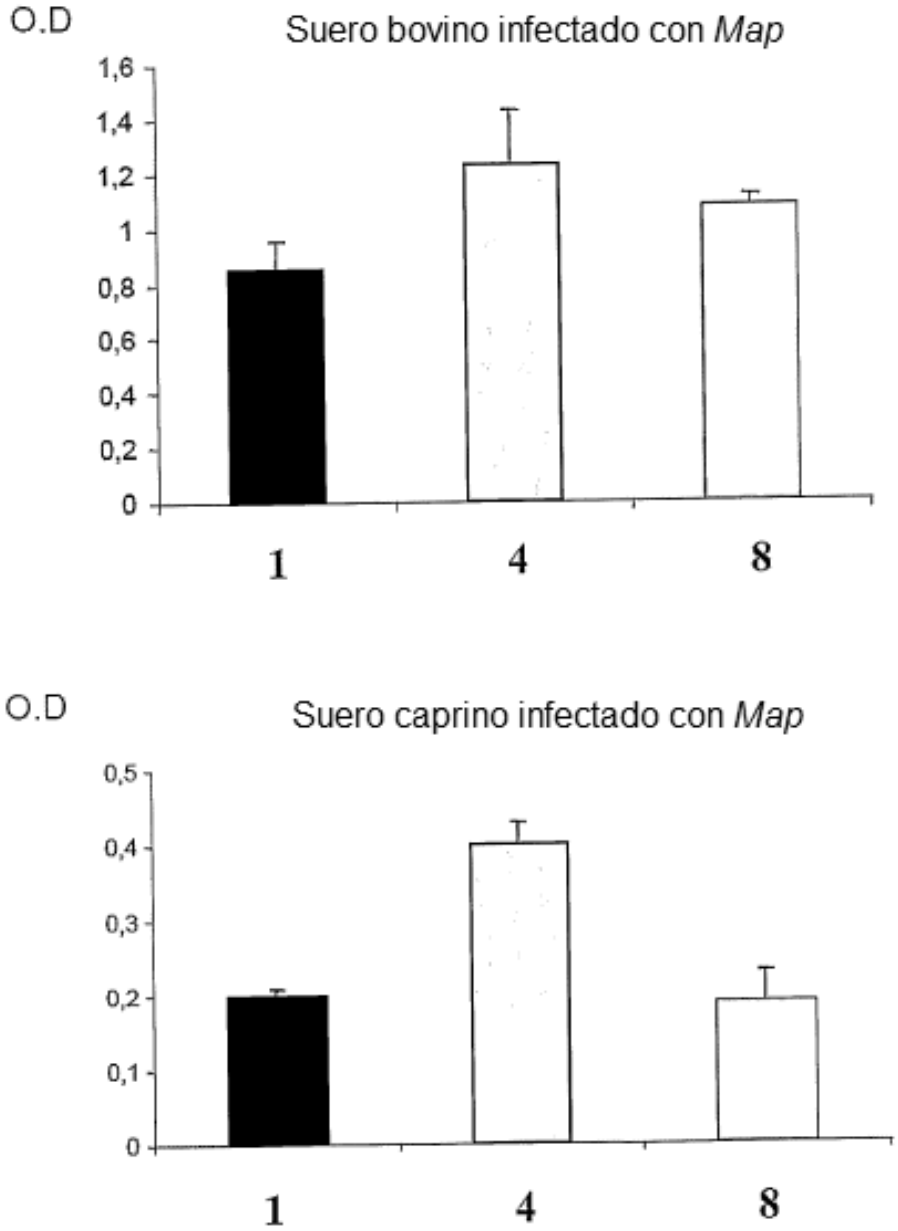

O.D
Suero bovino infectado con *Map*
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1
4
8
O.D
Suero caprino infectado con *Map*
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
1
4
8

Figura 7