República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0708912-0 A2**

(22) Data de Depósito: 14/03/2007
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/569 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE UMA INFECÇÃO POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2006 US 60/782,364

(73) Titular(es): Oregon Health And Science University, The Government Of The United States Of America D.B.A The Department Of Veterans Affairs

(72) Inventor(es): David Lewinsohn, Deborah Lewinsohn

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007006534 de 14/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/106560de 20/09/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE UMA INFECÇÃO POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. A presente invenção refere-se a métodos para detecção de uma infecção com Mycobacterium tuberculosis (Mtb) em um indivíduo que são descritos. Os métodos incluem detecção da presença de células TCD8+ que especificamente reconhecem polipeptídio de Mtb. Os métodos incluem ensaios in vivo para detecção da presença de células T CD8+ em uma amostra biológica, e ensaios in vivo que detectam uma reação de hipersensibilidade do tipo retardado. Os métodos podem também incluir detecção de polipeptídios e polinucleotídeos de Mtb. Reagentes para detecção de uma infecção por Mtb são também descritos.

020080140985/08
PI 0708912-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE UMA INFECÇÃO POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*".**

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº 60/782.364 depositado em 14 de março de 2006, que é aqui incorporado a título de referência.

DECLARAÇÃO DE APOIO DO GOVERNO

A presente invenção foi feita com o apoio do governo dos Estados Unidos sob a Concessão Nº NIH-R01-AI48090 e Concessão Nº NIH NIAID HHSN266200400081 N01-AI-40081 do *National Institutes of Health*; o governo dos Estados Unidos tem certos direitos na invenção. A presente invenção foi também feita com apoio do *Department of Veterans Affairs*.

CAMPO

O presente pedido refere-se ao campo de diagnóstico, especificamente a métodos para detecção de uma infecção com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em um indivíduo.

ANTECEDENTES

Micobactérias são um gênero de organismos bacterianos intracelulares aeróbicos que, quando da infecção de um hospedeiro, sobrevivem dentro de compartimentos endossomais de monócitos e macrófagos. Doenças micobacterianas humanas incluem tuberculose (causada por *M. tuberculosis*), lepra (causada por *M. leprae*), úlceras de *Bairnsdale* (causadas por *M. ulcerans*) e várias infecções causadas por *M. marinum, M. kansasii, M. scrofulaceum, M. szulgai, M. xenopi, M. fortuitum, M. chenolei, M. haemophilum* e *M. intracellulare* (vide Wolinsky, E., capítulo 37 em *Microbiology: Including Immunology and Molecular Genetics,* 3ª Ed., Harper & Row, Filadélfia, 1980).

Um terço da população do mundo carrega *M. tuberculosis* e está sob risco de desenvolver tuberculose (TB). Em pacientes imunocomprometidos, tuberculose está aumentando em uma taxa quase logarítmica, e cepas resistentes a multifármaco estão aparecendo. Ainda, cepas micobacterianas

que foram previamente consideradas ser cepas não-patogênicas (por exemplo, *M. avium*) se tornaram agora matadoras principais de pacientes com AIDS imunocomprometidos. Além disso, vacinas Micobacterianas atuais são ou inadequadas (tal como a vacina BCG para *M. tuberculosis*) ou não-disponíveis (tal como para *M. leprae*) (Kaufmann, S., *Microbiol.*, 4:324-328, 1987; *U.S. Congress, Office of Technology Assessment, The Continuing Challenge of Tuberculosis*, PP. 62-67, OTA-H-574, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1993).

Inibição do espalhamento de tuberculose requer vacinação eficaz e diagnóstico precoce, eficaz, da doença. Atualmente, vacinação com bactérias vivas é o método mais eficiente para indução de imunidade protetora. A Micobactéria mais comum empregada para este propósito é *Baciilus Calmette-Guerin* (BCG), uma cepa avirulenta de *Mycobacterium* bovis. No entanto, a segurança e eficácia de BCG são uma fonte de controvérsia e alguns países, tal como os Estados Unidos, que não vacinam o público geral.

Diagnóstico de tuberculose é geralmente obtido usando um teste de pele; que envolve exposição transdermal à tuberculina PPD (derivado purificado de proteína) de tuberculina. Respostas de célula T específicas de antígeno resultam em endurecimento mensurável no sítio de injeção por 48 a 72 horas após injeção, o que indica exposição a antígenos Micobacterianos. No entanto, a sensibilidade e a especificidade deste teste não são ideais; indivíduos vacinados com BCG não podem ser distinguidos de indivíduos infectados. Deste modo, há uma necessidade na técnica de métodos de diagnóstico aperfeiçoados para detecção de tuberculose.

SUMÁRIO

Métodos para diagnóstico de uma infecção com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) são descritos aqui. Os métodos podem incluir detecção de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ que se ligam especificamente a um polipeptídeo de Mtb de interesse. Os métodos podem também incluir detecção de uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada em um indivíduo e/ou podem incluir detecção de polipeptídeos e polinucleotídeos de Mtb específicos. Os

ensaios descritos podem ser usados individualmente ou em combinação. A infecção com *Mycobacterium tuberculosis* pode ser uma infecção latente ou ativa.

Em várias modalidades, são providos métodos para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em um indivíduo. Esses métodos incluem contato de uma amostra biológica do indivíduo compreendendo células T, tal como células T $CD8^+$ e/ou células T $CD4^+$, com um ou mais polipeptídeos de *Mycobacterium*, ou uma célula apresentando antígeno apresentando o um ou mais polipeptídeos de *Mycobacterium.* O um ou mais polipeptídeos de *Mycobacterium* incluem uma seqüência de aminoácido mostrada como (a) uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID N O:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 ou SEQ ID NO:12; ou (b) pelo menos nove a vinte aminoácidos consecutivos de pelo menos uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:7, SEQ ID N O:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 ou SEQ ID NO:12, onde os nove a vinte aminoácidos consecutivos especificamente se ligam a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I. É determinado se as células T reconhecem especificamente o polipeptídeo de *Mycobacterium.*

Em modalidades adicionais, são providos métodos para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em um indivíduo, onde os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de *Mycobacterium* à pele, subcutaneamente ou intradermalmente. O polipeptídeo de *Mycobacterium* inclui uma seqüência de aminoácido mostrada como (a) uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID N O:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 ou SEQ ID NO:12; ou (b) pelo menos nove a vinte aminoácidos consecutivos de pelo menos uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID

NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:7, SEQ ID N O:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 ou SEQ ID NO:12, onde os nove a vinte aminoácidos consecutivos especificamente se ligam a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I. A presença de células T que especificamente reconhecem o polipeptídeo de *Mycobacterium* é detectada no indivíduo.

Em modalidades adicionais, são descritos métodos para detecção de uma infecção com *Mycobacterium tuberculosis* em um indivíduo, onde os métodos incluem detecção da presença de um polipeptídeo ou um polinucleotídeo de *Mycobacterium* codificando o polipeptídeo em uma amostra do indivíduo. O polipeptídeo de *Mycobacterium* inclui uma seqüência de aminoácido mostrada como uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID N O:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 ou SEQ ID NO:12.

Adicionalmente, reagentes para a detecção de uma infecção com *Mycobacterium* em um indivíduo são descritos.

O acima e outras características e vantagens se tornarão mais aparentes a partir da descrição detalhada que segue de várias modalidades, que acontece com referência às figuras acompanhantes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 são dois gráficos mostrando a determinação de freqüências de célula efetora humana *ex vivo* usando o ensaio ELISPOT IFN-γ. Células T $CD8^+$ purificadas com conta magnética foram culturadas com DC (20.000/cavidade) ou infectada com Mtb (H37Rv, MOT=50) ou pulsada com "pool" de peptídeo representando CFP10 (5 μg/ml cada peptídeo; 15-mers sobreposição 11a) em um ensaio ELISPOT IFN-γ. Cada população de célula T respondedora foi testada em duplicata em quatro concentrações de célula diferentes. Para determinar a freqüência de célula efetora de células T específicas de antígeno, o número médio de manchas por cavidade para cada duplicata foi posto em gráfico contra o número de células respondedoras por cavidade. Análise de regressão linear foi usada para determinar a inclinação

da linha, que representa a freqüência de células T específicas de antígeno. O ensaio seria considerado positivo (refletindo a presença de uma resposta de célula T iniciada), se a probabilidade binominal para o número de manchas fosse significantemente diferente através de ensaios experimentais e controle.

A Figura 2 é um conjunto de gráficos mostrando freqüências de célula T $CD8^+$ *ex vivo* para antígenos de Mtb que estão associados com infecção com Mtb. Conforme acima descrito (vide Figura), para determinar freqüências de célula T $CD8^+$ *ex vivo*, DC autóloga ou infectada com Mtb ou pulsada com grupos de peptídeo cognato foi incubada com células T $CD8^+$ em um ensaio ELISPOT IFN-γ. Indivíduos sem evidência de infecção com Mtb, aqueles com LTBI, e aqueles com TB ativa (cultura confirmou tuberculose pulmonar) foram avaliados. "Infectados com Mtb" inclui aqueles com LTBI e tuberculose ativa. Valores P são registrados onde $P = <0,05$ (Wilcoxon/Kruskal-Wallis).

As Figuras 3a a 3d são um conjunto de imagens digitais mostrando a definição de Especificidade Antigênica e Restrição de HLA (a caracterização de clone de célula T D466 D6). Para os resultados mostrados nas Figuras 3a-3c, para identificar o antígeno e epítopo mínimo reconhecidos pelo clone de célula T, D466 D6, células T (5000 células/cavidade) foram incubadas com LCL autólogo (20.000/cavidade) e 5 µg/ml de antígeno. IFN-γ foi avaliado através de ELISPOT após dezoito horas de co-cultura. Para os resultados apresentados na Figura 3a, antígenos consistiam em "pool" de peptídeo representando antígenos de $CD4^+$ conhecidos, feitos de peptídeos de até 15 aminoácidos (aa) se sobrepondo em 11 aa. Para os resultados apresentados na Figura 3b, antígenos consistiam em peptídeos CFP10 de 15 aa individuais que juntos constituíam o "pool" de peptídeo. Para os resultados apresentados na Figura 3c, antígenos consistiam em peptídeos $CFP10_{1-15}$ aninhados individuais (10 aa, 9 aa ou 8 aa), usados para mapear mais o epítopo. Para os resultados apresentados na Figura 3d, o alelo de restrição foi identificado usando LCL (20.000/cavidade) expressando alelos HLA igualando D466 em um ou dois alelos, pulsada com $CFP10_{2-10}$ (5 µg/ml)

como APC. Após 2 horas, células foram lavadas e incubadas com células T (500 células/cavidade) em um ensaio ELISPOT IFN-γ.

A Figura 4 é um gráfico em linha mostrando a confirmação de mapeamento de epítopo mínimo de D466 D6. Para confirmar o epítopo mínimo, LCL autóloga (20.000/cavidade) foi pulsada com peptídeo na concentração indicada e co-culturada com células T (1000 células/cavidade). IFN-γ foi avaliado através de ELISPOT após dezoito horas de co-cultura. Cada ponto representa a média de determinações em duplicata.

A Figura 5 é um conjunto de gráficos em barra mostrando o perfil de padrão de imunodominância para CFP10. Para determinar as freqüências de célula efetora, DC autólogas (20.000/cavidade) foram pulsadas ou com cada peptídeo de 15-mer individual (5 μg/ml), o "pool" de peptídeo (PP; 5 μg/cada peptídeo) ou o epítopo mínimo (ME) determinado de clones de célula T derivados de cada doador (D466:CFP102-11; D480:CFP103-11; D481;CFP1075-83; 5 μg/ml) e testadas contra 250.000 células T $CD8^+$ purificadas com conta magnética. Liberação de IFN-γ foi avaliada através de ELISPOT após dezoito horas de co-cultura. Cada ponto representa a média de determinações em duplicata.

A Figura 6 é um grupo de gráficos resumindo os dados de mapeamento de epítopo mínimo. Para determinar o epítopo mínimo, LCL autóloga (20.000/cavidade) foi pulsada com peptídeo na concentração indicada e co-cultura com células T (1000 células/cavidade). IFN-γ foi avaliado através de ELISPOT após dezoito horas de co-cultura. Cada ponto representa a média de determinações em duplicata.

A Figura 7 é um gráfico em linha mostrando o mapeamento de Epítopo Mínimo para Clones D504. Para determinar o epítopo mínimo, LCL autóloga (20.000/cavidade) foi co-culturada com clones de célula T (1.000 células/cavidade) e o peptídeo na concentração indicada. IFN-γ foi avaliado através de ELISPOT após dezoito horas de co-cultura. Cada ponto representa a média de determinações em duplicata.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

As seqüências de ácido nucléico e aminoácido listadas na lista-

gem de seqüência acompanhante são mostradas usando abreviações de letra padrão para bases de nucleotídeo, e código de três letras para aminoácidos, conforme definido em 37 C.F.R. 1.822. Apenas um filamento de cada seqüência de ácido nucléico é mostrado, mas o filamento complementar é compreendido como incluído por qualquer referência ao filamento mostrado. Na listagem de seqüência acompanhante:

SEQ ID NOs: 1-12 são a seqüência de aminoácido de polipeptídeos de Mtb.

SEQ ID NOs: 13-14 são aminoácidos de peptídeos de Mtb.

SEQ ID NOs: 15-25 são as seqüências de ácido nucléico de polinucleotídeos codificando os polipeptídeos de Mtb.

SEQ ID NOs: 26-38 são as seqüências de aminoácido de epítopos de Mtb específicos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Métodos para detecção de uma infecção com *Mycobacterium tuberculosis* em um indivíduo são descritos. Os métodos incluem detecção da presença de células T, tal como, mas não limitado a, células T $CD8^+$, que reconhecem especificamente um polipeptídeo de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Os métodos incluem ensaios *in vitro* para detecção da presença de células T $CD8^+$ em uma amostra biológica, e ensaios *in vivo* que detectam uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada. Os métodos podem também incluir detecção de polipeptídeos e polinucleotídeos de Mtb. Reagentes para a detecção de uma infecção com Mtb são também descritos.

Termos

A menos que de outro modo mencionado, termos técnicos são usados aqui de acordo com uso convencional. Definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontrados em Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado pela Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew e outros (Eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada pela Blackwell Science, Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

A fim de facilitar revisão das várias modalidades da presente descrição, as explicações que seguem de termos específicos são providas:

Adjuvante: Um veículo usado para aumentar antigenicidade. Adjuvantes incluem uma suspensão de minerais (alume, hidróxido de alumínio ou fosfato) onde antígeno é absorvido; ou emulsão água-em-óleo onde solução de antígeno é emulsificada em óleo mineral (adjuvante incompleto de Freund), algumas vezes com a inclusão de micobactérias mortas (adjuvante completo de Freund) para aumentar mais a antigenicidade (inibe degradação de antígeno e/ou causa influxo de macrófago). Oligonucleotídeos imunoestimuladores (tal como aqueles incluindo um motivo CpG) podem ser também usados como adjuvantes (por exemplo, vide Patente U.S. Nº 6.194.388; Patente U.S. Nº 6.207.646; Patente U.S. 6.214.806; Patente U.S. Nº 6.218.371; Patente U.S. Nº 6.239.116; Patente U.S. Nº 6.339.068; Patente U.S. Nº 6.406.705; e Patente U.S. Nº 6.429.199). Adjuvantes incluem moléculas biológicas (um "adjuvante biológico"), tal como moléculas co-estimuladoras. Adjuvantes exemplares incluem IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L e 41 BBL.

Amplificação: De uma molécula de ácido nucléico (por exemplo, uma molécula de DNA ou RNA) refere-se ao uso de uma técnica que aumenta o número de cópias de uma molécula de ácido nucléico em um espécime. Um exemplo de amplificação é a reação em cadeia de polimerase, onde uma amostra biológica coletada de um indivíduo é contatada com um par de *iniciadores* de oligonucleotídeo, sob condições que permitem a hibridização dos *iniciadores* em um molde de ácido nucléico na amostra. Os *iniciadores* são estendidos sob condições adequadas, dissociados do molde e então reanelados, estendidos e dissociados para amplificar o número de cópias do ácido nucléico. O produto de amplificação pode ser caracterizado por eletroforese, padrões de clivagem de endonuclease de restrição, hibridização ou ligação de oligonucleotídeo; e/ou sequenciamento de ácido nucléico usando técnicas padrão. Outros exemplos de amplificação incluem amplificação por deslocamento de filamento, conforme descrito na Patente U.S. Nº 5.744.311; amplificação isotérmica livre de transcrição, conforme descrito na

Patente U.S. Nº 6.033.881; amplificação por reação em cadeia de reparo, conforme descrito no WO 90/01069; amplificação por reação em cadeia da ligase, conforme descrito na EP-A-320 308; amplificação por reação em cadeia da ligase de preenchimento de lacuna, conforme descrito na Patente U.S. Nº 5.427.930; e amplificação livre de transcrição de RNA NASBA®, conforme descrito na Patente U.S. Nº 6.025.134.

Antígeno: Um composto, composição ou substância que pode estimular a produção de anticorpos ou uma resposta de célula T em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas no animal. Um antígeno reage com os produtos de imunidade humoral ou celular específica, incluindo aqueles induzidos por imunógenos heterólogos. O termo "antígeno" inclui todos os epítopos antigênicos relacionados. "Epítopo" ou "determinante antigênico" refere-se a um sítio no antígeno ao qual células B e/ou T respondem. Em uma modalidade, células T respondem ao epítopo, quando o epítopo está presente em conjunto com uma molécula de MHC. Epítopos podem ser formados ambos de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não-contíguos justapostos pela estrutura terciária de uma proteína. Epítopos formados de aminoácidos contíguos são tipicamente retidos na exposição a solventes desnaturantes enquanto epítopos formados por dobramento terciário são tipicamente perdidos em tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo tipicamente inclui pelo menos 3, e, mais comumente, pelo menos 5, cerca de 9 ou cerca de 8-10 aminoácidos em uma conformação espacial única. Métodos de determinação de conformação espacial de epítopos incluem, por exemplo, cristalografia de raio X e ressonância magnética nuclear 2-dimensional.

Um antígeno pode ser um antígeno específico de tecido, ou um antígeno específico de doença. Esses termos não são exclusivos, um antígeno específico de tecido pode ser um antígeno específico de doença. Um antígeno específico de tecido é expresso em um número limitado de tecidos, tal como um tecido único. Um antígeno específico de tecido pode ser expresso por mais de um tecido, tal como, mas não limitado a, um antígeno que é expresso em mais de um tecido reprodutivo, tal como em tecido de

ambos próstata e útero. Um antígeno específico de doença é expresso coincidentemente com um processo de doença. Exemplos não-limitantes específicos de um antígeno específico de doença são um antígeno cuja expressão se relaciona com, ou é previsiva de, tuberculose. Um antígeno específico de doença pode ser um antígeno reconhecido por células T ou células B.

Anticorpo: Moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, isto é, moléculas que contêm um sítio de ligação de antígeno que especificamente liga (imunorreage com) um antígeno, tal como polipeptídeo de Mtb.

Um anticorpo de ocorrência natural (por exemplo, IgG, IgM, IgD) inclui quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. No entanto, foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de ocorrência natural. Então, esses fragmentos de ligação de antígeno pretendem ser também designados pelo termo "anticorpo". Exemplos não-limitantes, específicos, de fragmentos de ligação compreendidos dentro do termo anticorpo incluem (i) um fragmento Fab consistindo nos domínios V_L, V_H, C_L e C_H; (ii) um fragmento F_d consistindo nos domínios V_H e C_H; (iii) um fragmento F_v consistindo nos domínios V_L e V_H de um braço único de um anticorpo, (iv) um fragmento dAb (Ward e outros, *Nature* 341:544-546, 1989) que consiste em um domínio V_H; (v) uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR); e (vi) um fragmento F(ab')2, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça.

Imunoglobulinas e certas variantes delas são conhecidas e podem ter sido preparadas em cultura de célula recombinante (por exemplo, vide Patente U.S. Nº 4.745.055; Patente U.S. Nº 4.444.487; WO 88/03565; EP 256.654; EP 120.694; EP 125.023; Faoulkner e outros, *Nature* 298:286, 1982; Morrison, *J. Immunol.* 123:793, 1979; Morrison e outros, *Ann. Rev. Immunol.* 2:239, 1984).

Animal: Organismos vertebrados multicelulares vivos, uma categoria que inclui, por exemplo, mamíferos e aves. O termo mamífero inclui

ambos mamíferos humanos em não-humanos. Similarmente, o termo "indivíduo" inclui ambos indivíduos humanos e veterinários.

Anticorpo: Moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, isto é, moléculas que contêm um sítio de ligação de antígeno que especificamente liga (imunorreage com) um antígeno.

Um anticorpo de ocorrência natural (por exemplo, IgG, IgM, IgD) inclui quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. No entanto, foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de ocorrência natural. Então, esses fragmentos de ligação de antígeno pretendem ser também designados pelo termo "anticorpo". Exemplos não-limitantes, específicos, de fragmentos de ligação compreendidos dentro do termo anticorpo incluem (i) um fragmento Fab consistindo nos domínios V_L, V_H, C_L e C_H; (ii) um fragmento F_d consistindo nos domínios V_H e C_H; (iii) um fragmento F_v consistindo nos domínios V_L e V_H de um braço único de um anticorpo, (iv) um fragmento dAb (Ward e outros, *Nature* 341:544-546, 1989) que consiste em um domínio V_H; (v) uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR); e (vi) um fragmento F(ab')2, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça.

Imunoglobulinas e certas variantes delas são conhecidas e podem ter sido preparadas em cultura de célula recombinante (por exemplo, vide Patente U.S. Nº 4.745.055; Patente U.S. Nº 4.444.487; WO 88/03565; EP 256.654; EP 120.694; EP 125.023; Faoulkner e outros, *Nature* 298:286, 1982; Morrison, *J. Immunol.* 123:793, 1979; Morrison e outros, *Ann. Rev. Immunol.* 2:239, 1984).

Célula apresentando antígeno (APC): Uma célula que pode apresentar um antígeno para célula T, de modo que as células T são ativadas. Células dendríticas são as células apresentando antígeno principais (APCs) envolvidas em respostas imunes primárias. A sua principal função é obter antígeno em tecidos, migrar para órgãos linfóides e apresentar o antí-

geno a fim de ativar células T.

Quando um sinal de maturação apropriado é recebido, células dendríticas são sinalizadas para sofrer mudanças morfológicas e fisiológicas rápidas que facilitam o início e desenvolvimento de respostas imunes. Dentre essas estão a supra-regulagem de moléculas envolvidas em apresentação de antígeno; produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, chave para a geração de respostas Th1; e secreção de quimiocinas que ajudam a dirigir diferenciação, expansão e migração de células Th puras circundantes. Coletivamente, essas moléculas supra-reguladas facilitam a habilidade de células dendríticas em coordenar a ativação e função efetora de outros linfócitos circundantes que por fim provêem proteção para o hospedeiro.

cDNA (DNA complementar): Um pedaço de DNA sem segmentos de não-codificação, internos, (introns) e seqüências reguladoras que determinam transcrição. cDNA é sintetizado no laboratório através de transcrição reversa de RNA mensageiro extraído de células.

CD4: Grupo de fator de diferenciação 4, uma proteína de superfície de célula T que faz a mediação da interação com a molécula do MHC Classe II. CD4 também serve como um sítio receptor primário para HIV em células T durante infecção com HIV. Células que expressam CD4 são freqüentemente células T auxiliares.

CD8: Grupos de fator de diferenciação 8, uma proteína de superfície de célula T que faz a mediação da interação com a molécula do MHC Classe II. Células que expressam CD8 são freqüentemente células T citotóxicas. "Imunidade mediada por célula T $CD8^{+}$" é uma resposta imune implementada pela apresentação de antígenos a células T $CD8^{+}$.

cDNA (DNA complementar): Um pedaço de DNA sem segmentos de não-codificação, internos, (introns) e seqüências reguladoras que determinam transcrição. cDNA é sintetizado no laboratório através de transcrição reversa de RNA mensageiro extraído de células.

Variantes conservativas: Substituições de aminoácido "conservativas" são aquelas substituições que não afetam substancialmente ou dimi-

nuem uma atividade ou antigenicidade do polipeptídeo de *Mycobacterium*. Exemplos não-limitantes, específicos, de uma substituição conservativa incluem os exemplos que seguem:

Resíduo Original	Substituições Conservativas
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

O termo variação conservativa também inclui o uso de um aminoácido substituído no lugar de um aminoácido de origem não-substituído, contanto que anticorpos criados para o polipeptídeo substancial também imunorreajam com o polipeptídeo não-substituído, ou que uma resposta imune possa ser gerada contra o polipeptídeo substituído que é similar à resposta imune contra e polipeptídeo não-substituído, tal como um antígeno de *Mycobacterium*. Então, em uma modalidade, substituições não-conservativas são aquelas que reduzem uma atividade ou antigenicidade.

Consiste essencialmente em/Consiste em: Com relação a um polipeptídeo, um polipeptídeo que consiste essencialmente em uma seqüên-

cia de aminoácido especificada se ele não incluir quaisquer resíduos de aminoácidos adicionais. No entanto, o polipeptídeo pode incluir componentes de não-peptídeo adicionais, tal como marcadores (por exemplo, marcadores fluorescentes, radioativos ou em partícula sólida), açúcares ou lipídeos. Um polipeptídeo que consiste em uma seqüência de aminoácido especificada não inclui quaisquer resíduos de aminoácido adicionais, nem inclui componentes de não-peptídeo adicionais, tal como lipídeos, açúcares ou marcadores.

Contato: O processo de incubação de um agente na presença de outro. Então, quando uma célula é contatada com um agente, a célula é incubada com o agente por um período de tempo suficiente para o agente e a célula interagirem.

Molécula co-estimuladora: Embora envolvimento do TCR com peptídeo-MHC libere um sinal para a célula T, este sinal sozinho pode ser insuficiente para ativar a célula T. Moléculas co-estimuladoras são moléculas que, quando ligadas a seu ligante, aplicam um segundo sinal requerido para a célula T se tornar ativada. A molécula co-estimuladora mais bem-conhecida na célula T é CD28, que se liga a ou B7-1 (também chamada CD80) ou B7-2 (também conhecida como CD86). Uma molécula co-estimuladora adicional é B7-3. Moléculas acessório que também provêem um segundo sinal para a ativação de células T incluem molécula de adesão intracelular (ICAM-1 e ICAM-2), antígeno associado a funcionamento de leucócito (LFA-1, LFA-2 e LFA-3). Integrinas e membros da superfamília de fator de necrose de tumor (TNF) podem também servir como moléculas co-estimuladoras.

Citocina: Proteínas feitas pelas células que afetam o comportamento de outras células, tal como linfócitos. Em uma modalidade, uma citocina é uma quimiocina, uma molécula que afeta tráfego celular. Exemplos não-limitantes, específicos, de citocinas incluem as interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, etc) e interferon (IFN)-γ.

Variante de degeneração: Um polinucleotídeo codificando um epítopo de um polipeptídeo de Mtb que inclui uma seqüência que é degene-

rada como um resultado do código genético. Existem 20 aminoácidos naturais, a maioria dos quais é especificada por mais de um códon. Então, todas as seqüências de nucleotídeo de degeneração estão incluídas nesta descrição contanto que a seqüência de aminoácido do polipeptídeo de Mtb codificada pela seqüência de nucleotídeo seja não-modificada.

Célula dendrítica (DC): Células dendríticas são as principais células apresentando antígeno (APCs) envolvidas em respostas imunes primárias. Células dendríticas incluem células dendríticas plasmocitóides e células dendríticas mielóides. Sua função principal é obter antígeno em tecidos, migrar para órgãos linfóides e apresentar o antígeno a fim de ativar células T. Células dendríticas imaturas se originam na medula óssea e residem na periferia como células imaturas.

Diagnóstico: Identificação da presença ou natureza de uma condição patológica, tal como, mas não limitado a, tuberculose. Métodos de diagnóstico diferem em sua sensibilidade e especificidade. A "sensibilidade" de um ensaio de diagnóstico é a porcentagem de indivíduos doentes que testam positivo (porcentagem de verdadeiros positivos). A "especificidade" de um ensaio de diagnóstico é 1 menos a taxa de falso positivo, onde a taxa de falso positivo é definida como a proporção daqueles sem a doença que testaram positivo. Embora um método de diagnóstico particular possa não prover um diagnóstico definido de uma condição, é suficiente se o método prover uma indicação positiva que auxilie em diagnóstico. "Prognóstico" significa previsão da probabilidade de desenvolvimento (por exemplo, severidade) de uma condição patológica, tal como tuberculose.

Mostra: O processo de localização de um complexo peptídeo:antígeno, ou um peptídeo, na superfície externa de uma célula onde o complexo peptídeo:antígeno ou peptídeo é acessível a uma segunda célula, moléculas mostradas por uma segunda célula, ou fatores solúveis. Um peptídeo, ou um complexo de peptídeo:antígeno, é "mostrado" por uma célula quando ele está presente na superfície externa da célula e é acessível a uma segunda célula, a moléculas mostradas pela segunda célula, ou a fatores solúveis.

Epítopo: Um determinante antigênico. Esses são grupos químicos ou seqüências de peptídeo particulares em uma molécula que são antigênicos, isto é, que elicitam uma resposta imune específica. Um anticorpo se liga especificamente a um epítopo antigênico particular em um polipeptídeo, tal como um polipeptídeo de *Mycobacterium.*

Seqüências de Controle de Expressão: Seqüências de ácido nucléico que regulam a expressão de uma seqüência de ácido nucléico heteróloga à qual elas estão operativamente ligadas. Seqüências de controle de expressão são operativamente ligadas a uma seqüência de ácido nucléico quando as seqüências de controle de expressão controlam e regulam a transcrição e, conforme apropriado, tradução da seqüência de ácido nucléico. Então seqüências de controle de expressão podem incluir promotores, aumentadores, terminadores de transcrição, um códon de início (isto é, ATG) em frente de um gene de codificação de proteína, sinal de união para introns, manutenção da estrutura de leitura correta daquele gene para permitir tradução apropriada de mRNA e códons de parada apropriados. O termo "seqüências de controle" pretende incluir, no mínimo, componentes cuja presença pode influenciar expressão, e pode também incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, seqüências líder e seqüências de contraparte de fusão. Seqüências de controle de expressão podem incluir um promotor.

Um promotor é uma seqüência mínima suficiente para direcionar transcrição. Também incluídos estão aqueles elementos promotores que são suficientes para fazer expressão de gene dependente de promotor controlável para específico de tipo de célula, específico de tecido ou induzível por sinais ou agentes externos; tais elementos podem estar localizados na região 5' ou 3' do gene. Ambos promotores constitutivos e induzíveis estão incluídos (vide, por exemplo, Bitter e outros, *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987). Por exemplo, quando clonando em sistemas bacterianos, promotores induzíveis tal como pL de bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) e similar podem ser usados. Em uma modalidade, quando clonando em sistemas de célula de mamífero, promotores derivados do

genoma de células de mamífero (por exemplo, promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamífero (por exemplo, repetição terminal longa de retrovírus; o promotor tardio de adenovírus; o promotor do vírus vaccínia 7,5K) podem ser usados. Promotores produzidos através de técnicas de DNA recombinante ou sintéticas podem ser também usados para prover transcrição das seqüências de ácido nucléico. Em uma modalidade, o promotor é um promotor de citomegalovírus.

Fracionamento: Submissão de uma amostra a condições ou procedimentos que separam os componentes da amostra com base em propriedades físicas ou químicas, mas não limitado a, tamanho, carga, solubilidade ou composição. Exemplos de procedimento de fracionamento incluem, mas não estão limitados a, precipitação seletiva, extração orgânica, diálise de exclusão de tamanho ou cromatografia, tal como cromatografia de troca de íon. Em uma modalidade, uma fração é um extrato solúvel ou um extrato orgânico de um organismo, tal como uma *Mycobacterium*.

Funcionalmente Equivalente: Alterações de seqüência, tal como em um epítopo de um antígeno, que dão os mesmos resultados conforme aqui descrito. Tais alterações de seqüências podem incluir, mas não estão limitadas a, substituições conservativas, deleções, mutações, *frameshifts* e inserções.

Heterólogo: Originando de fontes ou espécies genéticas separadas. Um polipeptídeo que é heterólogo a um polipeptídeo de Mtb se origina de um ácido nucléico que não codifica o polipeptídeo de Mtb. Em um exemplo não-limitante, específico, um polipeptídeo compreendendo nove aminoácidos consecutivos de um polipeptídeo de Mtb, ou no máximo 20 aminoácidos consecutivos do polipeptídeo de Mtb, e uma seqüência de aminoácido heteróloga inclui uma β-galactosidase, uma proteína de ligação de maltose e albumina, antígeno de superfície B de hepatite ou uma seqüência de aminoácido de imunoglobulina. Em geral, um anticorpo que especificamente se liga a uma proteína de interesse não vai especificamente se ligar a uma proteína heteróloga.

Células hospediras: Células onde um vetor pode ser propagado

e seu DNA expresso. A célula pode ser procariótica ou eucariótica. A célula pode ser mamífero, tal como uma célula humana. O termo também inclui qualquer progênie da célula hospedeira objeto. É compreendido que toda a progênie pode não ser idêntica à célula de origem uma vez que pode haver mutações que acontecem durante replicação. No entanto, tal progênie está incluída quando o termo "célula hospedeira" é usado.

Antígeno de Leucócito Humano (HLA): Uma designação genética do complexo de histocompatibilidade principal humano (MHC). Locais individuais são designados por letras maiúsculas, como em HLA-E, e alelos são designados pelos números, como em HLA-A*0201. Os três genes do MHC classe I principais são chamados HLA-A, HLA-B e HLA-C. No entanto, existem muitos genes que codificam moléculas de superfície de célula associadas com microglobulina β2 que estão ligados aos genes do MHC classe I. A expressão desses genes é variável, ambos na distribuição de tecido e na quantidade expressa em células; esses genes foram chamados genes do MHC classe IB.

Resposta imune: Uma resposta de uma célula do sistema imune, tal como uma célula B, célula assassina natural, ou uma célula T, a um estímulo. Em uma modalidade, a resposta é específica para um antígeno particular (uma "resposta específica de antígeno"). Em uma modalidade, uma resposta imune é uma resposta de célula T, tal como uma resposta Th1; Th2 ou Th3. Em outra modalidade, uma resposta imune é uma resposta de uma célula T supressora.

Peptídeo imunogênico: Um peptídeo que compreende um motivo específico de alelo ou outra seqüência de modo que o peptídeo vai ligar uma molécula do MHC e induzir uma resposta de célula T, tal como uma resposta de célula T $CD8^+$, ou uma resposta de célula B (tal como produção de anticorpo) contra o antígeno do qual o peptídeo imunogênico é derivado.

Em uma modalidade, peptídeos imunogênicos são identificados usando motivos de seqüência ou outros métodos, tal como determinações de rede neural ou polinomial, conhecidos na técnica. Tipicamente, algoritmos são usados para determinar o "limiar de ligação" de peptídeos para selecio-

nar aqueles com *scores* que dão a eles uma alta probabilidade de ligação em uma certa afinidade e serão imunogênicos. Os algoritmos são baseados ou nos efeitos sobre ligação de MHC de um aminoácido particular em uma posição particular, nos efeitos sobre ligação de anticorpo de um aminoácido particular em uma posição particular, ou nos efeitos sobre ligação de uma substituição particular em um peptídeo contendo motivo. Dentro do contexto de um peptídeo imunogênico, um "resíduo conservado" é um que aparece em uma freqüência significantemente maior do que seria esperado por distribuição aleatória em uma posição particular em um peptídeo. Em uma modalidade, um resíduo conservado é um onde a estrutura do MHC pode prover um ponto de contato com o peptídeo imunogênico.

Peptídeos imunogênicos podem ser também identificados medindo sua ligação a uma proteína do MHC específica e pela sua habilidade em estimular CD4 e/ou CD8 quando apresentados no contexto da proteína do MHC. Em um exemplo, um "peptídeo de Mtb" imunogênico é uma série de resíduos de aminoácido contíguos da proteína de Mtb geralmente entre 9 e 20 aminoácidos de comprimento, tal como cerca de 8 a 11 resíduos de comprimento. Polipeptídeos imunogênicos específicos são descritos aqui que são resíduos de 9 ou 10 aminoácidos de comprimento, ou no máximo 12 aminoácidos de comprimento.

Geralmente, polipeptídeos de Mtb imunogênicos podem ser usados para induzir uma resposta imune em um indivíduo, tal como uma resposta de célula B ou uma resposta de célula T. Em um exemplo, um polipeptídeo de Mtb imunogênico, quando ligado a uma molécula do Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe I, ativa células T $CD8^+$, tal como linfócitos T citotóxicos (CTLs) contra Mtb. Indução de CTL usando peptídeos sintéticos e ensaios citotóxicos de CTL conhecidos na técnica, vide patente U.S. 5.662.907, que é aqui incorporada a título de referência. Em um exemplo, um peptídeo imunogênico inclui um motivo específico de alelo ou outra seqüência de modo que o peptídeo ligará uma molécula do MHC e induz uma resposta $CD8^+$ contra o antígeno do qual o peptídeo imunogênico é derivado. Uma célula T $CD8^+$ que reconhece especificamente um polipeptídeo

de Mtb é ativada, prolifera e/ou secreta citocinas em resposta àquele polipeptídeo específico, e não para outros, polipeptídeos não-relacionados.

Composição imunogênica: Uma composição compreendendo um polipeptídeo de Mtb imunogênico ou um ácido nucléico codificando o polipeptídeo de Mtb imunogênico que induz uma resposta T mensurável contra Mtb, tal como uma resposta de célula T $CD8^+$, ou induz uma resposta de célula B mensurável (tal como produção de anticorpos que especificamente ligam um polipeptídeo de Mtb). Para uso *in vitro*, a composição imunogênica pode consistir no ácido nucléico isolado, vetor incluindo o ácido nucléico/ou peptídeo imunogênico. Para uso *in vivo*, a composição imunogênica vai tipicamente compreender o ácido nucléico, vetor incluindo o ácido nucléico e/ou polipeptídeo imunogênico, em veículos farmaceuticamente aceitáveis e/ou outros agentes. Uma composição imunogênica pode opcionalmente incluir um adjuvante, uma molécula co-estimuladora ou um ácido nucléico codificando uma molécula co-estimuladora. Um polipeptídeo de Mtb, ou ácido nucléico codificando o polipeptídeo, pode ser prontamente testado quanto à sua habilidade em induzir uma resposta de célula T $CD8^+$.

Inibição ou tratamento de uma doença: Inibição de uma doença, tal como tuberculose, refere-se à inibição do desenvolvimento integral de uma doença. Em vários exemplos, inibição de uma doença refere-se à diminuição dos sintomas de uma tuberculose. "Tratamento" refere-se a uma intervenção terapêutica que melhora um sinal ou sintoma de uma doença ou condição patológica relacionada com a doença, tal como tuberculose.

Interferon gama (γ): IFN-γ é uma proteína dimérica com subunidades de 146 aminoácidos. A proteína é glicosilada em dois sítios, e o pI é 8,3-8,5. IFN-γ é sintetizado como uma proteína precursora de 166 aminoácidos incluindo uma seqüência de sinal secretora de 23 aminoácidos. Duas formas moleculares da proteína biologicamente ativa de 20 e 25 kDa foram descritas. Ambas são glicosiladas na posição 25. A forma de 25 kDa é também glicosilada na posição 97. As diferenças observadas de IFN-γ natural com relação à massa molecular e carga são devido a padrões de glicosilação variáveis. Formas de 40-60 kDa observadas sob condições de não-

desnaturação são dímeros e tetrâmeros de IFN-γ. O gene humano tem um comprimento de aproximadamente 6 kb. Ele contém quatro exons e mapeia para cromossomo 12q24.1.

IFN-γ pode ser detectado através de imunoensaios sensíveis, tal como um teste ELISA que permite detecção de células individuais produzindo IFN-γ. Quantidades pequenas de IFN-γ podem ser detectadas indiretamente através da medição de proteínas induzidas por IFN-γ tal como proteína Mx. A indução da síntese de IP-10 tem sido usada para medir concentrações de IFN-γ. Ainda, bioensaios podem ser usados para detectar IFN-γ, tal como um ensaio que emprega indução de atividade de indolamina 2,3-dioxigenase em células 2D9. A produção de IFN-γ pode ser usada para avaliar a ativação de célula T, tal como ativação de uma célula T por um antígeno de *Mycobacterium* apresentado em HLA-E.

Isolado: Um ácido nucléico "isolado" foi substancialmente separado ou purificado de outras seqüências de ácido nucléico na célula dos organismos onde o ácido nucléico acontece naturalmente, isto é, outros DNA e RNA cromossomais e extracromossomais. O termo "isolado" então compreende ácidos nucléicos purificados por métodos de purificação de ácido nucléico padrão. O termo também compreende ácidos nucléicos preparados através da expressão recombinante em uma célula hospedeira bem como ácidos nucléicos quimicamente sintetizados.

Marcador: Um composto ou composição detectável que é conjugado diretamente ou indiretamente a outra molécula para facilitar detecção daquela molécula. Exemplos não-limitantes, específicos, de marcadores incluem *tags* fluorescentes, ligações enzimáticas e isótopos radioativos.

Seqüência ligante: Uma seqüência ligante é uma seqüência de aminoácido que liga covalentemente dois domínios de polipeptídeo. Seqüências ligantes podem ser incluídas entre os epítopos de Mtb descritos aqui para prover liberdade rotacional aos domínios de polipeptídeo ligados e então promover dobra de domínio apropriada e apresentação ao MHC. A título de exemplo, em um polipeptídeo recombinante compreendendo dois domínios de Mtb, seqüências ligantes podem ser providas entre eles, tal co-

mo um polipeptídeo compreendendo polipeptídeo de Mtb-ligante-polipeptídeo de Mtb. Seqüências ligantes, que são geralmente entre 2 e 25 aminoácidos de comprimento, são bem-conhecidas na técnica e incluem, mas não estão limitadas a, o espaçador glicina(4)-serina (GGGGSx3) descrito por Chaudhary e ouros, *Nature* 339:394-397, 1989.

Linfócitos: Um tipo de célula sanguínea branca que está envolvida nas defesas imunes do corpo. Existem dois tipos principais de linfócitos: células B e células T.

Mamífero: Este termo inclui ambos mamíferos humanos e não-humanos. Similarmente, o termo "paciente" ou "indivíduo" inclui ambos indivíduos humanos e veterinários.

Micobactérias: Um gênero de organismos bacterianos intracelulares. Quando da invasão de um hospedeiro, esses organismos sobrevivem dentro de compartimentos endossomais dos monócitos e macrófagos. Doenças micobacterianas humanas incluem tuberculose (causada por *M. tuberculosis*), Leprose (causada por *M. leprae*), úlceras de Barinsdale (causadas por *M. ulcerans*) e outras infecções que podem ser causadas por M. *marinum, M. kansasii, M. scrofulaceum, M. szulgai, M. xenopi, M. fortuitum, M. haemophilum, M. chelonei* e *M. intracelluare*. Cepas de *Mycobacterium* que foram anteriormente consideradas ser não-patogênicas (tal como *M. avium*) são também agora conhecidas ser assassinas principais de pacientes com AIDS imunossuprimidos.

A resposta principal a micobactérias envolve reações de hipersensibilidade mediada por célula (DTH) com células T e macrófagos desempenhando papéis principais na morte intracelular e enclausuramento (ou contenção) do organismo (formação de granuloma). Uma resposta de célula T principal envolve linfócitos $CD4^+$ que reconhecem proteínas de choque térmico micobacterianas e antígenos imunodominantes.

Operavelmente ligado: Uma primeira seqüência de ácido nucléico está operavelmente ligada com uma segunda seqüência de ácido nucléico quando a primeira seqüência de ácido nucléico é posta em uma relação funcional com a segunda seqüência de ácido nucléico. Por exemplo, um

promotor está operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se o promotor realizar a transcrição ou expressão da seqüência de codificação. Em geral, seqüências de DNA operavelmente ligadas são contíguas e, onde necessário unir duas regiões de codificação de proteína, as estruturas de leitura aberta são alinhadas.

ORF (estrutura de leitura aberta): Uma série de tripletos de nucleotídeo (códons) codificando aminoácidos sem quaisquer códons de terminação. Essas seqüências são geralmente traduzíveis em um polipeptídeo.

Modificações de peptídeo: Polipeptídeos de *Mycobacterium* incluem modalidades sintéticas de peptídeos descritos aqui. Ainda, análogos (moléculas orgânicas de não-peptídeo), derivados (moléculas de peptídeo quimicamente funcionalizadas obtidas começando com as seqüências de peptídeo descritas) e variantes (homólogos) dessas proteínas podem ser utilizados nos métodos descritos aqui. Cada polipeptídeo da invenção é compreendido de uma seqüência de aminoácidos, que podem ser ou L- e/ou D-aminoácidos, de ocorrência natural ou outro.

Peptídeos podem ser modificados por uma variedade de técnicas químicas para produzir derivados tendo essencialmente a mesma atividade que os peptídeos não-modificados, e opcionalmente tendo outras propriedades desejáveis. Por exemplo, grupos de ácido carboxílico da proteína, sejam carboxila-terminais ou cadeia lateral, podem ser providos na forma de um sal de um cátions farmaceuticamente aceitável ou esterificados para formar um C_1-C_{16} éster, ou convertidos em uma amida de fórmula NR_1R_2 onde R_1 e R_2 são cada um independentemente H ou C_1-C_{16} alquila, ou combinados para formar um anel heterocíclico, tal como um anel de 5 ou 6 membros. Grupos amino do peptídeo, sejam amino terminais ou de cadeia lateral, podem estar na forma de um sal de adição farmaceuticamente aceitável, tal como os sais de HCl, HBr, acético, benzóico, toluenossulfônico, maléico, tartárico e outros orgânicos, ou podem ser modificados para uma C_1-C_{16} alquila ou dialquil amino ou convertidos mais em uma amida.

Grupos hidroxila das cadeias laterais de peptídeo podem ser convertidos em C_1-C_{16} alcóxi ou em um C_1-C_{16} éster usando técnicas bem-

reconhecidas. Anéis fenila e fenólicos das cadeias laterais de peptídeo podem ser substituídos com um ou mais átomos de halogênio, tal como flúor, cloro, bromo ou iodo, ou com C_1-C_{16} alquila, C_1-C_{16} alcóxi, ácidos carboxílicos e seus ésteres, ou amidas de tais ácidos carboxílicos. Grupos metileno das cadeias laterais de peptídeo podem ser estendidos para C_2-C_4 alquilenos homólogos. Tióis podem ser protegidos com qualquer um de vários grupos de proteção bem-reconhecidos, tal como grupos acetamida. Aqueles versados na técnica vão também reconhecer métodos para introdução de estruturas cíclicas nos peptídeos da presente invenção para selecionar e prover restrições conformacionais à estrutura que resultam em estabilidade aumentada.

Modalidades peptidomiméticas e organomiméticas são previstas, com o que a disposição tridimensional dos constituintes químicos de tais peptido- e organomiméticos imita a disposição tridimensional da estrutura principal de peptídeo e cadeias laterais de aminoácido componente, resultando em tais peptido- e organomiméticos de um polipeptídeo de *Mycobacterium* tendo habilidade mensurável ou aumentada em gerar uma resposta imune. Para aplicações de modelagem por computador, um farmacóforo é uma definição tridimensional, idealizada, das necessidades estruturais para atividade biológica. Peptido- e organomiméticos podem ser projetados para ajustar cada farmacóforo com *software* de modelagem por computador atual (usando projeto de fármaco auxiliado por computador ou CADD). Vide Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", em Klegerman & Groves, Eds., 1993, *Pharmaceutical Biotechnology*, Interpharm Press: Buffalo Grove; IL, pp. 165-174 e *Principles of Pharmacology Muson* (ed.) 1995, Cap. 102, para descrições de técnicas usadas em CADD. Também incluídos estão miméticos preparados usando tais técnicas.

Agente farmacêutico ou fármaco: Um composto químico ou composição capaz de indução de um efeito terapêutico ou profilático desejado quando apropriadamente administrado a um indivíduo.

Veículos farmaceuticamente aceitáveis: Os veículos farmaceuticamente aceitáveis úteis com os polipeptídeos e ácidos nucléicos descritos

aqui são convencionais. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, de E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edição (1975), descreve composições e formulações adequadas para aplicação farmacêutica das proteínas de fusão aqui descritas.

Em geral, a natureza do veículo vai depender do modo de administração particular sendo empregado. Por exemplo, formulações parenterais geralmente compreendem fluidos injetáveis que incluem fluidos farmaceuticamente e fisiologicamente aceitáveis tal como água, solução salina fisiológica, soluções salinas equilibradas, dextrose aquosa, glicerol ou similar como um veículo. Para composições sólidas (por exemplo, formas em pó, pílula, comprimido ou cápsula), veículos sólidos não-tóxicos convencionais podem incluir, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido ou estearato de magnésio. Em adição a veículos biologicamente neutros, composições farmacêuticas a serem administradas podem conter quantidades pequenas de substâncias auxiliares não-tóxicas, tal como agentes umectantes ou emulsificantes, preservantes e agentes de tamponamento de pH e similar, por exemplo, acetato de sódio ou monolaurato sorbitano.

Polinucleotídeo: Uma seqüência de nucleotídeo linear incluindo seqüências de mais do que 100 bases de nucleotídeo de comprimento.

Polipeptídeo: Qualquer cadeia de aminoácidos, sem importar o comprimento ou modificação pós-traducional (por exemplo, glicosilação ou fosforilação). Um "peptídeo" é uma cadeia de aminoácidos que é menos do que 100 aminoácidos de comprimento. Em uma modalidade, um "peptídeo" é uma porção de um polipeptídeo, tal como cerca de 10, 20, 30, 40, 50 ou 100 aminoácidos contíguos de um polipeptídeo que é maior do que 100 aminoácidos de comprimento.

Porção de uma seqüência de ácido nucléico: Pelo menos 10, 20, 30 ou 40 nucleotídeos contíguos da seqüência relevante, tal como uma seqüência codificando um antígeno. Em alguns casos seria vantajoso usar uma porção consistindo em 50 ou mais nucleotídeos. Por exemplo, quando descrevendo uma porção de um antígeno (tal como um epítopo antigênico), pode ser vantajoso remover uma porção da seqüência relevante compreen-

dendo pelo menos 10, 20, 30, 40 ou 50 nucleotídeos até um comprimento.

Sondas e iniciadores: Sondas e iniciadores de ácido nucléico podem ser prontamente preparados com base nos ácidos nucléicos providos pela presente invenção. Uma sonda compreende um ácido nucléico isolado ligado a um marcador detectável ou molécula repórter. Marcadores típicos incluem isótopos radioativos, ligantes, agentes quimioluminescentes e enzimas. Métodos para marcação e orientação na escolha de marcadores apropriados para vários propósitos são discutidos, por exemplo, em Sambrook e outros (1989) e Ausubel e outros (1987).

Iniciadores são ácidos nucléicos curtos, de preferência oligonucleotídeos de DNA de 15 nucleotídeos ou mais de comprimento. Iniciadores podem ser anelados para um filamento de DNA alvo complementar através de hibridização de ácido nucléico para formar um híbrido entre o *iniciador* e um filamento de DNA alvo, e então estendido ao longo do filamento de DNA alvo por uma enzima de polimerase de DNA. Pares de *iniciador* podem ser usados para amplificação de uma seqüência de ácido nucléico, por exemplo, através da reação em cadeia de polimerase (PCR) ou outros métodos de amplificação de ácido nucléico conhecidos na técnica.

Métodos para preparação e uso de sondas e *iniciadores* são descritos, por exemplo, em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook e outros, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, e *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel e outros, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nova York, 1987 (com atualizações periódicas). Pares de *iniciador* de PCR podem ser derivados de uma seqüência conhecida, por exemplo, usando programas de computador pretendidos para este propósito tal como Iniciador (Versão 0.5, © 1991, Whitehead Insitute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Prevenção ou tratamento de uma doença: "Prevenção" de uma doença refere-se à inibição do desenvolvimento integral de uma doença, por exemplo, em uma pessoa que sabe estar sob risco de infecção com *M. tuberculosis* ou *M. leprae*. Um exemplo de uma pessoa com uma predisposição conhecida é alguém vivendo com uma pessoa diagnosticada com tuber-

culose, profissionais de cuidado de saúde, ou alguém da família, ou que foi exposta a *M. tuberculosis*. "Tratamento" refere-se a uma intervenção terapêutica que melhora um sinal ou sintoma de uma doença ou condição patológica, tal como tuberculose, após ela ter começado a se desenvolver.

Promotor: Um promotor é uma disposição de seqüências de controle de ácido nucléico que direciona transcrição de um ácido nucléico. Um promotor inclui seqüências de ácido nucléico necessárias próximo do sítio de início de transcrição, no caso de um promotor tipo polimerase II, um elemento TATA. Um promotor também opcionalmente inclui elementos aumentadores ou repressores distais que podem estar localizados mais de milhares de pares de base do sítio de início de transcrição. O promotor pode ser um promotor constitutivo ou induzível. Um exemplo não-limitante, específico, de um promotor é o promotor HCMV IE.

Purificado: O termo purificado não requer pureza absoluta; pelo contrário, ele é pretendido ser um termo relativo. Então, por exemplo, uma preparação de antígeno purificada é uma onde o antígeno é mais puro do que a proteína em seu ambiente original dentro de uma célula. Uma preparação de um antígeno é tipicamente purificada de modo que o antígeno representa pelo menos 50% do teor de proteína total da preparação. No entanto, preparações mais altamente purificadas podem ser requeridas para certas aplicações. Por exemplo, para tais aplicações, preparações onde o antígeno compreende pelo menos 75% o pelo menos 90% do teor de proteína total podem ser empregadas.

Recombinante: Um ácido nucléico ou polipeptídeo recombinante é um que tem uma seqüência que não é de ocorrência natural ou tem uma seqüência que é feita através de uma combinação artificial de dois ou mais segmentos de seqüência de outro modo separados. Esta combinação artificial é freqüentemente conseguida através de síntese química ou, mais geralmente, através da manipulação artificial de segmentos isolados de ácidos nucléicos, por exemplo, através de técnicas de engenharia genética.

Identidade de seqüência: A similaridade entre seqüências de aminoácido é expressa em termos da similaridade entre as seqüências, de

outro modo referida como identidade de seqüência. Identidade de seqüência é freqüentemente medida em termos de identidade percentual (ou similaridade ou homologia); quanto maior a porcentagem, mais similares são as duas seqüências. Variantes de polipeptídeos de antígeno vão possuir um grau relativamente alto de identidade de seqüência quando alinhadas usando métodos padrão.

Métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem-conhecidos na técnica. Altschul e outros (1994) apresentam uma consideração detalhada de métodos de alinhamento de seqüência e cálculos de homologia. A *NCBI Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul e outros, 1990) está disponível de várias fontes, incluindo o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD) e na internet, para uso em conexão com os programas de análise de seqüência blastp, blastn, blastx, tblastn e tblastx. Ele pode ser acessado no website da NCBI. Uma descrição de como determinar identidade de seqüência usando este programa está disponível no website da NCBI, como estão os parâmetros *default*.

Variantes de polipeptídeos antigênicos, tal como polipeptídeo de *Mycobacterium*, são tipicamente caracterizadas por possuírem pelo menos 50% de identidade de seqüência contada em todo o alinhamento de comprimento completo com a seqüência de aminoácido de uma seqüência de antígeno nativa usando o NCBI Blast 2.0, conjunto *gapped blastp* para parâmetros *default*. Proteínas com similaridade ainda maior com as seqüências de referência vão mostrar identidades de porcentagem altas quando avaliadas através deste método, tal como pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de identidade de seqüência. Quando menos do que a seqüência inteira está sendo comparado quanto à identidade de seqüência, variantes vão tipicamente possuir pelo menos 75% de identidade de seqüência na janela curta de 10-20 aminoácidos, e podem possuir identidades de seqüência de pelo menos 85% ou pelo menos 90% ou 95% dependendo de sua similaridade com a seqüência de referência. Métodos para determinação de identidade de seqüência em tais janelas curtas são mostrados no *website* da

NCBI. Variantes de polipeptídeos de domínio do MHC também retêm a atividade biológica do polipeptídeo nativo. Para os propósitos da presente invenção, esta atividade é convenientemente avaliada através da incorporação do domínio variante no polipeptídeo $\beta 1\alpha 1$ ou $\alpha 1\alpha 2$ e determinação da habilidade do polipeptídeo resultante em inibir proliferação de célula T específica de antígeno *in vitro*, ou induzir células supressoras T ou a expressão de IL-10 conforme descrito em detalhes abaixo.

Polipeptídeo terapeuticamente ativo: Um agente, tal como um epítopo de Mtb que causa indução de uma resposta imune, conforme medido através de resposta clínica (por exemplo, aumento em uma população de células imunes, atividade citolítica aumentada contra Mtb ou redução mensurável de um sintoma de uma infecção). Moléculas terapeuticamente ativas podem ser também feitas de ácidos nucléicos. Exemplos de uma molécula terapeuticamente ativa baseada em ácido nucléico é uma seqüência de ácido nucléico que codifica um epítopo de Mtb, onde a seqüência de ácido nucléico está operavelmente ligada a um elemento de controle tal como um promotor.

Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo de Mtb é uma quantidade usada para gerar uma resposta imune. Em vários exemplos, "tratamento" refere-se a uma intervenção terapêutica que melhora um sinal ou sintoma de tuberculose.

Dose terapeuticamente eficaz: Uma dose suficiente para prevenir avanço ou causar regressão da doença ou que é capaz de aliviar sintomas causados pela doença. Em uma modalidade, uma dose terapeuticamente eficaz é uma dose suficiente para prevenir avanço ou aliviar sintomas de tuberculose.

Transduzido e Transformado: Um vírus ou vetor "transduz" uma célula quando ele transfere ácido nucléico para a célula. Uma célula é "transformada" por um ácido nucléico transduzido na célula quando o DNA se torna estavelmente replicada pela célula, ou através da incorporação de ácido nucléico no genoma celular, ou através de replicação epissomal. Conforme aqui usado, o termo transformação compreende todas as técnicas a-

através das quais uma molécula de ácido nucléico seria introduzida em tal célula, incluindo transfecção com vetores virais, transformação com vetores de plasmídeo e introdução de DNA nu através de eletroporação, lipofecção e aceleração de pistola de partícula.

Tuberculose (TB): Uma doença que é geralmente causada por *Mycobacterium tuberculosis* que geralmente infecta os pulmões. No entanto, outras micobactérias "atípicas" tal como *K. kansasii* podem produzir um aparecimento clínico e patológico similar de doença.

Transmissão de *M. tuberculosis* acontece por via oral em áreas fechadas com pouca ventilação. Em mais de 90% dos casos, seguindo infecção com *M. tuberculosis*, o sistema imune previne desenvolvimento de doença a partir de *M. tuberculosis*, freqüentemente chamada tuberculose ativa. No entanto, nem todos os *M. tuberculosis* são mortos, e então cápsulas duras, minúsculas, são formadas. "Tuberculose primária" é vista doença que se desenvolve seguindo uma infecção inicial, geralmente em crianças. O foco inicial de infecção é um granuloma subpleural pequeno acompanhado por infecção do nó linfático hilar granulomatoso. Juntos, esses formam o complexo Ghon. Em quase todos os casos, esses granulomas se decompõem e não há nenhum espalhamento adicional da infecção. "Tuberculose secundária" é vista principalmente em adultos como uma reativação de infecção anterior (ou reinfecção), particularmente quando o estado de saúde declina. A inflamação granulomatosa é muito mais de coloração vermelho-brilhante e espalhada. Tipicamente, os lóbulos do pulmão superior são mais afetados, e cavitação pode acontecer. Disseminação de tuberculose fora dos pulmões pode levar ao aparecimento de várias constatações incomuns com padrões características que incluem tuberculose esqueletal, tuberculose do trato genital, tuberculose do trato urinário, tuberculose do sistema nervoso central (SNC), tuberculose gastrintestinal, tuberculose adrenal, escrófula e tuberculose cardíaca. Tuberculose "latente" é uma infecção com Mtb em um indivíduo que pode ser detectada através de um ensaio de diagnóstico, tal como, mas não limitado a, teste de pele de tuberculina (TST) onde a infecção não produz sintomas naquele indivíduo. Tuberculose "ativa" é uma in-

fecção com Mtb sintomática em um indivíduo.

Microscopicamente, a inflamação produzida com infecção com TB é granulomatosa, com macrófagos epitelióides e células gigantes Langhans junto com linfócitos, células de plasma, talvez algumas células polimorfonucleares, fibroblastos com colágeno e necrose caseosa característica no centro. A resposta inflamatória é mediada por uma reação de hipersensibilidade do tipo IV, e teste de pele é baseado nesta reação. Em alguns exemplos, tuberculose pode ser diagnosticada por um teste de pele, um tingimento rápido com ácido, um tingimento com auramina ou uma combinação deles. O espécime mais comum avaliado é esputo, mas os tingimentos histológicos podem ser também realizados em tecidos ou outros fluidos do corpo.

TB é uma complicação freqüente da infecção com HIV. Infecção com TB em indivíduos infectados com um vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode ser espalhar prontamente e progredir rapidamente para doença ativa. Sintomas específicos de doença pulmonar devido à infecção com Mtb incluem tosse crônica e cuspir sangue. Outros sintomas da doença TB incluem fadiga, perda de apetite, perda de peso, febre e suores noturnos de encharcar.

Vetor: Uma molécula de ácido nucléico é introduzida em uma célula hospedeira, deste modo produzindo uma célula hospedeira transformada. Um vetor pode incluir seqüências de ácido nucléico que permitem que ele replique em uma célula hospedeira, tal como uma origem de replicação. Um vetor pode também incluir um ou mais genes marcadores selecionável e outros elementos genéticos conhecidos na técnica. Vetores incluem vetores de plasmídeo, incluindo plasmídeos para expressão em célula bacteriana gram negativa e gram positiva. Vetores exemplares incluem aqueles para expressão em *E. coli* e *Salmonella*. Vetores também incluem vetores virais tão como, mas não limitado a, vetores de retrovírus, ortopox, avipox, fowlpox, capripox, suipox, adenoviral, herpes vírus, alfa vírus, baculovírus, vírus Sindbis, vírus vaccínia e poliovírus. Vetores também incluem vetores para expressão em células de levedura.

A menos que de outro modo explicado, todos os termos técnicos

e científicos usados aqui têm o mesmo significado como geralmente compreendido por um versado na técnica à qual a presente descrição pertence. Os termos no singular "um", "uma" e "o, a" incluem referentes no plural a menos que o contexto claramente indique de outro modo. Similarmente, a palavra "ou" pretende incluir "e" a menos que o contexto claramente indique de outro modo. Deve ser ainda compreendido que todos os tamanhos de base ou tamanhos de aminoácido, e todos valores de peso molecular ou massa molecular, dados para ácidos nucléicos ou polipeptídeos são aproximados, e são providos para descrição. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente descrição, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. O termo "compreende" significa "inclui". Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências mencionadas aqui são incorporados a título de referência em sua totalidade. No caso de conflito, o presente relatório, incluindo explicações de termos, vai prevalecer. Ainda, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos apenas e não pretendem ser limitantes.

Polipeptídeos *de Mycobacterium*

É aqui descrito que vários polipeptídeos de *Mycobacterium* podem ser usados para induzir uma resposta imune a Mtb, tal como uma resposta de célula T. Os polipeptídeos de *Mycobacterium* podem ser usados em ensaios de diagnóstico para identificar indivíduos infectados com uma *Mycobacterium* tal como Mtb. Em várias modalidades, o polipeptídeo compreende ou consiste na seqüência de aminoácido mostrada como:

1. MX1SRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAGW SGMAEATSLDTMX2X3MNQAFRNIVNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQ ASQQILS, (SEQ ID NO:1, onde X_1 é A ou T, X_2 é T ou A e X_3 é qualquer aminoácido, tal como Q ou nenhum aminoácido

Em vários exemplos, o polipeptídeo compreende ou consiste nas seqüências de aminoácido mostradas como:

a. MASRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAGW SGMAEATSLDTMTQMNQAFRNIVNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQAS

QQILS (SEQ ID NO: 2) (Vide também TUBERCULIST Nº Rv1038c, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como EsxJ, *ES6_2, TB11.0, QILSS*)

b. MASRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAG WSGMAEATSLDTMAQMNQAFRNIVNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQ ASQQILSS (SEQ ID NO: 3, TUBERCULIST Nº Rv1197, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como EsxK, *ES6_3, TB11.0, QILSS*)

c. MASRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAG WSGMAEATSLDTMT+MNQAFRNIVNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQA SQQILSS (SEQ ID NO: 4, TUBERCULIST Nº Rv1992, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como EsxM, *TB11.0, QILSS*)

d. MATRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAG WSGMAEATSLDTMAQMNQAFRNIVNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQ ASQQILSS (SEQ ID NO: 5, TUBERCULIST Nº Rv2347C, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como EsxP, *ES6_7, QILSS*)

e. MTSRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAG WSGMAEATSLDTMTQMNQAFRNIVNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQ ASQQILSS (SEQ ID NO: 6, TUBERCULIST Nº Rv3620, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como EsxW, *ES6_10, QILSS*)

Em modalidades adicionais, o polipeptídeo compreende ou consiste na seqüência de aminoácido mostrada como:

2. MSYMIATPAALTAAATDIDGIGSAVSVANAAAVAATTGVLAAGGDEVLAA IARLFNANAEEYHALSAQVAAFQTLFVRTLTGGCGVFRRRRGRQCVTA AEHRAAGAGRRQRRRRSGDGQWRLRQQRHFGCGGQPEFRQHSEHR R (SEQ ID NO: 7, TUBERCULIST Nº Rv1088, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como PE9).

3. VSLVIATPQLLATAALDLASIGSQVSAANAAAAMPTTEVVAAAADEVSAAI

AGLFGAHARQYQALSVQVAAFHEQFVQALTAAAGRYASTEAAVERSLL
GAVNAPTEALLGRPLIGNGADGTAPGQPGAAGGLLFGNGGNGAAGGF
GQTGGSGGAAGLIGNGGNGGAGGTGAAGGAGGNG GWLWGNGGNG
GVGGTSVAAGIGGAGGNGGNAGLFGHGGAGGTGGAGLAGANGVNPT
PGPAASTGDSPADVSGIGDQTGGDGGTGGHGTAGTPTGGTGGDGAT
ATAGSGKATGGAGGDGGTAAAGGGGGNGGDGGVAQGDIASAFGGD
GGNGSDGVAAGSGGGSGGAGGGAFVHIATATSTGGSGGFGGNGAAS
AASGADGGAGGAGGNGGAGGLLFGDGGNGGAGGAGGIGGDGATGG
PGGSGGNAGIARFDSPDPEAEPDVVGGKGGDGGKGGSGLGVGGAGG
TGGAGGNGGAGGLLFGNGGNGGNAGAGGDGGAGVAGGVGGNGGG
GGTATFHEDPVAGVWAVGGVGGDGGSGGSSLGVGGVGGAGGVGGK
GGASGMLIGNGGNGGSGGVGGAGGVGGAGGDGGNGGSGGNASTFG
DENSIGGAGGTGGNGGNGANGGNGGAGGIAGGAGGSGGFLSGAAGV
SGADGIGGAGGAGGAGGAGGSGGEAGAGGLTNGPGSPGVSGTEGM
AGAPG (SEQ ID NO: 8, TUBERCULIST Nº Rv2487, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como PE_PGRS42)

4. MHQVDPNLTRRKGRLAALAIAAMASASLVTVAVPATANADPEPAPPVPT
TAASPPSTAAAPPAPATPVAPPPPAAANTPNAQPGDPNAAPPPADPNA
PPPPVIAPNAPQPVRIDNPVGGFSFALPAGWVESDAAHFDYGSALLSKT
TGDPPFPGQPPPVANDTRIVLGRLDQKLYASAEATDSKAAARLGSDMG
EFYMPYPGTRINQETVSLDANGVSGSASYYEVKFSDPSKPNGQIWTGVI
GSPAANAPDAGPPQRWFVVWLGTANNPVDKGAAKALAESIRPLVAPPP
APAPAPAEP APAPAPAGEVAPTPTTPTPQRTLPA (SEQ ID NO: 9, TUBERCULIST Nº Rv1860, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como *Apa, modD; mpt32*)

5. MLLALLRQHIRPYRRLVAMLMMLQLVSTLASLYLPTVNAAIVDDGVAKG
DTATIVRLGAVMLGVTGLQVLCAIGAVYLGSRTGAGFGRDLRSAMFEHII
TFSERETARFGAPTLLTRSTNDVRQILFLVQMTATVLVTAPIMCVGGIIMA
IHQEAALTWLLLVSVPILAVANYWIISHMLPLFRRMQSLIDGINRVMRDQL
SGVRVVRAFTREGYERDKFAQANTALSNAALSAGNWQALMLPVTTLTI

NASSVALIWFGGLRIDSGQMQVGSLIAFLSYFAQILMAVLMATMTLAVLP
RASVCAERITEVLSTPAALGNPDNPKFPTDGVTGVVRLAGATFTYPGAD
CPVLQDISLTARPGTTTAIVGSTGSGKSTLVSLICRLYDVTAGAVLVDGID
VREYHTERLWSAIGLVPQRSYLFSGTVADNLRYGGGPDQVVTEQEMW
EALRVAAADGFVQTDGLQTRVAQGGVNFSGGQRQRLAIARAVIRRPAIY
VFDDAFSALDVHTDAKVHASLRQVSGDATIIVVTQRISNAAQADQVIVVD
NGKIVGTGTHETLLADCPTYAEFAASQSLSATVGGVG (SEQ ID NO: 10, TUBERCULIST Nº Rv1273c, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência.

6. MSYVIAAPEMLATTAADVDGIGSAIRAASASAAGPTTGLLAAAADEVSSA
AAALFSEYARECQEVLKQAAAFHGEFTRALAAAGAAYAQAEASNTAAM
SGTAGSSGALGSVGMLSGNPLTALMMGGTGEPILSDRVLAIIDSAYIRPI
FGPNNPVAQYTPEQWWPFIGNLSLDQSIAQGVTLLNNGINAELQNGHD
VVVFGYSQSAAVATNEIRALMALPPGQAPDPSRLAFTLIGNINNPNGGV
LERYVGLYLPFLDMSFNGATPPDSPYQTYMYTGQYDGYAHNPQYPLNI
LSDLNAFMGIRWVHNAYPFTAAEVANAVPLPTSPGYTGNTHYYMFLTQ
DLPLLQPIRAIPFVGTPIAELIQPDLRVLVDLGYGYGYADVPTPASLFAPIN
PIAVASALATGTVQGPQAALVSIGLLPQSALPNTYPYLPSANPGLMFNFG
QSSVTELSVLSGALGSVARLIPPIA (SEQ ID NO: 11, TUBERCULIST Nº Rv0159c, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, conhecido como PE3 ou PE).

7. MEFPVLPPEINSVLMYSGAGSSPLLAAAAAWDGLAEELGSAAVSFGQV
TSGLTAGVWQGAAAAAMAAAAAPYAGWLGSVAAAAEAVAGQARVVV
GVFEAALAATVDPALVAANRARLVALAVSNLLGQNTPAIAAAEAEYELM
WAADVAAMAGYHSGASAAAAALPAFSPPAQALGGGVGAFLTALFASPA
KALSLNAGLGNVGNYNVGLGNVGVFNLGAGNVGGQNLGFGNAGGTNV
GFGNLGNGNVGFGNSGLGAGLAGLGNIGLGNAGSSNYGFANLGVGNI
GFGNTGTNNVGVGLTGNHLTGIGGLNSGTGNIGLFNSGTGNVGFFNSG
TGNFGVFNSGNYNTGVGNAGTASTGLFNAGNFNTGVVNVGSYNTGSF
NAGDTNTGGFNPGGVNTGWLNTGNTNTGIANSGNVNTGAFISGNFNN
GVLWVGDYQGLFGVSAGSSIPAIPIGLVLNGDIGPITIQPIPILPTIPLSIHQ
TVNLGPLVVPDIVIPAFGGGIGIPINIGPLTITPITLFAQQTFVNQLPFPTFS

LGKITIPQIQTFDSNGQLVSFIGPIVIDTTIPGPTNPQIDLTIRWDTPPITLFP
NGISAPDNPLGLLVSVSISNPGFTIPGFSVPAQPLPLSIDIEGQIDGFSTPP
ITIDRIPLTVGGGVTIGPITIQGLHIPAAPGVGNTTTAPSSGFFNSGAGGV
SGFGNVGAGSSGWWNQAPSALLGAGSGVGNVGTLGSGVLNLGSGIS
GFYNTSVLPFGTPAAVSGIGNLGQQLSGVSAAGTTLRSMLAGNLGLAN
VGNFNTGFGNVGDVNLGAANIGGHNLGLGNVGDGNLGLGNIGHGNLG
FANLGLTAGAAGVGNVGFGNAGINNYGLANMGVGNIGFANTGTGNIGI
GLVGDHRTGIGGLNSGIGNIGLFNSGTGNVGFFNSGTGNFGIGNSGRF
NTGIGNSGTASTGLFNAGSFSTGIANTGDYNTGSFNAGDTNTGGFNPG
GINTGWFNTGHANTGLANAGTFGTGAFMTGDYSNGLLWRGGYEGLVG
VRVGPTISQFPVTVHAIGGVGPLHVAPVPVPAVHVEITDATVGLGPFTVP
PISIPSLPIASITGSVDLAANTISPIRALDPLAGSIGLFLEPFRLSDPFITIDAF
QVVAGVLFLENIIVPGLTVSGQILVTPTPIPLTLNLDTTPWTLFPNGFTIPA
QTPVTVGMEVANDGFTFFPGGLTFPRASAGVTGLSVGLDAFTLLPDGF
TLDTVPATFDGTILIGDIPIPIIDVPAVPGFGNTTTAPSSGFFNTGGGGGS
GFANVGAGTSGWWNQGHDVLAGAGSGVANAGTLSSGVLNVGSGISG
WYNTSTLGAGTPAVVSGIGNLGQQLSGFLANGTVLNRSPIVNIGWADV
GAFNTGLGNVGDLNWGAANIGAQNLGLGNLGSGNVGFGNIGAGNVGF
ANSGPAVGLAGLGNVGLSNAGSNNWGLANLGVGNIGLANTGTGNIGIG
LVGDYQTGIGGLNSGSGNIGLFNSGTGNVGFFNTGTGNFGLFNSGSFN
TGIGNSGTGSTGLFNAGNFNTGIANPGSYNTGSFNVGDTNTGGFNPGD
INTGWFNTGIMNTGTRNTGALMSGTDSNGMLWRGDHEGLFGLSYGITI
PQFPIRITTTGGIGPIVIPDTTILPPLHLQITGDADYSFTVPDIPIPAIHIGING
VVTVGFTAPEATLLSALKNNGSFISFGPITLSNIDIPPMDFTLGLPVLGPIT
GQLGPIHLEPIVVAGIGVPLEIEPIPLDAISLSESIPIRIPVDIPASVIDGISMS
EVVPIDASVDIPAVTITGTTISAIPLGFDIRTSAGPLNIPIIDIPAAPGFGNST
QMPSSGFFNTGAGGGSGIGNLGAGVSGLLNQAGAGSLVGTLSGLGNA
GTLASGVLNSGTAISGLFNVSTLDATTPAVISGFSNLGDHMSGVSIDGLI
AILTFPPAESVFDQIIDAAIAELQHLDIGNALALGNVGGVNLGLANVGEFN
LGAGNVGNINVGAGNLGGSNLGLGNVGTGNLGFGNIGAGNFGFGNAG
LTAGAGGLGNVGLGNAGSGSWGLANVGVGNIGLANTGTGNIGIGLTGD
YRTGIGGLNSGTGNLGLFNSGTGNIGFFNTGTGNFGLFNSGSYSTGVG

NAGTASTGLFNAGNFNTGLANAGSYNTGSLNVGSFNTGGVNPGTVNT
GWFNTGHTNTGLFNTGNVNTGAFNSGSFNNGALWTGDYHGLVGFSFS
IDIAGSTLLDLNETLNLGPIHIEQIDIPGMSLFDVHEIVEIGPFTIPQVDVPAI
PLEIHESIHMDPIVLVPATTIPAQTRTIPLDIPASPGSTMTLPLISMRFEGE
DWILGSTAAIPNFGDPFPAPTQGITIHTGPGPGTTGELKISIPGFEIPQIAT
TRFLLDVNISGGLPAFTLFAGGLTIPTNAIPLTIDASGALDPITIFPGGYTID
PLPLHLALNLTVPDSSIPIIDVPPTPGFGNTTATPSSGFFNSGAGGVSGF
GNVGSNLSGWWNQAASALAGSGSGVLNVGTLGSGVLNVGSGVSGIYN
TSVLPLGTPAVLSGLGNVGHQLSGVSAAGTALNQIPILNIGLADVGNFNV
GFGNVGDVNLGAANLGAQNLGLGNVGTGNLGFANVGHGNIGFGNSGL
TAGAAGLGNTGFGNAGSANYGFANQGVRNIGLANTGTGNIGIGLVGDN
LTGIGGLNSGAGNIGLFNSGTGNIGFFNSGTGNFGIGNSGSFNTGIGNS
GTGSTGLFNAGSFNTGVANAGSYNTGSFNAGDTNTGGFNPGTINTGW
FNTGHTNTGIANSGNVGTGAFMSGNFSNGLLWRGDHEGLFSLFYSLDV
PRITIVDAHLDGGFGPVVLPPIPVPAVNAHLTGNVAMGAFTIPQIDIPALT
PNITGSAAFRIVVGSVRIPPVSVIVEQIINASVGAEMRIDPFEMWTQGTN
GLGITFYSFGSADGSPYATGPLVFGAGTSDGSHLTISASSGAFTTPQLE
TGPITLGFQVPGSVNAITLFPGGLTFPATSLLNLDVTAGAGGVDIPAITWP
EIAASADGSVYVLASSIPLINIPPTPGIGNSTITPSSGFFNAGAGGGSGFG
NFGAGTSGWWNQAHTALAGAGSGFANVGTLHSGVLNLGSGVSGIYNT
STLGVGTPALVSGLGNVGHQLSGLLSGGSAVNPVTVLNIGLANVGSHN
AGFGNVGEVNLGAANLGAHNLGFGNIGAGNLGFGNIGHGNVGVGNSG
LTAGVPGLGNVGLGNAGGNNWGLANVGVGNIGLANTGTGNIGIGLTGD
YQTGIGGLNSGAGNLGLFNSGAGNVGFFNTGTGNFGLFNSGSFNTGV
GNSGTGSTGLFNAGSFNTGVANAGSYNTGSFNVGDTNTGGFNPGSIN
TGWLNAGNANTGVANAGNVNTGAFVTGNFSNGILWRGDYQGLAGFAV
GYTLPLFPAVGADVSGGIGPITVLPPIHIPPIPVGFAAVGGIGPIAIPDISVP
SIHLGLDPAVHVGSITVNPITVRTPPVLVSYSQGAVTSTSGPTSEIWVKP
SFFPGIRIAPSSGGGATSTQGAYFVGPISIPSGTVTFPGFTIPLDPIDIGLP
VSLTIPGFTIPGGTLIPTLPLGLALSNGIPPVDIPAIVLDRILLDLHADTTIGPI
NVPIAGFGGAPGFGNSTTLPSSGFFNTGAGGGSGFSNTGAGMSGLLN
AMSDPLLGSASGFANFGTQLSGILNRGAGISGVYNTGALGVVTAAVVSG

FGNVGQQLSGLLFTGVGP (SEQ ID NO: 12, TUBERCULIST Nº 3350c, conforme disponível em 1 de março de 2007, incorporado aqui a título de referência, também conhecido como PPE56 ou PPE.

Em uma segunda modalidade, o polipeptídeo de Mtb de uso nos métodos descritos aqui tem uma seqüência pelo menos 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homóloga à seqüência de aminoácido mostrada em uma das SEQ ID NOs: 1-12. Por exemplo, o polipeptídeo pode ter uma seqüência de aminoácido pelo menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homóloga a uma das seqüências de aminoácido mostradas nas SEQ ID NOs: 1-12. Seqüências exemplares podem ser obtidas usando programas de computador que estão prontamente disponíveis na internet e as seqüências de aminoácido mostradas aqui. Em um exemplo, o polipeptídeo retém uma função da proteína de Mtb, tal como ligação a um anticorpo que especificamente liga o epítopo de Mtb.

Modificações pequenas de uma seqüência de aminoácido primária de polipeptídeo de Mtb podem resultar em peptídeos que têm atividade substancialmente equivalente comparado com o polipeptídeo contraparte não-modificado descrito aqui. Tais modificações podem ser deliberadas, como através de mutagênese direcionada a sítio, ou podem ser espontâneas. Todos os polipeptídeos produzidos por essas modificações estão incluídos aqui. Então, um exemplo não-limitante, específico, de um polipeptídeo de Mtb é uma variante conservativa do polipeptídeo de Mtb. Uma tabela de substituições conservativas é provida aqui. Substituições da seqüência de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 1-12 podem ser feitas com base nesta tabela.

Polipeptídeos de Mtb são descritos aqui que podem ser usados para detectar uma resposta imune a Mtb. Esses peptídeos incluem ou consistem em pelo menos nove aminoácidos, tal como nove a vinte aminoácidos, aminoácidos consecutivos de um polipeptídeo de Mtb mostrado acima. Exemplos não-limitantes, específicos, são doze, onze, dez aminoácidos, ou nove aminoácidos consecutivos de um polipeptídeo de Mtb mostrado acima. Nesses exemplos, o polipeptídeo de Mtb não inclui as seqüências de amino-

ácido de comprimento completo mostradas como SEQ ID NOs: 1-12.

Um polipeptídeo isolado é descrito que inclui nove a doze aminoácidos consecutivos de um polipeptídeo de Mtb, onde o polipeptídeo isolado compreende a seqüência de aminoácido mostrada como QTVEDEARRMW (SEQ ID NO:13). Em algumas modalidades, o polipeptídeo é de nove, dez ou onze aminoácidos de comprimento. Em modalidades adicionais, o polipeptídeo consiste na seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO:13. Um polipeptídeo isolado é descrito que inclui nove a doze aminoácidos consecutivos de um polipeptídeo de Mtb, onde o polipeptídeo isolado compreende a seqüência de aminoácido mostrada como VSAAIAGLF (SEQ ID NO: 14). Em algumas modalidades, o polipeptídeo é de nove, dez ou onze aminoácidos de comprimento. Em modalidades adicionais, o polipeptídeo consiste na seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO:14.

Em várias modalidades, o polipeptídeo de Mtb isolado é incluído em uma proteína de fusão. Então, a proteína de fusão pode incluir o polipeptídeo de Mtb (vide acima) e uma segunda porção heteróloga, tal como uma proteína myc, uma enzima ou um veículo (tal como uma proteína carreadora da hepatite ou albumina de soro bovino) covalentemente ligado ao polipeptídeo de Mtb. Em vários exemplos, um polipeptídeo consistindo em nove a doze aminoácidos de uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NOs: 1-14 que liga MHC classe I é covalentemente ligado a um veículo. Em exemplo adicional, um polipeptídeo consistindo em uma das seqüências de aminoácido mostradas como uma das SEQ ID NOs: 1-14 é covalentemente ligado a um veículo.

Em exemplos adicionais, o polipeptídeo pode ser uma proteína de fusão e pode também incluir seqüências heterólogas a Mtb (tal como seqüências de aminoácido de pelo menos nove aminoácidos de comprimento que não estão incluídas na SEQ ID NO:1). Então, em vários exemplos não-limitantes específicos, o peptídeo imunogênico é um polipeptídeo de fusão, por exemplo, o polipeptídeo inclui seis resíduos de histidina sequenciais, uma seqüência de aminoácido de β-galactosidase ou uma seqüência de aminoácido de imunoglobulina. O polipeptídeo pode também ser covalente-

mente ligado a um veículo. Em modalidades adicionais, a proteína consiste no polipeptídeo de Mtb.

O polipeptídeo pode opcionalmente incluir repetições de um ou mais dos polipeptídeos de Mtb descritos aqui. Em um exemplo não-limitante, específico, o polipeptídeo inclui duas, três, quatro, cinco ou até dez repetições de um dos polipeptídeos de Mtb descritos acima. Alternativamente, mais de um polipeptídeo pode ser incluído em um polipeptídeo de fusão. Então, em vários exemplos, o polipeptídeo pode incluir pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco ou pelo menos seis das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NOs: 1-14. Uma seqüência ligante pode ser opcionalmente incluída entre os polipeptídeos de Mtb.

Os polipeptídeos de Mtb descritos aqui podem ser quimicamente sintetizados através de métodos padrão ou podem ser produzidos recombinantemente. Um processo exemplar para produção de polipeptídeo é descrito em Lu e outros, *Federation of European Biochemical Societies Letters.* 429:31-35, 1998. Eles podem ser também isolados através de métodos incluindo cromatografia preparativa e separações imunológicas.

Se desejado, polipeptídeos podem ser também quimicamente sintetizados através de tecnologias emergentes. Um tal processo é descrito em W. Lu e outros, *Federation of European Biochemical Societies Letters.* 429:31-35, 1998. Polipeptídeos podem ser também produzidos usando técnicas genéticas moleculares, tal como através de inserção de um ácido nucléico codificando Mtb ou um epítopo dele em um vetor de expressão, introdução do vetor de expressão em uma célula hospedeira e isolamento do polipeptídeo (vide abaixo).

Polinucleotídeos codificando os polipeptídeos de Mtb descritos aqui são também providos. Seqüências de ácido nucléico exemplares são mostradas abaixo:

ESXJ (PROTEÍNA TIPO ESAT-6 2)

atggcctcgcgttttatgacggatccgcacgcgatgcgggacatggcgggccgttttgag
gtgcacgcccagacggtggaggacgaggctcgccggatgtgggcgtccgcgcaaaacatc

tcgggcgcgggctggagtggcatggccgaggcgacctcgctagacaccatgacccagatg
aatcaggcgtttcgcaacatcgtgaacatgctgcacggggtgcgtgacgggctggttcgc
gacgccaacaactacgaacagcaagagcaggcctcccagcagatcctcagcagctga
(SEQ ID NO: 15)

ESXK (PROTEÍNA TIPO ESAT-6 3)

atggcctcacgttttatgacggatccgcacgcgatgcgggacatggcgggccgttttgag
gtgcacgcccagacggtggaggacgaggctcgccggatgtgggcgtccgcgcaaaacatt
tccggtgcgggctggagtggcatggccgaggcgacctcgctagacaccatggcccagatg
aatcaggcgtttcgcaacatcgtgaacatgctgcacggggtgcgtgacgggctggttcgc
gacgccaacaactacgagcagcaagagcaggcctcccagcagatcctcagcagctaa
(SEQ ID NO: 16)

ESXM (PROTEÍNA TIPO ESAT-6 ESXM)

atggcctcacgttttatgacggatccgcatgcgatgcgggacatggcgggccgttttgag
gtgcacgcccagacggtggaggacgaggctcgccggatgtgggcgtccgcgcaaaacatt
tccggtgcgggctggagtggcatggccgaggcgacctcgctagacaccatgacctagatg
aatcaggcgtttcgcaacatcgtgaacatgctgcacggggtgcgtgacgggctggttcgc
gacgccaacaactacgaacagcaagagcaggcctcccagcagatcctgagcagctag
(SEQ ID NO: 17)

ESXP (PROTEÍNA TIPO ESAT-6 7)

atggcaacacgttttatgacggatccgcacgcgatgcgggacatggcgggccgttttgag
gtgcacgcccagacggtggaggacgaggctcgccggatgtgggcgtccgcgcaaaacatc
tcgggcgcgggctggagtggcatggccgaggcgacctcgctagacaccatggcccagatg
aatcaggcgtttcgcaacatcgtgaacatgctgcacggggtgcgtgacgggctggttcgc
gacgccaacaactacgagcagcaagagcaggcctcccagcagatcctcagcagctaa
(SEQ ID NO: 18)

ESXW (PROTEÍNA TIPO ESAT-6 10)

atgacctcgcgttttatgacggatccgcacgcgatgcgggacatggcgggccgttttgag
gtgcacgcccagacggtggaggacgaggctcgccggatgtgggcgtccgcgcaaaacatt
tccggcgcgggctggagtggcatggccgaggcgacctcgctagacaccatgacccagatg
aatcaggcgtttcgcaacatcgtgaacatgctgcacggggtgcgtgacgggctggttcgc
gacgccaacaactacgaacagcaagagcaggcctcccagcagatcctcagcagctga
(SEQ ID NO: 19)

PE9 (PROTEÍNA DA FAMÍLIA PE)

atgtcatacatgattgccacaccagcggcgttgacggcggcggcaacggatatcgacggg
attggctcggcggttagcgttgcgaacgccgcggcggtcgccgcgacaaccggagtgctg
gccgccggtggcgatgaagtgttggcggccatcgctaggctgttcaacgcaaacgccgag
gaatatcacgccctcagcgcgcaggtggcggcgtttcaaaccctgtttgtgcgcaccttg
actgggggtgcggagtctttcgccggcgccgaggccgccaatgcgtcacagctgcagag
catcgcgcggcaggtgcggggcgccgtcaacgccgtcgccggtcaggtgacgggcaatgg
cggctccggcaacagcggcacttcggctgcggcggccaacccgaattccgacaacacagc
Gagcatcgccgatag

(SEQ ID NO: 20)

PE_PGRS42 (PROTEÍNA DA FAMÍLIA PE-PGRS)

gtgtcgttggtgatcgcgacgccgcagctgctggcaactgcggctttggatttagcgagt
attggttcgcaggtgagcgcggctaatgcggccgcggcgatgccgacgacggaagtggtg
gctgcggctgccgatgaagtgtcggcggcgattgcggggttgttcggggcccatgctcgg
cagtatcaggcgctcagcgtacaggtggcagcgtttcacgagcagtttgtgcaggcgttg
actgcggccgcgggtcggtatgccagcactgaggccgctgttgagcggagtctgctgggt
gcggtgaatgcgcccaccgaggcgcttttggggcgcccgttgatcggaaacggcgccgac
gggacggcacccgggcagcctggcgcggccggcgggttgctgtttggcaacggtggcaac
ggcgcggctggcgggttcggtcaaaccggcggcagcggaggcgcggccgggttgatcggc
aacggcggcaacggcggggccggtggtaccggcgcggccggcggtgccggtgggaacggg
gggtggttgtggggcaacggcggcaacggcggtgtcggcggcaccagcgtggccgcaggc
atcgggggtgcgggcggtaacggcggcaacgccgggctgttcggccatggcggcgccggt
ggtaccggcggcgccggcctcgccggggcaaacggggtcaatcccacgcccggccccgcg
gccagcaccggggacagcccggcagatgtgtccggcatcggtgatcaaaccggcggcgac
ggcggcacgggcggccatggcactgccggcacgccgaccggtggcaccggcggcgacggt
gccaccgcgacggcaggctcgggcaaggccaccggcggtgccggtggtgacggcggtacc
gccgctgccggtggcggcggcggcaacggcggcgacggcggagtcgcgcagggcgacatt
gcgagcgcctttggcggtgatggtggcaacgggtccgacggtgtagccgccggcagtggg
ggtggtagcggcggcgccggaggcggcgctttcgtacacatcgccactgccacctctacc
ggtggtagcggcggtttcggtggtaacggggctgccagtgccgcctccggcgccgacggt
ggcgcagggggagctggcggcaatggtggcgccggcgggttgctattcggtgatggcggc
aacggtggcgccggtggcgcgggtggtatcggtggtgacggcgccacgggggggcccggg

ggaagcggcggcaacgctggcatcgcgaggtttgacagcccagaccccgaggcagaaccc
gatgtggtcggcggcaagggtggtgatggcggcaagggcggcagcggccttggcgtcggc
ggcgccggcgggaccggcggcgcgggcggcaacggcggcgccggcgggttgttgttcggc
aacggcggcaacggcggcaacgccggggccggcggggatggcggcgccggcgttgccggt
ggggttggcggtaacggcggcggtggtggcaccgcgacgtttcacgaagacccggtcgct
ggtgtctgggcggtcggtggcgtaggtggtgatggtggctccggcggcagctcgcttggt
gtcggcggggtgggcggagccggtggcgtgggtggcaagggtggcgccagcggcatgttg
atcggcaacggcggcaacggtggcagcggcggagtcggtggggccggtggagtcggcggg
gctggcggtgacggcggcaacggcggctccggtggcaacgccagtacttttggcgatgag
aactccatcggcggggccggcgggacgggcggcaacgggggcaacggcgcaaacggcggt
aacggtggcgctggcggtattgccggcggtgcgggtgggtccggagggttcctcagcggt
gccgcaggagtcagcggcgctgacggtatcggtggcgcgggcggcgcaggcggtgccggt
ggcgcgggcggtagcggcggtgaggcaggcgcgggggcctcaccaacggccccgggtcc
cctggcgtttccggcaccgaaggcatggccggcgcgcccggctag
(SEQ ID NO: 21)

Rv1860 (PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DE FIBRONECTINA

atgcatcaggtggaccccaacttgacacgtcgcaagggacgattggcggcactggctatc
gcggcgatggccagcgccagcctggtgaccgttgcggtgcccgcgaccgccaacgccgat
ccggagccagcgcccccggtacccacaacggccgcctcgccgccgtcgaccgctgcagcg
ccacccgcaccggcgacacctgttgcccccccaccaccggccgccgccaacacgccgaat
gcccagccgggcgatcccaacgcagcacctccgccggccgacccgaacgcaccgccgcca
cctgtcattgccccaaacgcaccccaacctgtccggatcgacaacccggttggaggattc
agcttcgcgctgcctgctggctgggtggagtctgacgccgcccacttcgactacggttca
gcactcctcagcaaaaccaccggggacccgccatttcccggacagccgccgccggtggcc
aatgacacccgtatcgtgctcggccggctagaccaaaagctttacgccagcgccgaagcc
accgactccaaggccgcggcccggttgggctcggacatgggtgagttctatatgccctac
ccgggcacccggatcaaccaggaaaccgtctcgctcgacgccaacggggtgtctggaagc
gcgtcgtattacgaagtcaagttcagcgatccgagtaagccgaacggccagatctggacg
ggcgtaatcggctcgcccgcggcgaacgcaccggacgccgggcccccctcagcgctggttt
gtggtatggctcgggaccgccaacaacccggtggacaagggcgcggccaaggcgctggcc
gaatcgatccggcctttggtcgccccgccgccggcgccggcaccggctcctgcagagccc
gctccggcgccggcgccggccggggaagtcgctcctaccccgacgacaccgacaccgcag

cggaccttaccggcctga

(SEQ ID NO: 22)

Rv1273c (TRANSPORTADOR ABC DE PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DE ATP DE TRANSMEMBRANA DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS PROVÁVEL)

atgctcctggccctgctgcgccagcacatccgaccgtaccgccggctggtcgcgatgctg
atgatgctgcagctggtcagcaccctggcttcgctatacctcccgacggtcaacgccgca
atcgtcgacgacggcgtcgccaagggcgacaccgccaccatcgtacggctgggtgcggtg
atgcttggggtgaccggattgcaggtgctgtgcgcgatcggggcggtctatctgggctcc
cggaccggggcgggtttcggccgtgacctgcgctcggcaatgttcgaacacatcatcacc
ttctcggaacgcgagaccgcccgattcggcgctccgacgttgttgacccgcagcaccaac
gacgtccggcagatcctgttcctggtccagatgaccgccaccgtgctggtcaccgcaccg
atcatgtgcgtcggcggaatcatcatggccatccaccaggaggccgcgctgacatggctg
ctgctggtcagcgttccgattctggccgtagcaaactactggatcatctcccacatgctg
ccgctcttccgccgcatgcagagcctgatcgacggcatcaaccgggtgatgcgcgatcag
ctgtccggggtgcgagtggtccgcgccttcacccgcgaaggctatgaacgcgacaagttc
gcgcaggccaatacggcgctgtcgaatgccgcactgagcgccggcaactggcaagcactg
atgctgccggtgaccacgctgaccatcaacgcatccagcgtcgcactgatctggttcggt
gggctacgcatcgacagcggccagatgcaggtcggctccctgatcgccttcctgtcctac
ttcgcccagatcctgatggcggtgttgatggcgaccatgacgctggccgtgctgccacga
gcgtcggtctgcgccgaacgcatcaccgaggtgctttccacgcccgccgcactcggtaac
cccgacaatcccaagttcccgacggacggggtcacgggcgtagtgcgcttggctggcgca
acctttacctatcctggcgccgactgcccggtgctgcaggacatttcgttgactgcgcgg
cccggtaccaccaccgcgatcgtcggcagtaccggttcgggcaagtcgacactggtgtcg
ttgatctgccggctctacgacgtcaccgctggcgcggtcttggttgacggtatcgacgtc
cgcgagtaccacaccgagcggctctggtcagcgatcgggctggtgccccagcgcagctac
ctcttctccggaaccgtcgcggacaacctgcgctacggcgggggcccagaccaggtagtc
accgagcaggagatgtgggaggcgctgcgggtcgccgcggccgacggctttgtacaaaca
gacgggctgcagacgcgtgtcgcccaaggtggtgtcaacttctccggcgggcagcgccaa
cggctggcgatagcccgagcggtcatccgacgtccggccatctatgtgttcgacgacgcg
ttctccgcacttgacgtgcacaccgacgccaaagtccacgcatcgctgcgacaggtatct
ggtgatgcaaccatcattgttgttacacaacggatttcgaatgccgctcaggccgaccag
gtcatcgttgtcgataacggtaagatcgtcggcacgggcacccacgaaacgctgctggcc

gattgccccacctatgccgaattcgccgcctcacaatcgctgagcgccacggtcgggggt
gtagggtga
(SEQ ID NO: 23)
Rv0159C (PROTEÍNA DA FAMÍLIA PE)
atgtcctacgtcatcgcggccccggagatgttggcaacgacggccgcggacgtggacggg
atcggttcggcgatacgagcggccagcgcgtccgctgcgggtccaacgaccggactgctg
gccgcggccgccgatgaggtgtcgtcggccgctgcagcgctgttcagcgaatacgcgcgc
gaatgtcaagaggtcctaaagcaggctgcggcgttccatggcgagttcacccgggcgctg
gctgccgccggggccgcctatgcccaggctgaagccagcaacaccgctgctatgtcgggc
accgccgggtccagcggcgccctcggttctgtcgggatgctgtcaggcaacccgctaacc
gcgttgatgatgggcggcaccggggaaccgatccttagtgaccgcgtcttggcgatcatt
gacagcgcatacattcggcccattttcgggcccaacaacccggtcgcccagtacacgccc
gagcagtggtggccgtttatcgggaacctgtcactggaccaatccatcgcccagggtgtc
acgctgctgaacaacggcatcaacgcggaactacaaaatgggcatgacgtcgtcgttttc
ggctactcgcaaagcgccgcggtagcgaccaatgaaatacgcgctcttatggcgttacca
ccgggccaagccccagatccaagccggctggctttcacgttgatcggtaatatcaataac
cccaacggcggcgtcctcgagcgttacgtgggcctttacctcccgttcttggatatgtcg
ttcaacggtgcgactccaccggattcccccctaccagacctacatgtacaccggccaatac
gacggctacgcccacaacccgcagtacccgctcaatatcttgtcggacctcaacgccttc
atgggcatcagatgggtgcacaacgcgtaccccttcaccgcggccgaggttgccaatgcc
gtgccgttgcccacgtctccgggctacaccggcaacacccattactacatgtttctgacc
caggacctgccgctgttgcagccgattcgcgccatccccttcgtagggaccccaatagcc
gagctgattcagcccgacctacgggtgctagtcgacttgggctatggctacggctacgcc
gacgtacccaccccggccagcctgttcgcgccaatcaacccgatcgccgtggcctcggcc
ctggcgaccgggaccgtgcaaggcccccaagccgccctagtaagcatcggattgttaccg
cagtccgcgctacccaatacgtatccgtatcttccgtcggcgaatccgggcctgatgttc
aacttcggtcaatccagtgtgacggagttgtcggtgctcagtggcgccctcgggtccgta
gcgagattgattccaccgatcgcgtga
(SEQ ID NO: 24)
Rv3350C (PROTEÍNA DA FAMÍLIA PPE)
atggagtttccggtgttgccaccggaaatcaactccgtgctgatgtattcgggtgcgggg
tcgagcccgttgctggcggcggccgcggcgtgggatgggctggctgaggagttggggtcg

gcggcggtgtcgtttgggcaggtgacgtcgggcctgacggcgggggtgtggcagggtgcg
gcggcggcggcgatggcggccgcggcggcgccgtatgcggggtggttgggttcggtggcg
gccgcggccgaggcggtggccgggcaggcgcgggtggtggtgggggtctttgaggcggcg
ttggcggcgacggtggatccggcgctggtggcggccaaccgggcgcggctggtggcgttg
gcggtgtcgaatctgttggggcagaacacgccggcgatcgcggccgccgaggccgagtac
gagctgatgtgggccgccgatgtggcggcgatggccggctaccattccggcgcgtcggct
gctgccgcggcgttgccggcgttcagcccaccggcgcaggcgctgggggaggtgtcggc
gcgttccttaccgccctgttcgccagccctgcgaaggcgctgagcctgaatgcgggtttg
ggcaatgtcggcaattacaacgtcgggttgggcaatgtcggggtgttcaacctgggcgcg
ggcaatgtgggtgggcagaatctgggtttcgggaatgccggtggcaccaatgtcgggttc
ggcaacctcggtaacgggaatgtcgggttcggcaactccggtctgggggcgggcctggcc
ggcttgggcaatatcgggttgggcaatgcgggcagcagcaactatggtttcgcaaacctg
ggtgtgggcaacatcggtttcggcaacaccggcaccaacaacgtcggcgtcgggctcacc
ggcaaccacctgacgggtatcgggggcctgaattcgggcaccgggaatatcgggttgttc
aactccggcaccgggaatgtggggttcttcaattcggggaccgggaacttcggggtgttc
aactcgggtaattacaacaccggtgtcggtaatgcggggacggccagcacggggttgttc
aatgccggcaatttcaacaccggcgtggtgaacgtgggcagttacaacaccggcagtttc
aacgccggcgacaccaacaccggtggcttcaaccccggcggtgtgaacaccggctggctg
aacaccggcaacaccaacaccggcatcgccaactcgggcaacgtcaacaccggcgcgttc
atctcgggcaacttcaacaacggcgtgctgtgggtgggtgactaccagggcctgttcggc
gtctccgccggctcgtcgatccccgcaattcccatcggcctggtgctcaacggcgacatc
ggcccgatcaccatccagcccatcccgatcctgcccaccatcccgctcagcattcaccaa
accgtcaacttgggcccgctggtggttcccgacatcgtgatccccgccttcggcggcggt
atcggcatacccatcaacatcggcccgctgaccatcacacccatcaccctgtttgcccaa
cagacatttgtcaaccaattgccctttcccaccttcagtttagggaaaatcacaattcca
caaatccaaacctttgattctaacggtcagcttgtcagctttatcggccctatcgttatc
gacaccaccattcccggacccaccaatccacagattgatttaacgatcagatgggatacc
cctccgatcacgctgttcccgaatggcatcagtgctcccgataatcctttggggttgctg
gtgagtgtgtcgatcagtaacccgggctttaccatcccgggatttagtgttcccgcgcag
ccgttgccgttgtcgatcgatatcgagggccagatcgacgggttcagcaccccgccgatc
acgatcgatcgcatccccctgaccgtgggggcggggtcacgatcggccccatcacgatc
cagggccttcatatcccggcggcgccgggagtggggaacaccaccacggccccgtcgtcg

ggattcttcaactccggtgcgggtggggtgtcgggtttcggcaacgtcggcgcgggcagc
tcgggctggtggaaccaggcgccgagcgcgctgttgggggccggttcgggtgttggcaac
gtgggcaccctgggctcgggtgtgctcaacctgggctcagggatctcggggttctacaac
accagcgtgttgcctttcgggacaccggcggcggtgtcgggcatcggcaacctgggccag
5 cagctgtcgggggtgtcggcggcgggaaccacgctgcgctcgatgctcgccggcaacctc
gggttggccaatgtgggcaacttcaacaccgggttcggaaatgtcggggacgtcaacctg
ggtgcggccaacatcggtgggcacaacctgggcctgggcaatgtcggggacggcaacctg
gggttgggcaacatcggccatggcaacctggggtttgccaacttgggcctgaccgccggc
gcggcgggggtgggcaatgttggttttggcaatgccggcatcaacaactatggcttggcg
10 aacatgggtgtgggcaatattgggtttgccaacaccggcacgggcaacatcgggatcggg
ctggtcggggaccatcggaccgggatcgggggcttgaactccggcatcggcaatatcggg
ttgttcaactccggcaccggcaacgtcgggttcttcaattccgggaccggcaacttcggc
atcgggaactccggccgcttcaacaccgggatcggtaatagcggaacggccagcaccggg
ctcttcaatgccggcagcttcagcaccggcatcgccaacactggtgactacaacacgggc
15 agcttcaacgccggcgacaccaacaccggtggcttcaacccgggcggcatcaacaccggc
tggttcaacaccgggcatgccaacaccgggttggccaacgcgggcaccttcggcaccggc
gccttcatgacgggcgactacagcaacggcctgttgtggcggggcggctacgagggcctg
gtcggcgtccgcgtcgggcccacgatctcccaattcccggtcaccgtgcacgcgatcggc
ggggtgggcccgctgcatgtggcgcccgtcccggtacccgccgtgcacgtcgagatcacc
20 gacgccaccgtcggcctgggtccgttcaccgtcccaccgatcagcattccctcacttccc
atcgccagcatcaccggaagcgtggacctggccgcaaacaccatctcgccgattcgcgct
cttgacccgctcgccggttcgatagggctttttctcgagccgttccgcctcagtgaccca
tttatcaccattgatgcgttccaagttgttgccggtgtcttgttcctagagaacatcatt
gtgcccggcctcacggttagcggtcagatattggtcaccccgacaccaattcccctaacc
25 ctcaacttggacaccaccccgtggacgcttttcccgaatggtttcaccattcccgcgcaa
acccccgtgacggtgggtatggaggtcgccaacgacgggttcaccttcttcccgggtggg
ctgacctttccgcgggcctccgccggggtcaccggactgtccgtggggctggacgcgttc
acgctgttgcccgacgggttcaccctcgacaccgtgccggcgaccttcgacggcaccatc
ctcatcggcgatatcccgatcccgatcatcgatgtgccggcggtgccggggttcggcaac
30 accaccacggccccatcgtcggggttcttcaacaccggcggcggcggtggatcggggttc
gccaacgtcggcgcgggcacgtcgggctggtggaaccaggggcacgacgtgttagcaggg
gcgggctcgggagttgccaatgccggcacgctgagctcgggcgtgctgaacgtcggctcg

gggatctccgggtggtacaacaccagcaccctgggagcgggcaccccggcggtggtctcg
ggcatcggcaacctcggccagcagctgtcggggttcttggcaaatgggaccgtgctcaac
cggagccccattgtcaatatcgggtgggccgatgtgggcgcgttcaacaccgggttgggc
aatgtgggggacctcaactggggtgcggccaacatcggcgcgcagaacctgggcctgggc
aatctcggcagcgggaacgtcgggttcggcaacatcggtgccggcaacgtcgggttcgcc
aactcgggtccggcggtgggcctggccggcctgggcaacgtggggttgagcaatgccggc
agcaacaactgggggctggccaacctgggtgtgggcaacatcgggttggccaacaccggc
acgggcaacatcgggatcgggctggtcggcgactaccagaccggcatcggcggcctcaac
tcgggtagtggcaatatcggattgttcaattccggcaccggcaatgtcgggttcttcaac
accggcaccggcaacttcggactgttcaactccggtagtttcaacaccggcatcggtaat
agcggaaccggcagtactgggctcttcaatgccggcaatttcaacaccggcatcgccaac
cccgggtcgtacaacacgggcagcttcaatgtcggtgataccaacaccggtggtttcaac
ccgggcgacatcaacaccggctggttcaacaccggcattatgaatacgggcacccgcaac
accggcgccctcatgtcggggaccgacagcaacggcatgctgtggcgcggcgaccacgag
ggcctgttcggcctgtcctatggcatcacgatcccgcaattcccgatccgcatcaccacg
actggcggtatcggccccatcgtcatcccggacaccacgatccttccgccgctgcacctg
cagatcaccggcgacgcggactacagcttcaccgtgcccgacatccccatccccgccatc
cacatcggcatcaatggcgtcgtcaccgtcggcttcaccgccccggaagccaccctgctg
tccgccctgaagaataacggtagcttcatcagcttcggccccatcacgctctcgaatatc
gatattccgcccatggatttcacgttaggcctgcccgttcttggtcctatcacgggccaa
ctcggaccaattcatcttgagccaatcgtggtggccgggatcggtgtgcccctggagatc
gagcccatccccctggatgcgatttcgttgagtgagtcgattcctatccgcatacctgtt
gatattccggcctcggtcatcgatgggatttcaatgtcggaagtggtgccgatcgatgcg
tccgtggacatcccggcggtcacgatcacaggcaccaccatttccgcgatcccgctgggc
ttcgacattcgcaccagtgccggacccctcaacatcccgatcatcgacatcccggcggcg
ccgggcttcgggaactcgacccagatgccgtcgtcggggttcttcaacaccggtgccggc
ggcggatcgggcatcggcaacttgggtgcgggcgtgtcgggcctgctcaaccaggccggc
gcggggtcactggtggggacactctcggggctgggcaatgccggcaccctggcctcgggt
gtgctgaactccggcaccgccatctccgggctgttcaacgtgagcacgctggacgccacc
accccggcggtgatctcggggttcagcaacctcggcgaccatatgtcgggggtgtccatc
gatggcctgatcgcgatcctcaccttcccacctgccgagtccgtgttcgatcagatcatc
gacgcggccatcgccgagctgcagcacctcgacatcggcaacgctttggccttgggcaat

gtcggcggggtgaacctcggtttggctaacgtcggtgagttcaacctgggtgcgggcaac
gtcggcaacatcaacgtcggcgccggcaacctcggcggcagcaacttggggttgggcaac
gtcgggaccggcaacctcgggttcggcaacatcggtgccggcaatttcggattcggcaac
gcgggcctgaccgcgggcgcgggggcctgggcaatgtggggttgggtaacgccggcagc
ggcagctgggggttggccaacgtgggtgtgggcaatatcgggttggccaacaccggcacc
ggcaacatcgggatcgggctgaccggggactatcggaccgggatcggcggcctgaactcg
ggcaccgggaacctcgggttgttcaactcgggcaccggcaacatcgggttcttcaacacc
gggaccgggaacttcgggctgttcaactcgggcagttacagcaccggtgtggggaatgcg
ggcacggccagcaccgggttgttcaacgcggggaacttcaacaccggtctggccaatgcc
ggctcctacaacaccggcagcctcaacgtgggcagcttcaacaccggcggcgtcaacccg
ggcaccgtcaacaccggctggttcaacaccggccacaccaacaccggcctgttcaacacc
ggcaacgtcaacaccggcgcgttcaactccggcagcttcaacaacggggcgctgtggacc
ggtgactaccacgggctggtcggcttctccttcagcatcgacatcgccggcagcaccctg
ctggacctcaacgaaaccctcaacctgggccccatccacatcgagcagatcgacatcccc
ggcatgtcgctgttcgacgtccacgaaatcgtcgagatcggacccttcaccatcccgcag
gtcgatgttcccgcgataccgctagagatccacgaatcgatccacatggatcccatcgtc
ctggtgcccgccaccacaattcccgcacagacgagaaccattccgctggacatccccgcc
tcacccgggtcaaccatgacgcttccgctcatcagcatgcgcttcgaaggcgaggactgg
atcctcgggtcgaccgcggcgattcccaatttcggagacccccttcccggcgcccacccag
ggcatcaccattcacaccggccctggccccggaacgaccggcgagctcaagatatctatt
ccgggtttcgagattccgcaaatcgctaccacgagattcctgttggacgtgaacatcagc
ggtggtctgccggccttcaccttgttcgcgggtggcctgacgatccccacgaacgccatc
ccgttaacgatcgatgcgtccggcgcgctggatccgatcacgattttcccgggtgggtac
acgatcgacccgctgccgctgcacctggcgctgaatctcaccgtgcccgacagcagcatc
ccgatcatcgatgtcccgccgacgccagggttcggcaacaccacggcgaccccgtcgtcg
gggttcttcaactccggcgccggtggggtgtcggggttcggaaacgtcgggtcgaacctg
tcgggctggtggaaccaggcggcgagcgcgctggcggggtcgggatcgggggtgttgaat
gtcggcacgctgggctcgggtgtgctcaacgtcggctcgggtgtctcggggatctacaac
accagcgtgttgccgctcgggacgccggcggtgctgtcgggcctcggcaacgtcggccat
cagctgtcgggcgtgtctgcggccgggaccgcgttgaaccagatccccatcctcaacatc
gggttggcggatgtgggcaacttcaacgtcgggttcggcaacgtcggggacgttaacctg
ggcgcggccaacctcggtgcgcaaaacctggggctgggcaacgtcggcaccggcaacctc

ggcttcgccaacgtcggccacggcaatatcggtttcggcaattcgggtctgaccgccggc
gcggccggcctgggcaacacggggttcggcaatgccggcagcgccaactatggtttcgcc
aaccagggcgtgcgcaacatcgggttggccaacaccggcaccggcaacatcgggatcggg
ctggtgggggacaacctcaccggcatcgggggcctgaactccggtgccggcaatatcggc
ttgttcaactccggcaccggcaacatcgggttcttcaactccgggaccggcaacttcggc
atcggtaactcgggcagcttcaacaccggcatcggcaatagcggaacgggcagcactggg
ctcttcaatgccggcagcttcaacaccggcgtggccaacgccggcagctacaacaccggc
agcttcaatgccggcgacaccaacaccgggggttcaacccgggcaccatcaacaccggc
tggttcaacaccggccacaccaataccggcatcgccaactcgggcaacgtcggcaccggc
gcgttcatgtcgggcaacttcagcaacggcctgttgtggcggggtgatcacgagggcctg
ttcagcctgttctacagcctcgacgtgccccggatcaccatcgtggacgcccacctcgac
ggcggcttcggacccgtggtcctcccgcccatcccggtgccggccgttaatgcgcacctg
accggaaacgtcgcgatgggcgcattcaccattccgcagatcgacatccccgcactcacc
ccaaacatcaccggaagcgccgccttccgcatcgttgtggggtccgtgcgcattccgccg
gtgagtgtcattgtggagcaaataatcaacgcctcggttggggcggagatgaggatagat
cccttcgaaatgtggactcaaggcactaatggccttggtataaccttctattcattcgga
tcggccgacggttcgccctacgccaccggcccactcgttttcggcgccggcacgagcgac
ggaagccatctcaccatttccgcgtccagcggggcgtttaccactccgcagctcgaaact
ggcccgatcacgttgggcttccaggtgcccggcagcgtcaacgcgatcaccctcttcccc
ggtggtttgacgttcccggcgacctcgctgctgaacctggacgtgaccgccggcgccggc
ggcgtggacatcccggccatcacctggcccgagatcgcggcgagcgccgacggctcggtg
tatgtcctcgccagcagcatcccgctgatcaacatcccgcccaccccgggcattgggaac
agcaccatcaccccgtcgtcgggcttcttcaacgccggcgcgggcgggggatcgggcttc
ggcaacttcggcgcgggcacctcgggctggtggaaccaggcgcacaccgcgctggcgggg
gcgggctcgggttttgccaacgttggcacgctgcattccggtgtgctcaacctgggctcg
ggtgtctcggggatctacaacaccagcacgctgggggtggggaccccggcgctggtctca
ggcctgggcaacgtcggccaccaactgtcggggctgctttccggcgggtccgcggtgaac
ccggtgaccgttctgaatatcgggttggccaacgtcggcagccacaacgccggtttcggc
aatgtcggggaggtcaacctgggcgcggccaacctcggcgcgcacaacctgggcttcgga
aatatcggcgccggcaacctggggttcggcaatattggccacggcaatgtcggagtcggc
aactcgggtctgaccgcgggcgtgccgggcctgggcaatgtggggttgggcaatgccggc
ggcaacaactgggggttggccaacgtgggcgtgggcaatatcgggttggccaacaccggc

accggcaacattgggatcgggctgaccggcgactaccagaccggcatcggcggcctaaat
tccggtgccggcaacctggggttgttcaactccggcgccggcaacgtcgggttcttcaac
accgggaccggcaacttcgggttgttcaactccggcagcttcaacaccggcgtcggcaat
agcggaacgggcagcactgggctcttcaatgccggcagtttcaacaccggtgtggccaac
gccggcagctacaacacgggcagcttcaatgtcggtgacaccaacaccgggggcttcaac
ccgggcagcatcaacaccggctggctcaacgccggcaacgccaacaccggggtggccaac
gcgggcaatgtcaacaccggcgccttcgtcaccggcaacttcagcaacggcatcctgtgg
cgcggcgactaccagggcctggccggcttcgccgtgggctacaccctcccgctgttcccc
gcggtgggcgccgacgtcagcggcgggatcggcccgattaccgtgctgccgcccatccac
atcccgcccattccggtcggcttcgccgcggtcggtggcatcggcccgatcgccatcccg
gacatctctgttccatccattcacttgggcctcgaccccgccgtccatgtcggctccatc
accgtcaaccccattaccgtcaggaccccgcccgtgctcgtcagttactcccaaggagcc
gtcaccagcacgtccggaccaacctcagagatttgggtcaagcccagcttcttccccgga
atccggatcgcgccctctagcggcgggggtgcaacgtccacgcaaggggcatactttgtg
gggcccatctccatcccctccggcacggtgaccttcccgggattcaccatcccccctcgac
ccgatcgacatcggcctgccggtgtcgctgaccatcccggggttcaccatcccgggcggc
accctgatccccaccctcccgctgggcctcgcgttgtccaatggcatcccgcccgtcgac
atcccggccatcgttctcgaccggatcttgctggacctgcacgccgacaccactatcggc
ccgatcaacgtcccgatcgccgggttcggcggggcgccgggtttcgggaactcgaccacg
ctgccgtcgtcgggcttcttcaacaccggagctggcggcggttcgggctttagcaacacc
ggcgcgggcatgtcgggattgctcaacgcgatgtcggatccgctgctcgggtcggcgtcg
ggcttcgccaacttcggcacccagctctccggcatcctcaaccgcggcgccggcatctcg
ggcgtgtacaacaccggcgcgctgggtgttgtcaccgcggccgtcgtctcgggtttcggc
aacgtcggccagcaactgtcgggcttgctcttcaccggcgtcgggccctaa
(SEQ ID NO: 26)

Esses polinucleotídeos incluem seqüências de DNA, cDNA e RNA que codificam o polipeptídeo de interesse. Mutações silenciosas na seqüência de codificação resultam da degeneração (isto é, redundância) do código genético, com o que mais de um códon pode codificar o mesmo resíduo de aminoácido. Então, por exemplo, leucina pode ser codificada por CTT, CTC, CTA, CTG, TTA ou TTG; serina pode ser codificada por TCT, TCC, TCA, TCG, AGT ou AGC; asparagina pode ser codificada por AAT ou

AAC; ácido aspártico pode ser codificado por GAT ou GAC; cisteína pode ser codificada por TGT ou TGC; alanina pode ser codificada por GCT, GCC, GCA ou GCG; glutamina pode ser codificada por CAA ou CAG; tirosina pode ser codificada por TAT ou TAC; e isoleucina pode ser codificada por ATT, ATC ou ATA. Tabelas mostrando o código genético padrão podem ser encontradas em várias fontes (por exemplo, L. Stryer, 1988, *Biochemistry*, 3ª Edição, W.H. 5 Freeman e Co., NY).

Um ácido nucléico codificando um polipeptídeo de Mtb pode ser clonado ou amplificado através de métodos *in vitro*, tal como a reação em cadeia de polimerase (PCR), a reação em cadeia da ligase (LCR), o sistema de amplificação baseado em transcrição (TAS), o sistema de replicação de seqüência auto-sustentado (3SR) e o sistema de amplificação da Qβ replicase (QB). Por exemplo, um polinucleotídeo codificando a proteína pode ser isolado através de reação em cadeia de polimerase de cDNA usando iniciadores com base na seqüência de DNA da molécula. Uma ampla variedade de metodologias de clonagem e amplificação *in vitro* é bem-conhecida da pessoa versada na técnica. Métodos de PCR são descritos na, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.683.195; Mullis e outros, Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* 51:263, 1987; e Erlich, ed., *PCR Technology* (Stockton Press, NY, 1989). Polinucleotídeos podem ser também isolados através de bibliotecas genômicas ou de cDNA com sondas selecionadas das seqüências do polinucleotídeo desejado sob condições de hibridização estringentes.

Os polinucleotídeos codificando um polipeptídeo de Mtb incluem um DNA recombinante que é incorporado em um vetor em um plasmídeo ou vírus autonomamente replicante ou no DNA genômico de um procarionte ou eucarionte, ou que exista como uma molécula separada (tal como um cDNA). Os nucleotídeos da invenção podem ser ribonucleosídeos, desoxirribunucleotídeos ou formas modificadas de qualquer nucleotídeo. O termo inclui formas simples ou duplas de DNA.

Em uma modalidade, vetores são usados para expressão em levedura tal como *S. cerevisiae* ou *Kluyveromyces lactis*. Vários promotores são conhecidos ser de utilidade em sistemas de expressão de levedura tal

como os promotores constitutivos da membrana de plasma H^+-ATPase (*PMA1*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GPD*), fosfoglicerato cinase-1 (*PGK1*), álcool desidrogenase-1 (*ADH*1) e bomba resistente a fármaco pleitrópica (*PDR5*). Ainda, promotores induzíveis podem ser de utilidade, tal como *GAL1-10* (induzido por galactose), *PHO5* (induzido por pouco fosfato inorgânico extracelular) e elementos HSE de choque térmico em tandem (induzidos por elevação da temperatura para 37º C). Promotores que direcionam expressão variável em resposta a indutor titulável incluem os promotores *MET3* e *MET25* responsivos à metionina e promotores *CUP1* dependentes de cobre. Qualquer um desses promotores pode ser clonado em plasmídeos de multicópia (2μ) ou cópia única (*CEN*) para dar um nível adicional de controle em nível de expressão. Os plasmídeos podem incluir marcadores nutricionais (tal como *URA3, ADE3, HIS1* e outros) para seleção em levedura e resistência a antibiótico (*AMP*) para propagação em bactérias. Plasmídeos para expressão de *K. lactis* são conhecidos, tal como pKLAC1. Então, em um exemplo, após amplificação em bactérias, plasmídeos podem ser introduzidos nos auxótrofos de levedura correspondentes através de métodos similares à transformação bacteriana.

Os polipeptídeos de Mtb podem ser expressos em uma variedade de cepas de levedura. Por exemplo, sete transportadores resistentes a fármaco pleiotrópicos, *YOR1, SNQ2, PDR5, YCF1, PDR10, PDR11* e *PDR15*, junto com seus fatores de transcrição de ativação, *PDR1* e *PDR3*, foram simultaneamente deletados em células hospediras de levedura, tornado a cepa resultante sensível a fármacos. Cepas de levedura com composição de lipídeo alterada da membrana do plasma, tal como o mutante *erg6* defeituoso em biossíntese de ergosterol, podem ser também utilizadas. Proteínas que são altamente sensíveis à proteólise podem ser expressas em uma levedura sem a endopeptidase vacuolar máster Pep4, que controla a ativação de outras hidrolases vacuolares. Expressão heteróloga em cepas carregando alelos de genes sensíveis à temperatura (*ts*) pode ser empregada se o mutante nulo correspondente for inviável.

Vetores virais podem ser também preparados codificando os

polipeptídeos de Mtb descritos aqui. Vários vetores virais foram construídos, incluindo polioma, SV40 (Madzak e outros, 1992, *J. Gen. Virol.*, 73:15331536), adenovírus (Berkner, 1992, *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:39-6; Berliner e outros, 1988, *Bio Techniques*, 6:616- 629; Gorziglia e outros, 1992, *J. Virol.,* 66:4407-4412; Quantin e outros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2581-2584; Rosenfeld e outros, 1992, *Cell*, 68:143-155; Wilkinson e outros, 1992, *Nucl. Acids Res.,* 20:2233-2239; Stratford-Perricaudet e outros, 1990, *Hum. Gene Ther.,* 1:241-256), vírus vaccínia (Mackett e outros, 1992, *Biotechnology,* 24:495-499), vírus adenoassociado (Muzyczka, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:91-123; On e outros, 1990, *Gene*, 89:279-282), herpes víruses including HSV e EBV (Margolskee, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:67-90; Johnson e outros, 1992, *J. Virol.*, 66:29522965; Fink e outros, 1992, *Hum. Gene Ther.* 3:11-19; Breakfield e outros, 1987, *Mol. Neurobiol.*, 1:337-371; Fresse e outros, 1990, *Biochem. Pharmacol.*, 40:2189-2199), Sindbis vírus (H. Herweijer e outros, 1995, *Human Gene Therapy* 6:1161-1167; Patente U.S. Nº 5.091.309 e Patente U.S. Nº 5.2217.879), alfavírus(S. Schlesinger, 1993, *Trends Biotechnol.* 11: 18-22; I. Frolov e outros, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 93:11371-11377) e retrovírus de ave (Brandyopadhyay e outros, 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4:749-754; Petropouplos e outros, 1992, *J. Virol.*, 66:3391-3397), murino (Miller, 1992, *Curr. Top. Microbiol Immunol.*, 158:1-24; Miller e outros, 1985, *Mol. Cell Biol.*, 5:431-437; Sorge e outros, 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4:1730-1737; Mann e outros, 1985, *J. Virol.*, 54:401-407) e origem humana (Page e outros, 1990, *J. Virol.*, 64:5370-5276; Buchschalcher e outros, 1992, *J. Virol.*, 66:2731-2739). Vetores de baculovírus (vírus de poliedrose multinuclear de Autographa californica; AcMNPV) também são conhecidos na técnica, e podem ser obtidos de fontes comerciais (tal como PharMingen, São Diego, Calif.; *Protein Sciences Corp.*, Meriden, Conn.; Stratagene, La Jolla, Calif.).

Vetores virais, tal como vetores poxvirais, que codificam um polipeptídeo de Mtb incluem pelo menos um elemento de controle de expressão operacionalmente ligado à seqüência de ácido nucléico codificando o polipeptídeo Mtb. Os elementos de controle de expressão são inseridos no

vetor viral para controlar e regular a expressão da seqüência de ácido nucléico. Exemplos de elementos de controle de expressão de utilidade nesses vetores incluem, mas não estão limitados a, sistema lac, regiões operadoras e promotoras de fago lambda, promotores de levedura e promotores derivados de polioma, adenovírus, retrovírus ou SV40. Elementos operacionais adicionais incluem, mas não estão limitados a, seqüência líder, códons de terminação, sinais de poliadenilação e quaisquer outras seqüências necessárias para a transcrição apropriada e tradução subseqüente das seqüências de ácido nucléico codificando o polipeptídeo de Mtb no sistema hospedeiro. O vetor de expressão pode conter elementos adicionais necessários para a transferência e subseqüente replicação do vetor de expressão contendo a seqüência de ácido nucléico no sistema hospedeiro. Exemplos de tais elementos incluem, mas não estão limitados a, origens de replicação e marcadores selecionáveis. Será ainda compreendido por um versado na técnica que tais vetores são facilmente construídos usando métodos convencionais (Ausubel e outros (1987) e "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Nova York, N.Y.) e estão comercialmente disponíveis.

Seqüências de DNA codificando um polipeptídeo de Mtb podem ser expressas *in vitro* através de transferência de DNA para uma célula hospedeira adequada. A célula pode ser procariótica ou eucariótica. O termo também inclui qualquer progênie da célula hospedeira objeto. É compreendido que toda a progênie pode não ser idêntica à célula de origem uma vez que pode haver mutações que acontecem durante replicação. Métodos de transferência estável, significando que o DNA estrangeiro é continuamente mantido no hospedeiro, são conhecidos na técnica.

Conforme acima mencionado, uma seqüência de polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de Mtb pode ser operativamente ligada a seqüências de controle de expressão. Uma seqüência de controle de expressão operativamente ligada a uma seqüência de codificação é ligada de modo que expressão da seqüência de codificação é conseguida sob condições compatíveis com as seqüências de controle de expressão. As seqüências de controle de expressão incluem, mas não estão limitadas a, promotores, au-

mentadores, terminadores de transcrição, um códon curto (isto é, ATG) em frente a um gene de codificação de proteína, sinal de união para introns, manutenção da estrutura de leitura correta daquele gene para permitir tradução apropriada de mRNA e códons de parada.

Células hospedeiras podem incluir células hospediras microbianas, de levedura, inseto e mamífero. Métodos de expressão de seqüências de DNA tendo seqüências eucarióticas ou virais em procariontes são bem-conhecidos na técnica. Exemplos não-limitantes de células hospediras adequadas incluem células de bactérias, archea, inseto, fungos (por exemplo, levedura), micobactéria (tal como *M. smegmatis*), planta e células animais (por exemplo, células de mamífero, tal como humano). Células exemplares de uso incluem *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Salmonella typhimurium*, células SF9, células C129, células 293, Neurospora, e cepas de células mielóide e linfóide de mamífero imortalizadas. Técnicas para a propagação de células de mamífero em cultura são bem-conhecidas (vide Jakoby e Pastan (Eds.), 1979, *Cell Culture. Methods in Enzymology*, volume 58, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, N.Y.). Exemplos de cepas de célula hospedeira de mamífero geralmente usadas são células VERO e HeLa, células CHO, e WI38, BHK, e cepas de célula COS, embora cepas de célula possam ser usadas, tal como células planejadas para prover padrões de glicosilação desejáveis maiores, ou outras características. Conforme acima discutido, técnicas para a transformação de células de levedura, tal como transformação de polietileno glicol, transformação de protoplasto e as pistolas de gene são também conhecidas na técnica (vide Gietz e Woods, *Methods in Enzymology* 350:87-96, 2002).

Transformação de uma célula hospedeira com DNA recombinante pode ser realizada através de técnicas convencionais como são bem-conhecidas daqueles versados na técnica. Onde o hospedeiro for procariótico, tal como, mas não limitado a, *E. coli*, células competentes que são capazes de absorção de DNA podem ser preparadas a partir de células coletadas após fase de crescimento exponencial e subseqüentemente tratadas através do método de $CaCl_2$ usando procedimentos bem-conhecidos na técnica. Al-

ternativamente, $MgCl_2$ ou RbCl pode ser usado. Transformação pode ser também realizada após formação de um protoplasto da célula hospedeira se desejado, ou através de eletroporação.

Quando o hospedeiro é um eucarionte, tais métodos de transfecção de DNA como co-precipitados de fosfato de cálcio, procedimentos mecânicos convencionais tal como microinjeção, eletroporação, inserção ou plasmídeo envolvido em lipossomas, ou vetores virais podem ser usados. Células eucarióticas podem também ser co-transformadas com seqüências de polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de Mtb, e uma segunda molécula de DNA estrangeiro codificando um fenótipo selecionável, tal como gene timidina cinase de herpes simplex. Outro método é usar um vetor viral eucariótico, tal como vírus símio 40 (SV40) ou vírus papiloma bovino, para transientemente infectar ou transformar células eucarióticas e expressar a proteína (vide, por exemplo, *Eukaryotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).

Método para Detecção de uma Infecção com *Mtb: Detecção de Células T*

Métodos para detecção de uma infecção com *Mycobacterium* em um indivíduo são descritos aqui. Em várias modalidades, uma infecção com *Mycobacterium* pode ser detectada com base na presença de células T em uma amostra biológica, onde as células T especificamente reagem com um polipeptídeo de Mtb descrito aqui (vide acima).

Em várias modalidades, uma amostra biológica compreendendo células T é obtida de um indivíduo de interesse. Amostras biológicas adequadas incluem, mas não estão limitadas a, amostras de sangue, células mononucleares de sangue periférico, esputo, saliva, fluido do cordão espinhal ou amostras de célula T isoladas (tal como células T $CD8^+$ e/ou células $CD4^+$), tecido de nó linfático, tecido pulmonar ou outra amostra de tecido. Em um exemplo, a amostra é incubada com um polipeptídeo de *Mycobacterium*, conforme aqui descrito, um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de Mtb e uma APC que expressa o polipeptídeo de Mtb ou um fragmento dele que se liga a MHC. A presença ou ausência de ativação específica das células T é detectada.

As células T $CD8^+$ e/ou células T $CD4^+$ que reconhecem o peptídeo no método de detecção foram geralmente pré-sensibilizadas *in vivo* para o polipeptídeo de Mtb de interesse. Em várias modalidades, essas células T experientes em peptídeo estão geralmente presentes no sangue periférico de um hospedeiro que foi exposto ao antígeno em uma freqüência de 1 a 10^6 a 1 em 10^3 células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

Em um exemplo, a amostra são células T isoladas. Por exemplo, células T podem ser isoladas de um indivíduo de interesse através de técnicas de rotina (tal como através de centrifugação de gradiente de densidade Ficoll/Hypaque de linfócitos de sangue periférico ou através de seleção de célula ativada por fluorescência). Em uma modalidade, as células T usadas no ensaio estão na forma de amostras não-processadas ou diluídas, ou são células T recém-isoladas (tal como na forma de células mononucleares recém-isoladas (MCs) ou células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) que são usadas diretamente *ex vivo*, de modo que elas não são culturadas antes de serem usadas no método. No entanto, as células T podem ser culturadas antes do uso, por exemplo, na presença de um ou mais dos peptídeos, e geralmente também citocinas de promoção de crescimento exógenas. Durante cultura os peptídeos são tipicamente apresentados na superfície de células tal como APCs. Pré-cultura das células T pode levar a um aumento na sensibilidade do método. Então, as células T podem ser convertidas em cepas celulares, tal como cepas de célula de curto prazo.

Em várias modalidades, as células T são incubadas *in vitro* por dois a nove dias, tal como cerca de quatro dias, a 37º C com um polipeptídeo de Mtb ou fragmento dele que liga MHC. Em vários exemplos, o polipeptídeo de Mtb ou fragmento dele que liga MHC está incluído (em uma concentração de, por exemplo, cerca de 5 a cerca de 25 μg/ml, tal como cerca de 5, cerca de 10, cerca de 15 ou cerca de 20 μg/ml). Em vários exemplos, outra alíquota de uma amostra de célula T pode ser incubada na ausência do polipeptídeo de Mtb como um controle.

Em uma modalidade, células mononucleares (MCs) são separadas da amostra. As MCs incluem as células T e células apresentando antí-

geno (APCs). Então no método as APCs presentes nas MCs separadas podem apresentar o peptídeo às células T. Em outra modalidade apenas células T, tal como apenas células T $CD8^+$, apenas células T $CD4^+$ ou apenas células T $CD3^+$, podem ser purificadas da amostra.

A APC usada no método pode ser qualquer célula que tenha moléculas do MHC Classe I em sua superfície. Ela pode ou não ser uma célula apresentando antígeno especializada, tal como uma célula B, célula dendrítica ou macrófago. A APC usada no método pode ser do mesmo hospedeiro que a célula T. Em geral, a APC é capaz de apresentar o peptídeo a uma célula T. A APC pode ser uma célula *ex vivo* recém-isolada ou uma célula culturada tal como a célula de uma cepa de célula.

Células T derivadas de uma amostra do indivíduo de interesse podem ser postas em um ensaio com todos os polipeptídeos de Mtb (ou um grupo dos polipeptídeos de Mtb, ou um polipeptídeo de Mtb específico) que é pretendido testar o painel relevante ou as células T podem ser divididas e postas em ensaios separados cada um dos quais contém um ou mais dos peptídeos. Em uma modalidade, um ou mais dos polipeptídeos com uma seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NOs: 1-12, ou um fragmento de um ou mais desses polipeptídeos que ligam MHC, são utilizados. Dois ou mais de qualquer um dos peptídeos de Mtb descritos aqui podem ser usados para uso simultâneo,separado ou seqüencial de células T que reconhecem esses polipeptídeos. Combinações adicionais de qualquer um dos polipeptídeos de MTb descritas aqui podem ser utilizadas.

Em uma modalidade o um ou mais polipeptídeo(s) é(são) provido(s) a células apresentando na ausência da célula T. Esta célula é então provida a células T isoladas do indivíduo, tipicamente após serem deixadas apresentar o peptídeo em sua superfície.

A duração que o peptídeo é contatado com as células vai variar dependendo do método usado para determinação do reconhecimento do peptídeo. Tipicamente 10^5 a 10^7, tal como 5 x 10^5 a 10^6 PBMCs são adicionadas a cada ensaio. No caso onde peptídeo é adicionado diretamente ao ensaio sua concentração é tipicamente de a partir de 10-1 a 103 µg/ml, tal

como cerca de 0,5 a cerca de 50 μg/ml ou cerca de 1 a cerca de 10 μg/ml. A duração de tempo pela qual as células T são incubadas com o peptídeo pode ser de a partir de cerca de 4 a cerca de 24 horas, tal como de a partir de cerca de 6 a cerca de 16 horas, ou por cerca de 12 horas.

A determinação do reconhecimento específico do peptídeo pelas células T pode ser feita medindo a ligação do peptídeo às células T. Tipicamente células T que ligam o peptídeo podem ser selecionadas com base nesta ligação, por exemplo, usando uma técnica de seleção de célula ativada por fluorescência (FACS). A detecção da presença de células T que reconhecem o peptídeo será considerada ocorrer se a freqüência de células selecionadas usando o peptídeo for acima de um valor controle.

Determinação de se as células T reconhecem o peptídeo pode ser também feita através da detecção de uma mudança no estado das células T na presença do peptídeo ou determinação de se as células T ligam o peptídeo. A mudança em estado é geralmente causada por atividade funcional específica de antígeno da célula T após o receptor de célula T ligar o peptídeo. Em geral quando ligando o receptor de célula T o peptídeo é ligado a uma molécula do MHC classe I, que pode estar presente na superfície de uma PBMC ou uma célula apresentando antígeno (APC).

A ativação de célula T pode ser detectada através de quaisquer meios conhecidos de um versado na técnica. Em um exemplo, ativação de célula T $CD8^+$ é detectada através da varredura da atividade citolítica. Em outro exemplo, ativação de célula T $CD8^+$ e/ou ativação de célula T $CD4^+$ é detectada através de proliferação. Em vários exemplos, um nível de proliferação que é pelo menos duas vezes maior e/ou um nível de atividade citolítica que é pelo menos 20% maior do que em indivíduos não-infectados indica a presença de uma infecção com *Mycobacterium* no indivíduo de interesse.

A mudança em estado da célula T pode ser o início de ou aumento em secreção de uma substância da célula T, tal como uma citocina, tal como interferon (IFN)-γ, IL-2 ou TNF-α. Em um exemplo, a substância pode ser detectada permitindo que ela se ligue a um agente de ligação específico e então medição da presença do complexo agente de ligação espe-

cífico/substância. O agente de ligação específico é tipicamente um anticorpo, tal como anticorpos policlonais ou monoclonais que ligam a substância, tal como a citocina. Anticorpos para citocinas estão comercialmente disponíveis, ou podem ser feitos usando técnicas padrão.

Tipicamente o agente de ligação específico tal como o anticorpo é imobilizado em um apoio sólido. Após a citocina ser deixada ligar o apoio sólido pode opcionalmente ser lavado para remover material que não está especificamente ligado ao anticorpo. O complexo anticorpo/citocina pode ser detectado usando um segundo agente de ligação que ligará o complexo, tal como um anticorpo que é marcado (ou diretamente ou indiretamente) com um marcador. Geralmente, o segundo agente liga a substância em um sítio que é diferente do sítio que liga o primeiro agente.

Em vários exemplos, o segundo agente de ligação pode ser detectado por um terceiro agente que é marcado diretamente ou indiretamente por um marcador detectável. Por exemplo, o segundo agente pode incluir uma biotina, permitindo detecção de um terceiro agente que compreende uma estreptavidina e um marcador, tal como um marcador enzimático, radioativo ou fluorescente.

Em uma modalidade o sistema de detecção é um ensaio ELISPOT, tal como um ensaio descrito na publicação PCT Nº WO 98/23960, incorporada aqui a título de referência. Em um exemplo, IFN-γ secretado da célula T é ligado por um primeiro anticorpo específico de IFN-γ que é imobilizado em um apoio sólido. O IFN-γ ligado é então detectado usando um segundo anticorpo específico de IFN-γ que é marcado com um marcador detectável. Anticorpos marcados exemplares estão comercialmente disponíveis, tal como da MABTECH® (Estocolmo, Suécia). Um ensaio ELISPOT exemplar é descrito na seção de Exemplos abaixo.

A mudança em estado da célula T que pode ser também medida pode ser o aumento na absorção de substâncias pela célula T, tal como a absorção de timidina. A mudança em estado pode ser também medida por um aumento no tamanho das células T, ou proliferação das células T, ou uma mudança nos marcadores de superfície celular na célula T.

Reagentes são providos aqui para a detecção de células expressando CD8($CD8^+$) que especificamente ligam um polipeptídeo de Mtb conforme aqui descrito. Esses reagentes são complexos I do MHC Classe/polipeptídeo de TARP imunogênico tetraméricos. Esses complexos tetraméricos incluem um polipeptídeo de Mtb, tal como um polipeptídeo de nove a vinte aminoácidos de comprimento que especificamente liga MHC classe I.

Complexos de MHC Classe I/peptídeo tetraméricos podem ser sintetizados usando métodos bem-conhecidos na técnica (Altmann e outros, *Science* 274:94, 1996, que é aqui incorporado a título de referência). Em um exemplo não-limitante específico, polipeptídeo de cadeia pesada HLA purificado e β2-microglobulina (β2m) podem ser sintetizados por meio de um sistema de expressão procariótico. Um exemplo não-limitante, específico, de um sistema de expressão de utilidadeé o sistema pET (R&D Systems, Mineapolis, MN). A cadeia pesada é modificada através de deleção da transmembrana e filamento citosólico e adição de terminal COOH de uma seqüência contendo o sítio de biotinilação enzimático de biotina proteína ligase (Bir-A). Cadeia pesada, β2m, e peptídeo são então redobrados. O produto redobrado pode ser isolado através de quaisquer meios conhecidos na técnica, e então biotinilados por Bir-A. Um tetrâmero é então produzido através de contato do produto biotinilado com estreptavidina.

Em uma modalidade, a estreptavidina é marcada. Marcadores adequados incluem, mas não estão limitados a, enzimas, contas magnéticas, contas magnéticas coloidais, haptenos, fluorcromos, compostos de metal, compostos radioativos ou fármacos. As enzimas que podem ser conjugadas à estreptavidina incluem, mas não estão limitadas a, fosfatase alcalina, peroxidase, urease e β-galactosidase. Os fluorcromos que pode ser conjugados à estreptavidina incluem, mas não estão limitados a, fluoresceína isotiocianato, tetrametilrodamina isotiocianato, ficoeritrina, aloficocianinas e Texas Red. Para fluorcromos adicionais que podem ser conjugados à estreptavidina, vide Haugland, R.P. *Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1992-1994). Os compostos de metal

que podem ser conjugados à estreptavidina incluem, mas não estão limitados a, ferritina, ouro coloidal, e, particularmente, contas superparamagnéticas coloidais. Os haptenos que podem ser conjugados à estreptavidina incluem, mas não estão limitados a, biotina, digoxigenina, oxazalona e nitrofenol. Os compostos radioativos que podem ser conjugados à estreptavidina são conhecidos na técnica, e incluem, mas não estão limitados a, tecnécio 99m (^{99}Tc), ^{125}I e aminoácidos compreendendo quaisquer radionuclídeos, incluindo, mas não limitado a, ^{14}C, ^{3}H e ^{35}S. Em geral, estreptavidina marcada com um fluorcromo é utilizada nos métodos descritos aqui.

Em uma modalidade suspensão de células incluindo células T que especificamente reconhecem um polipeptídeo de Mtb é produzida, e as células são reagidas com o tetrâmero em suspensão. Em uma modalidade, esses reagentes são usados para marcar células, que são então analisadas através de seleção de célula ativada por fluorescência (FACS). Uma máquina para FACS emprega uma pluralidade de canais de cor, canais de detecção de pouco ângulo e espalhamento de luz obtuso, e canais de impedância, dentre outros níveis de detecção mais sofisticados, para separar ou selecionar células. Qualquer técnica FACS pode ser empregada contanto que ela não seja prejudicial para a detecção das células desejadas. (Quanto a métodos exemplares de FACS vide Patente U.S. Nº 5.061.620, incorporada aqui a título de referência).

Método para Detecção de Infecção com *Mtb: Testes de Pele*

Em outro aspecto, a presente invenção provê métodos para uso de um ou mais dos polipeptídeos descritos acima para diagnosticar infecção com *Mycobacterium,* e em particular tuberculose, usando um teste de pele. Um "teste de pele" é um ensaio realizado diretamente em um paciente onde uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada (DTH) (tal como enrijecimento, inchaço, vermelhidão ou dermatite) é medida seguindo administração à pele, tal como a injeção intradermal de um ou mais polipeptídeos descritos acima. Tal injeção pode ser feita usando qualquer dispositivo adequado suficiente para contatar o polipeptídeo ou polipeptídeos com células dermais do paciente, tal como uma seringa tuberculina ou seringa de 1 ml. Em

vários exemplos, a reação é medida pelo menos 48 horas após injeção, tal como entre cerca de 48 e cerca de 72 horas após injeção.

Uma reação DTH é uma resposta imune mediada por célula que é maior em indivíduos que foram expostos previamente ao antígeno de teste (o polipeptídeo de Mtb, seu fragmento que liga MHC ou sua proteína de fusão). A resposta pode ser medida visualmente, tal como usando uma régua. Em vários exemplos, uma resposta que é maior do que cerca de 0,5 cm de diâmetro, tal como maior do que cerca de 1,0 de diâmetro, é uma resposta positiva, e é indicativa de infecção com *Mycobacterium.*

Os polipeptídeos de Mtb descritos aqui podem ser formulados para uso em um teste de pele como composições farmacêuticas contendo um polipeptídeo e um veículo fisiologicamente aceitável. Essas composições tipicamente contêm um ou mais dos polipeptídeos de Mtb descritos (ou um fragmento dele que liga MHC ou uma proteína de fusão dele) em uma quantidade variando de a partir de cerca de 1 μg a cerca de 100 μg, tal como de a partir de cerca de 10 μg a cerca de 50 μg em um volume de 0,1 ml. O veículo empregado em uma composição farmacêutica pode ser uma solução salina com preservativos apropriados, tal como fenol e/ou TWEEN80®.

Geralmente, o polipeptídeo empregado em um teste de pele é de tamanho suficiente de modo que ele permanece no sítio de injeção por toda a duração do período de reação. Em vários exemplos, um polipeptídeo que é pelo menos de nove aminoácidos de comprimento é suficiente. Sem ser limitado pela teoria, o polipeptídeo é quebrado por macrófagos dentro de horas de injeção para permitir apresentação a células T. Tais polipeptídeos podem conter repetições de uma ou mais das seqüências acima descritas e/ou outras seqüências imunogênicas ou não-imunogênicas.

Então, a determinação do reconhecimento do peptídeo pelas células T pode ser medida *in vivo.* Em vários exemplos, o peptídeo é administrado ao indivíduo e então uma resposta que indica reconhecimento do peptídeo pode ser medida. Em uma modalidade o peptídeo é administrado intradermalmente, tipicamente de uma maneira similar ao teste Mantoux. O peptídeo pode ser administrado epidermalmente. O peptídeo é tipicamente

administrado através de agulha, tal como através de injeção, mas pode ser administrado através de outros métodos tal como balística, por exemplo, as técnicas de balística que têm sido usadas para aplicar ácidos nucléicos. O pedido EPC Publicado Nº EP-A-0693119 descreve técnicas que podem tipicamente ser usadas para administrar o peptídeo. Em vários exemplos, de a partir de 0,001 a 1000 µg, por exemplo, de a partir de 0,01 a 100 µg ou 0,1 a 10 µg de peptídeo são administrados. Alternativamente um agente pode ser administrado que é capaz de prover o peptídeo *in vivo*. Então um polinucleotídeo capaz de expressar o polipeptídeo pode ser administrado. O polinucleotídeo tipicamente tem qualquer uma das características do polinucleotídeo que é discutido abaixo. Polipeptídeo é expresso do polinucleotídeo *in vivo* e reconhecimento do peptídeo *in vivo* pode ser medido. Tipicamente de a partir de 0,001 a 1000 µg, por exemplo, de a partir de 0,01 a 100 µg a 10 µg de polinucleotídeo são administrados.

Método para Detecção de uma Infecção com Mtb: Detecção de Anticorpos

São aqui descritos métodos onde os polipeptídeos descritos acima são usados para diagnosticar infecção com *Mycobacterium*, e, em particular, tuberculose. Nessas modalidades, são providos métodos para detecção de infecção com *Mycobacterium* em uma amostra biológica, usando um ou mais dos polipeptídeos acima, sozinhos ou em combinação. Em várias modalidades polipeptídeos múltiplos são empregados. O(s) polipeptídeo(s) é(são) usado(s) em um ensaio para determinar a presença ou ausência de anticorpos para o(s) polipeptídeo(s) em uma amostra biológica (tal como, mas não limitado a, sangue integral, esputo, soro, plasma, saliva ou fluido cerebroespinhal) com relação a um controle. A presença de tais anticorpos índica sensibilização prévia a antígenos micobacterianos que pode ser indicativo de infecção Micobacteriana, e em particular tuberculose.

Em uma modalidade onde mais de um polipeptídeo é empregado, os polipeptídeos podem ser complementares, de modo que um polipeptídeo componente vai detectar infecção em amostras onde a infecção não seria detectada por outro polipeptídeo componente). Polipeptídeos complementares podem ser geralmente identificados usando cada polipeptídeo in-

dividualmente para avaliar amostras de soro obtidas de uma série de pacientes conhecidos estar infectados com *Mycobacterium*. Após determinação de quais amostras são corretamente identificadas como positivo com cada polipeptídeo, combinações de dois ou mais polipeptídeos podem ser formuladas que são capazes de detectar infecção na maioria, ou todas, as amostras testadas. Polipeptídeos complementares são de utilidade para melhorar sensibilidade de um teste de diagnóstico. Então, mais de um dos polipeptídeos de Mtb acima descritos pode ser incluído em um ensaio. Polipeptídeos adicionais de Mtb (aqueles não descritos aqui) opcionalmente podem ser incluídos no ensaio.

Existe uma variedade de formatos de ensaio que podem ser usados para detectar anticorpos em uma amostra (vide, por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), que é incorporado aqui a título de referência). Em geral, a presença ou ausência de uma infecção com Mtb em um paciente pode ser determinada por (a) contato de uma amostra biológica obtida de um paciente com um ou mais polipeptídeos de Mtb; (b) detecção na amostra da presença (ou ausência) de um anticorpo que se liga ao(s) polipeptídeo(s); e (c) comparação do nível de anticorpo com um controle. O controle pode ser um valor padrão, tal como um valor de corte predeterminado. O controle pode ser a quantidade de anticorpos em um indivíduo conhecido estar infectado com Mtb, ou a quantidade de anticorpos que especificamente liga o(s) polipeptídeo(s) em um individuo conhecido estar infectado com Mtb.

Em várias modalidades, o ensaio envolve o uso de um polipeptídeo imobilizado em um apoio sólido. Anticorpos que especificamente ligam o(s) polipeptídeo(s) de interesse se ligam ao apoio sólido. O anticorpo ligado pode ser então detectado usando um reagente de detecção que inclui um marcador detectável. Reagentes de detecção adequados incluem anticorpo marcados que se ligam ao complexo anticorpo/polipeptídeo. Reagentes de detecção adequados também incluem segundos anticorpos não-marcados que se ligam ao complexo anticorpo peptídeo e um terceiro anticorpo que liga especificamente o segundo anticorpo. Reagentes de detecção adequa-

dos também incluem polipeptídeo não-ligado marcado com um grupo repórter (tal como em um ensaio semicompetitivo).

Alternativamente, um ensaio competitivo pode ser utilizado, onde um anticorpo que se liga ao polipeptídeo de interesse é marcado com um grupo repórter é incubado com a amostra. Seguindo incubação, o anticorpo é então deixado se ligar ao antígeno imobilizado após incubação do antígeno com a amostra. O ponto até o qual os componentes da amostra inibem a ligação do anticorpo marcado ao polipeptídeo imobilizado é indicativo da reatividade da amostra com o polipeptídeo imobilizado.

Um apoio sólido usado em um ensaio descrito aqui pode ser qualquer material sólido ao qual o antígeno pode ser ligado. Por exemplo, o apoio sólido pode ser uma cavidade de teste em uma placa de microtitulação ou uma membrana de nitrocelulose ou outra adequada. Alternativamente, o apoio sólido pode ser uma conta ou disco, tal como um vidro, fibra de vidro, látex ou um material plástico tal como um poliestireno ou cloreto de polivinila. O apoio pode ser também uma partícula magnética ou um sensor óptico de fibra, tal como aqueles descritos, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.359.681.

Os polipeptídeos podem ser ligados ao apoio sólido usando uma variedade de técnicas. A ligação dos polipeptídeos pode ser realizada através de uma associação não-covalente, tal como adsorção, ou ligação covalente, tal como uma ligação direta entre o antígeno e grupos funcionais no apoio ou uma ligação através de um agente de reticulação.

Para ligação através de adsorção, ligação pode ser conseguida através de contato de um ou mais polipeptídeo(s) de Mtb (geralmente em um tampão) com o apoio sólido por uma quantidade de tempo adequada. O tempo de contato para ligação é tipicamente entre cerca de 1 hora e 1 dia. Em geral, ligação é conseguida através de contato de um apoio sólido de poliestireno ou cloreto de polivinila com uma quantidade de um ou mais polipeptídeo(s) de Mtb variando de a partir de cerca de 10 mg a cerca de 1 μg, tal como cerca de 100 ng de antígeno.

Ligação covalente dos polipeptídeo(s) de Mtb de interesse a um

apoio sólido pode ser geralmente conseguida reagindo o apoio com um reagente bifuncional que reage com ambos o apoio e um grupo funcional, tal como um grupo hidroxila ou amino, no polipeptídeo. Por exemplo, um polipeptídeo de Mtb pode ser ligado a apoios tendo um revestimento de polímero apropriado usando benzoquinona ou através de condensação de um grupo aldeído no apoio com uma amina e um hidrogênio ativo no polipeptídeo (Pierce *Immunotechnology Catalog and Handbook*, em A12 A13, 1991).

Em certas modalidades, o ensaio é um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Este ensaio pode ser realizado primeiro contatando um antígeno de polipeptídeo que foi imobilizado em um apoio sólido (tal como na cavidade de uma placa de microtitulação) com a amostra de uma maneira de modo que os anticorpos presentes dentro da amostra que especificamente liga o polipeptídeo de interesse ligam o polipeptídeo imobilizado. Amostra não-ligada é então removida e um reagente de detecção capaz de ligação ao complexo anticorpo-polipeptídeo imobilizado é adicionado. A quantidade de reagente de detecção que permanece ligada é determinada usando um método apropriado para o reagente de detecção específico. Por exemplo, o método de detecção pode detectar fluorescência ou a presença de uma atividade enzimática.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo é imobilizado no apoio; quaisquer sítios de ligação de proteína restantes no apoio são tipicamente bloqueados. Qualquer agente de bloqueio adequado pode ser usado para bloquear os sítios de ligação de proteína não-ligada, de modo que albumina de soro bovino ou TWEEN 20® pode ser empregado. O polipeptídeo imobilizado é então incubado com a amostra, e o anticorpo é deixado se ligar ao antígeno. A amostra pode ser diluída com um diluente adequado, por exemplo, um tampão tal como solução salina tamponada com fosfato (PBS) antes da incubação. Em geral, um tempo de contato apropriado (tempo de incubação) é um período de tempo que é suficiente para detectar a presença de anticorpo em uma amostra infectada por *Mycobacterium*. Em um exemplo não-limitante, específico, o tempo de contato é suficiente para atingir um nível de ligação que é pelo menos 95% daquele atingido em equilíbrio entre

anticorpo ligado e não-ligado. O tempo necessário para atingir equilíbrio pode ser determinado ensaiando o nível de ligação que acontece durante um período de tempo. Em temperatura ambiente, um tempo de incubação de cerca de 30 minutos é geralmente suficiente.

Amostra não-ligada pode ser então removida através de lavagem do apoio sólido com um tampão apropriado, tal como PBS contendo TWEEN 20® a 0,1%. Um reagente de detecção pode ser então adicionado ao apoio sólido. Um reagente de detecção pode ser qualquer composto que se ligue ao complexo anticorpo imobilizado-polipeptídeo e possa ser detectado. Em várias modalidades, o reagente de detecção contém um agente de ligação (tal como, por exemplo, Proteína A, Proteína G, imunoglobulina, lectina ou antígeno livre) conjugado a um marcador. Marcadores de utilidade incluem enzimas (tal como peroxidase de rábano silvestre), substratos, cofatores, inibidores, corantes, radionuclídeos, grupos luminescentes, grupos fluorescentes e biotina. A conjugação de um agente de ligação a um marcador pode ser conseguida usando métodos conhecidos na técnica; agentes de ligação conjugados são também comercialmente disponíveis (tal como da Zymed Laboratories, São Francisco, Calif. e Pierce, Rockford, Ill.).

O reagente de detecção é incubado com o complexo de anticorpo imobilizado-polipeptídeo por uma quantidade de tempo suficiente para detectar o anticorpo ligado. Uma quantidade apropriada de tempo pode geralmente ser determinada a partir das instruções do fabricante ou avaliando o nível de ligação que acontece durante um período de tempo. Reagente de detecção não-ligado é então removido e reagente de detecção ligado é detectado usando o marcador. Para marcadores radioativos, métodos de contagem por cintilação ou autorradiográficos podem ser usados para detecção. Métodos espectroscópicos podem ser usados para detectar corantes, grupos luminescentes e grupos fluorescentes usados como marcadores. Biotina pode ser detectada usando uma avidina acoplada a um marcador diferente, tal como um marcador radioativo, marcador fluorescente ou um marcador enzimático. Marcadores enzimáticos podem ser detectados através da adição de substrato (geralmente por um período de tempo específico), seguido por a-

nálise espectroscópica ou outra dos produtos de reação.

Para determinar a presença ou ausência de anticorpos anti-Micobacterianos na amostra, o sinal detectado do marcador que se liga ao apoio sólido é geralmente comparado com um controle. Em uma modalidade, o controle é um valor padrão, tal como o sinal médio obtido quando o antígeno imobilizado é incubado com amostras de um paciente não-infectado. Em geral, uma amostra gerando um sinal que está dois ou três desvios padrão acima do controle é considerada positiva para infecção com *Mycobacterium*. Em outra modalidade, o valor controle é determinado usando uma *Receiver Operator Curve*, de acordo com o método de Sackett e outros, *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine,* Little Brown and Co., pp. 106-107 (1985). Resumidamente, nesta modalidade, o valor controle é determinado a partir de um gráfico de pares de taxas de verdadeiro positivo (sensibilidade) e taxas de falso positivo (100% de especificidade) que correspondem a cada valor controle possível para o resultado de teste de diagnóstico. O valor controle no gráfico que inclui a área maior é o valor de corte mais preciso, e uma amostra gerando um sinal que é maior do que o valor de corte determinado através deste método é considerado positivo. Alternativamente, o valor de corte pode ser mudado para minimizar a taxa de falso positivo, ou para minimizar a taxa de falso negativo. Em geral, uma amostra gerando um sinal que é maior do que o valor de corte determinado através deste método é considerada positiva para tuberculose.

Em uma modalidade relacionada, o ensaio é realizado em um rápido escoamento ou em formato de teste de tiras ("*strip test*"), onde o antígeno é imobilizado em uma membrana, tal como, mas não limitado a, nitrocelulose. Em um teste rápido por imunoconcentração, anticorpos dentro da amostra se ligam ao polipeptídeo imobilizado conforme a amostra passa pela membrana. Um reagente de detecção (por exemplo, proteína A-ouro coloidal) se liga ao complexo anticorpo-peptídeo conforme a solução contendo o reagente de detecção flui através da membrana. A detecção de reagente de detecção ligado pode ser realizada conforme acima descrito.

Em um exemplo do formato de teste de tira, uma extremidade da

membrana à qual o polipeptídeo é ligado é imersa em uma solução contendo a amostra. A amostra migra ao longo da membrana através de uma região contendo o reagente de detecção e para a área de polipeptídeo imobilizado. A concentração do reagente de detecção no polipeptídeo indica a presença de anticorpos anti-*Mycobacterium* na amostra. Tipicamente, a concentração de reagente de detecção neste estágio gera um padrão, tal como uma linha, que pode ser visualmente lido. A ausência de tal padrão indica um resultado negativo. Em geral, a quantidade de polipeptídeo imobilizado na membrana é selecionada para gerar um padrão visualmente discernível quando a amostra biológica contém um nível de anticorpos que seria suficiente para gerar um sinal positivo em um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Em várias modalidades, a quantidade de polipeptídeo imobilizado na membrana varia de a partir de cerca de 25 ng a cerca de 1 μg, tal como de a partir de cerca de 50 ng a cerca de 500 ng. Tais testes podem tipicamente ser realizados com um volume muito pequeno de soro ou sangue do paciente.

Método para Detecção de uma Infecção com *Mtb: Detecção de Polinucleotídeos*

Reagentes de diagnóstico incluem o uso de seqüências de polinucleotídeo codificando um ou mais dos polipeptídeos de Mtb acima descritos. Infecção com *Mycobacterium* pode ser detectada através da detecção da presença, ausência ou nível de mRNA codificando um polipeptídeo de *Mycobacterium* em uma amostra biológica. Em vários exemplos, ensaios de hibridização são utilizados, tal como ensaios *Northern blot* ou *dot blot*. Em exemplos adicionais, ensaios baseados em PCR são utilizados.

Métodos gerais para extração de mRNA são bem-conhecidos na técnica e são descritos em livros padrão de biologia molecular, incluindo Ausubel e outros, *Current Protocols of Molecular Biology,* John Wiley and Sons (1997). Métodos para extração de RNA de tecidos embebidos em parafina são descritos, por exemplo, em Rupp e Locker, *Lab Invest.* 56:A67 (1987) e De Andres e outros, *BioTechniques* 18:42044 (1995). Em particular, isolamento de RNA pode ser realizado usando estojo de purificação, conjunto de

tampão e protease de fabricantes comerciais, tal como QIAGEN®, de acordo com as instruções do fabricante. Por exemplo, RNA total de células em cultura (tal como aquelas obtidas de um indivíduo) pode ser isolado usando minicolunas QIAGEN® RNeasy. Outros estojos de isolamento de RNA comercialmente disponíveis incluem MASTERPURE®. Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE® Madison, Wis.) e Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.). RNA total de amostras de tecido pode ser isolado usando RNA Stat-60 (Tel-Test). RNA preparado uma amostra biológica pode ser isolado, por exemplo, através de centrifugação de gradiente de densidade de cloreto de césio.

Métodos para quantificação de mRNA são bem-conhecidos na técnica. Em um exemplo, o método utiliza reação em cadeia de polimerase de transcriptase reversa (RT-PCR). Geralmente, a primeira etapa em traçado de perfil de expressão de gene através de RT-PCR é a transcrição reversa do molde de RNA em cDNA, seguido por sua amplificação exponencial em uma reação PCR. As duas transcriptases reversas mais comumente usadas são transcriptase reversa do vírus de mieloblastose de ave (AMV-RT) e transcriptase reversa do vírus da leucemia de murino Moloney (MMLV-RT). A etapa de transcrição reversa é tipicamente iniciada usando *iniciadores* específicos, hexâmeros aleatórios ou *iniciadores* oligo-dT, dependendo das circunstâncias e do objetivo de traçado de perfil. Por exemplo, RNA extraído pode ser transcrito reverso usando um GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer, Calif., USA), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA derivado pode ser então usado como um molde na reação PCR subseqüente.

Embora a etapa de PCR possa usar uma variedade de polimerases de DNA dependentes de DNA termoestável, ela tipicamente emprega a Taq DNA polimerase, que tem uma atividade de 5'-3' nuclease mas não tem uma atividade de 3'-5' endonuclease revisora. Então, TaqMan® PCR tipicamente utiliza a atividade de 5'-nuclease de Taq ou Tth polimerase para hidrolisar uma sonda de hibridização ligada a seu amplicon alvo, mas qualquer enzima com atividade de 5' nuclease equivalente pode ser usada. Dois *iniciadores* de oligonucleotídeo são usados para gerar um amplicon típico de

uma reação PCR. Um terceiro oligonucleotídeo, ou sonda, é projetado para detectar seqüência de nucleotídeo localizada entre os dois iniciadores de PCR. A sonda é não-extensível através da enzima Taq DNA polimerase, e é marcada com um corante fluorescente repórter e um corante fluorescente de extinção. Qualquer emissão induzida por laser do corante repórter é extinta pelo corante de extinção quando os dois corantes estão localizados próximos como eles estão na sonda. Durante a reação de amplificação, a enzima Taq DNA polimerase cliva a sonda de uma maneira dependente do molde. Os fragmentos de sonda resultantes dissociam em solução, e sinal do corante repórter liberado é livre do efeito de extinção do segundo fluorforo. Uma molécula de corante repórter é liberada para cada nova molécula sintetizada, e detecção do corante repórter não-extinto provê a base para interpretação quantitativa dos dados.

TAQMAN® RT-PCR pode ser realizada usando equipamento comercialmente disponível, tal como, por exemplo, ABI PRISM 7700® Sequence Detection System. TM. (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA), ou Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Manneheim, Alemanha). Em uma modalidade, o procedimento de 5' nuclease é realizado em um dispositivo de PCR quantitativa de tempo real tal como o ABI PRISM 7700®. Sequence Detection System®. O sistema inclui termociclizador, laser, dispositivo acoplado à carga (CCD), câmera e computador. O sistema amplifica amostras em um formato de 96 cavidades em um termociclizador. Durante amplificação, sinal fluorescente induzido por laser é coletado em tempo real através de cabos de fibra óptica para todas as 96 cavidades, e detectado no CCD. O sistema inclui *software* para ativar o instrumento e para análise dos dados.

Em alguns exemplos, dados de ensaio de 5'-nuclease são inicialmente expressos como Ct, ou o ciclo limiar. Conforme acima discutido, valores de fluorescência são registrados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado para aquele ponto na reação de amplificação. O ponto quando o sinal fluorescente é primeiro registrado como estatisticamente significante é o ciclo limiar (Ct).

Para minimizar erros e o efeito de variação amostra-para-amostra, RT-PCR pode ser realizada usando um padrão interno. O padrão interno ideal é expresso em um nível constante dentre tecidos diferentes, e é não-afetado pelo tratamento experimental. RNAs mais freqüentemente usados para normalizar padrões de expressão de gene são mRNAs para os genes de manutenção gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), beta-actina e RNA ribossomal 18S.

Uma variação mais recente da técnica de RT-PCR é a PCR quantitativa em tempo real, que mede o acúmulo de produto de PCR através de uma sonda fluorigênica duplamente marcada (isto é, sonda TAQMAN®). PCR em tempo real é compatível com ambas PCR competitiva quantitativa, onde competidor interno para cada seqüência alvo é usado para normalização, e com PCR comparativa quantitativa usando um gene de normalização contido dentro da amostra, ou um gene de manutenção para RT-PCR (vide Held e outros, *Genome Research* 6:986 994, 1996). PCR quantitativa é também descrita na Patente U.S. Nº 5.538.848, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência. Sondas e procedimentos de amplificação quantitativos relacionados são descritos na Patente U.S. Nº 5.716.784 e Patente U.S. Nº 5.723.591, cujas descrições são aqui incorporadas a título de referência. Instrumentos para realização de PCR quantitativa em placas de microtitulação estão disponíveis da PE Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Calif. 94404 sob a marca registrada ABI PRISM® 7700.

As etapas de um protocolo representativo para quantificação de expressão de gene usando tecidos embebidos em parafina, fixados, como uma fonte de RNA, incluindo isolamento de mRNA, purificação, extensão e amplificação de *iniciador* são dadas em vários artigos de jornal publicados (vide Godfrey e outros, *J. Molec. Diagnostics* 2:84 91, 2000; K. Specht e outros, *Am. J. Pathol.* 158:419 29, 2001). Resumidamente, um processo representativo começa com corte de seções de cerca de 10 μm de espessura de amostra de tecido embebido em parafina. O RNA é então extraído, e proteína e DNA são removidos. Após análise da concentração de RNA, etapas de reparo e/ou amplificação de RNA podem ser incluídas, se necessário, e RNA

é transcrito reverso usando promotores específicos de gene seguido por RT-PCR.

Um procedimento de amplificação de ácido nucléico quantitativo alternativo é descrito na Patente U.S. Nº 5.219.727, que é aqui incorporada a título de referência. Neste procedimento, a quantidade de uma seqüência alvo em uma amostra é determinada através de amplificação simultânea da seqüência alvo e um segmento de ácido nucléico de padrão interno. A quantidade de DNA amplificado de cada segmento é determinada e comparada com uma curva padrão para determinar a quantidade de segmento de ácido nucléico alvo que estava presente na amostra antes da amplificação.

Em algumas modalidades deste método, a expressão de um gene "de manutenção" ou "controle interno" pode ser também avaliada. Esses termos pretendem incluir qualquer gene constitutivamente ou globalmente expresso cuja presença permite uma varredura de níveis de mRNA de citocina. Tal varredura compreende uma determinação do nível constitutivo geral de transcrição de gene e um controle para variações em recuperação de RNA.

Monitoramento da Progressão de uma Infecção e/ou Eficácia de Terapia

Em várias modalidades, os métodos de diagnóstico descritos aqui são usados para monitoramento da progressão de uma infecção com *Mycobacterium*. Nesta modalidade, ensaios conforme acima descrito para o diagnóstico de uma infecção com *Mycobacterium* podem ser realizados com o tempo, e a mudança no nível de polipeptídeo(s) reativo(s) avaliada. Por exemplo, os ensaios podem ser realizados mais ou menos a cada 12, 24, 36, 48, 60 ou 72 horas durante um período especificado, tal como durante meses ou semanas, e em seguida realizado conforme necessário.

Em alguns exemplos, a presença de um polipeptídeo de Mtb, ou um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo, é ensaiada. Geralmente, a infecção com *Mycobacterium* está progredindo naqueles pacientes em que o nível de polipeptídeo (tal como detectado usando um agente de ligação), o nível de polinucleotídeo, o nível de anticorpos ou o nível de células T aumenta com o tempo. Em contraste, a infecção com *Mycobacterium* não está pro-

gredindo quando o nível de polipeptídeo reativo, o nível de polinucleotídeo, o nível de anticorpos ou o nível de células T ou permanece constante ou diminui com o tempo. Desta maneira, a eficácia de um regime terapêutico particular pode ser avaliada.

Em uma modalidade, a presença de um polipeptídeo de Mtb é avaliada em um indivíduo. O indivíduo é administrado com um protocolo terapêutico. A presença do polipeptídeo de Mtb é então avaliada. Um aumento ou nenhuma mudança na quantidade do polipeptídeo de Mtb (ou polinucleotídeo) conforme comparado com a quantidade do polipeptídeo de Mtb antes da administração do protocolo terapêutico indica que o protocolo terapêutico não é eficaz, e a infecção com Mtb está progredindo. Uma diminuição na quantidade do polipeptídeo de Mtb (ou polinucleotídeo) conforme comparado com a quantidade de polipeptídeo de Mtb (ou polinucleotídeo) antes da administração do protocolo terapêutico indica que o protocolo terapêutico é eficaz, e que a infecção com Mtb não está progredindo.

Em outra modalidade, a presença de células T, tal como células T $CD8^+$ e/ou células T $CD4^+$, que especificamente reconhecem um polipeptídeo de Mtb é avaliada em um indivíduo. O indivíduo é administrado com um protocolo terapêutico. A presença das células T que especificamente reconhecem o polipeptídeo de Mtb é então avaliada. Uma diminuição ou nenhuma mudança na quantidade de células T CD 8^+ e/ou células T $CD4^+$ que especificamente reconhecem o polipeptídeo de Mtb conforme comparado com a quantidade de células T $CD8^+$ e/ou células T $CD4^+$, respectivamente, que especificamente reconhecem o polipeptídeo de Mtb antes da administração do protocolo terapêutico indica que o protocolo terapêutico não é eficaz. Um aumento na quantidade de células T $CD8^+$ e/ou células T $CD4^+$ que especificamente reconhecem o polipeptídeo de Mtb conforme comparado com a quantidade das células T $CD8^+$ e/ou células T $CD4^+$ que especificamente reconhecem o polipeptídeo de Mtb antes da administração do protocolo terapêutico indica que o protocolo terapêutico é eficaz.

Deve ser notado que para qualquer um dos ensaios acima descritos, para melhorar sensibilidade, marcadores de *Mycobacterium* múltiplos

podem ser avaliados dentro de uma dada amostra. Ficará aparente que os ensaios descritos aqui podem ser usados em combinação. Então, conjuntos de polipeptídeos de *Mycobacterium* e combinações de ensaios podem ser para sensibilidade e especificidade ótimas.

Vários outros protocolos de ensaio existem que são adequados para uso com os polipeptídeos da presente invenção. As descrições acima pretendem ser exemplares apenas.

A descrição é ilustrada pelos Exemplos não-limitantes que seguem.

EXEMPLOS

Para muitas infecções, o repertório da resposta de CD8 é moldado pela entrada de antígeno no curso de processamento de MHC-I, ligação de antígenos de peptídeos e/ou não-peptídeo a moléculas do MHC-I, e reconhecimento dessas estruturas pelas células T. Por fim, um subconjunto relativamente limitado de células T específicas de patógeno emerge. Embora vários antígenos de Mtb de CD4 geralmente reconhecidos tenham sido descritos (Reed e outros, *Microbes Infect.* 7:922-931, 2005) (ESAT-6, CFP10, Ag85, etc), surpreendentemente pouco se sabe sobre antígenos de Mtb comuns reconhecidos por células T $CD8^+$ humanas. A maioria dos epítopos de CD8 que foram identificados foi definida pelo teste de peptídeos de Mtb selecionado quanto à ligação de alta afinidade a moléculas do MHC Classe Ia (HLA-2 na maioria dos casos (vide, por exemplo, Lalvania, *Microbes Infect.* 7:922-931, 1998)). Em quase todos desses, no entanto, a freqüência *ex vivo* dessas células T em indivíduos infectados com Mtb é baixa ou indetectável, sugerindo que essas especificidades podem não representar respostas imunodominantes. Em contraste, nos casos limitados onde células T foram usadas para definir epítopos contidos em antígenos de Mtb selecionados, freqüências *ex vivo* altas foram demonstradas (vide Lewinsohn e outros. Am. *J. Respir. Cirt. Care Med.* 166:843-848, 2002), sugerindo que uma abordagem centrada em célula T pode identificar epítopos imunodominantes. Além disso, respostas de célula T CD8 a alguns antígenos de Mtb que representam bons antígenos de CD4 (CFP10, ESAT-6, Ag85 e Mtb39) foram detectadas

em alta freqüência em pessoas infectadas com Mtb. Então, uma biblioteca limitada de peptídeos sintéticos de sobreposição representando vários antígenos de Mtb de CD4 foi usada para determinar a magnitude da resposta de CD8 a esses antígenos em pessoas com tuberculose (TB) ativa e infecção com tuberculose latente (LTBI) bem como indivíduo não-infectados. Ainda, um painel de clones de célula T $CD8^+$ específica de Mtb foi utilizado para definir epítopos mínimos reconhecidos dentro desses antígenos e determinou a contribuição desses novos epítopos para a resposta de CD8 específica de Mtb.

Exemplo 1

Materiais e Métodos

Indivíduos humanos. Indivíduos não-infectados foram definidos como indivíduos saudáveis com um teste de pele de tuberculina negativo (TST) e quaisquer fatores de risco conhecidos para infecção com Mtb. Indivíduos com LTBI foram definidos como pessoas saudáveis com um TST positivo e quaisquer sintomas e sinais de TB ativa. Em todos os casos de TB ativa, TB pulmonar foi diagnosticada pelo *TB Controller* da região e confirmada por cultura de esputo positiva para *Mycobacterium* tuberculosis. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas de sangue integral obtido através de venipunção e aférese.

Meios e Reagentes. Meio de cultura consistia em RPMI 1640 suplementado com Soro bovino fetal a 10% (FBS; Bio Whittaker), 5 X 10^{-5} M2 ME (Sigma-Aldrich) e glutamina a 2 mM (GIBCO BRL). Para o cultivo e ensaio de clones de célula T reativa a Mtb, RMPI 1640 foi suplementado com soro humano a 10%. Cepa de Mtb H37Rv foi obtida da American Type Culture Collection (Rockville, MD) e preparada conforme previamente descrito (Lewinsohn e outros, *J. Immunol.*, 165:925-930, 2000). Peptídeos foram sintetizados através da Genemed Synthesis, Inc., (São Francisco, CA). Grupos de peptídeo sintético consistiam em 15 mers se sobrepondo em 11 aminoácidos (aa) representando proteínas de Mtb demonstradas ser antígenos de CD4 potentes. Grupos de peptídeo representando CDP-10 (Berthet e outros, *Microbiology* 144:3195-3203, 1998; Dillon e outros, *J. Clin. Microbiol.*

38:3285-3290, 2000), ESAT-6 (Sorenson e outros, *Infect. Immun.* 63:1710-1717, 1995), Mtb39a (dois grupos, A&B, referência) (Dillon e outros, *Infect. Immun.* 67:2941-2950, 1999), Mtb8.4 (Coler e outros, *J. Immunol.* 161:2356-2364, 1998), Mtb 9.9 (Alderson e outros, *J. Exp. Med.* 191:551-560, 2000), (Coler e outros, *J. Immunol.* 161:2356-2364, 1998), Mtb 9.9 (Alderons e outros, *J. Exp. Med.* 191:551-560, 2000), EsxG (Rosenkrands e outros, *Electrophoresis* 21:3740-3756, 2002), antígeno de 19 kDa (Collins e outros, *J. Gen. Mlcrobiol.* 136:1429-1436, 1990), antígeno 85b (Borremans e outros, *Infect. Immun.* 57:3132-3130, 1989) (dois grupos, A & B, referência) foram sintetizados. Peptídeos foram ressuspensos em DMSO e até 50 peptídeos foram combinados em um grupo de modo que cada peptídeo no grupo estava em uma concentração de 1 mg/ml. Grupos de peptídeo foram armazenados a -80º C.

Cepas de Célula e Clones de Célula T. Cepas de célula B transformadas com EBV, LCL, ou foram geradas usando sobrenadantes da cepa de célula 9B5-8 (*American Type Cultura Collection*) ou obtidas do *National Marrow Donor Program* (NMDP; Mineápolis, MN). LCL foram mantidas através de passagem contínua conforme previamente descrito (Heinzel e outros, *J. Exp. Med.* 196:1437-1481, 2002). Clones de célula T específica de Mtb foram isolados de indivíduos com LTBI ou tuberculose ativa, usando DCs infectadas com Mtb e metodologia de clonagem de diluição limitante conforme previamente descrito (Lewinsohn e outros, *J. Immunol.* 165:925-930, 2000). Rapidamente, células T $CD8^+$ foram isoladas de PBMC usando seleção negativa usando contas revestidas com anticorpo CD4 e então seleção positiva usando contas magnéticas revestidas com anticorpo CD8 pelas instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn CA) ou através de citometria de fluxo. Neste caso, (BD Bioscience Nº Cat. 555347) células negativas CD4-PE, positivas CD8-APC (BD Bioscience, Nº Cat. 555369) (pureza >99%) foram selecionadas em um Becton Dickenson LSR II. Células T foram semeadas em várias concentrações na presença de uma CD infectada com Mtb autóloga irradiada 1 x 10^5, gerada conforme descrito abaixo, e rIL-2 (5 ng/ml) em meio de cultura celular consistindo em 200 µl de RPMI 1640 su-

plementado com soro humano a 10%. Cavidades exibindo crescimento entre 10-14 dias foram avaliadas quanto à especificidade de Mtb usando ELISPOT e DC infectadas com Mtb como uma fonte de APCs. Células T retendo especificidade de Mtb foram fenotipadas adicionalmente quanto à expressão do receptor de célula T $\alpha\beta$ e expressão de CD8 através de FACS e expandidas conforme descrito abaixo. Uso de Vβ foi determinado usando o IOTest Beta Mark Kit da Beckman Coulter.

Expansão de clones de célula T. Para expandir os clones de células T $CD8^+$, um protocolo de expansão rápida usando estimulação de mAB anti-CD3 foi usado conforme anteriormente descrito (Heinzel e outros, *J. Exp. Med.* 196:1473-1481, 2002).

Geração e Infecção de DC de Sangue Periférico. DCs derivadas de monócito foram preparadas (Heinzel e outros, *supra*; Romani e outros, *J. Exp. Med.* 180:83-93, 1994). Para gerar DC infectada com Mtb, células (1 x 10^6) foram culturadas da noite para o dia na presença de Mtb (multiplicidade de infecção [MOI] = 50:1). Após 18 horas, as células foram colhidas e ressuspensas em RPMI/soro humano a 10%.

Ensaios de ligação de MHC. O ensaio de ligação de MHC-peptídeo utilizado mede a habilidade de ligantes de peptídeo em inibir a ligação de um peptídeo radiomarcado a moléculas de MHC purificadas, e foi descrito em detalhes em outro lugar (Sidney e outros, 1999. "UNIT 18.3 Measurement of MHC/peptide interactions by gel filtration". In *Current Protocols in Immunology.* Coligan e outros, eds., John Wiley & Sons, Inc., 1996). Rapidamente, moléculas de MHC purificadas, peptídeos de teste e um peptídeo de sonda radiomarcado foram incubados em temperatura ambiente na presença de microglobulina B2 humana e um coquetel de inibidores de protease. Após uma incubação de dois dias, ligação do peptídeo radiomarcado à molécula do MHC classe I correspondente foi determinada através da captura de complexos de MHC/peptídeo em placas revestidas com anticorpo W6/32 (anti-HLA A, B e C) ou B123.2 (anti-HLA B, C e um pouco de A), e contagens ligadas por minuto (cpm) foram medidas usando um contador de microcintilação. Para ensaios de competição, a concentração de peptídeo

dando 50% de inibição da ligação do peptídeo radiomarcado foi calculada. Peptídeos foram tipicamente testados em seis concentrações diferentes cobrindo uma faixa de dose de 100.000 vezes, e em três ou mais ensaios independentes. Sob as condições utilizadas, onde [marcador]<[MHC] e $IC_{50} \geq$ [MHC], os valores de IC_{50} medidos são aproximações razoáveis dos valores Kd verdadeiros.

Ensaio ELISPOT IFN-γ. O ensaio ELISPOT IFN-γ foi realizado conforme previamente descrito (Beckman e outros, *J. Immunol.* 157:2795-2803, 1996). Para determinação de freqüências *ex vivo* de células T $CD4^+$ ou $CD8^+$ respondendo à infecção com Mtb ou antígenos de Mtb, células T $CD4^+$ ou $CD8^+$ foram positivamente selecionadas de PBMC usando contas magnéticas (Miltenyi Biotec, Auburn CA) como uma fonte de células T respondedoras e testadas em duplicata em quatro concentrações diferentes. DC autólogas (20.000 células/cavidade) foram usadas como APC e DC foram ou infectadas com Mtb ou pulsadas com grupos de peptídeo (5 µg/ml, concentração final de cada peptídeo) e então adicionadas ao ensaio. Para ensaio usando clones de célula T, células T (1000 ou 5000 células/cavidade) foram incubadas com LCL autóloga (20.000 células/cavidade) na presença ou ausência de antígeno.

Análise de dados: Para determinar a freqüência *ex vivo* de células T específicas de antígeno, o número médio de manchas por cavidade para cada duplicata foi posto em gráfico contra o número de células respondedoras por cavidade. Análise de regressão linear foi usada para determinar a inclinação da linha, que representa a freqüência de células T específicas de antígeno. O ensaio é considerado positivo, isto é, refletindo a presença de uma resposta de célula T iniciada, se a probabilidade binominal (Lewinshon e outros, *Microbes Infect.* 8:2587-2598, 2006) para o número de manchas for significantemente diferente através de ensaios experimentais e de controle. Para determinar diferenças em freqüências de célula T *ex vivo* entre grupos análise Wilcoxon/Kruskal foi usada.

Exemplo 2

Definição de Antígenos de $CD8^+$ Específicos de Mtb Imunodominantes

Para definir antígenos de $CD8^+$ específicos de Mtb imunodominantes, e para determinar se ou não essas respostas resultam da infecção com Mtb, células T $CD8^+$ foram usadas de doadores não-infectados, com LTBI, ou ativamente infectados com Mtb. Respostas foram determinadas ou diretamente *ex vivo* ou usando clones de célula T $CD8^+$ obtidos através de clonagem de diluição limitante em DC autóloga infectada com Mtb (Lewingsohn e outros, *J. Immunol.* 165:925-930, 2000). Como muito é conhecido sobre antígeno de Mtb de $CD4^+$, um painel desses antígenos geralmente conhecidos foi selecionado para varredura adicional. Esses foram: Mtb39, CPF10 e Mtb8.4, Mtb9.9, ESAT-6, Ag85b, 19 KDa e EsxG. Para evitar influência introduzida usando peptídeos de especificidade de ligação de HLA prevista, foram sintetizados peptídeos de sobreposição (15 aa, sobreposição 11 aa) para representar as proteínas de interesse (Lewinshon e outros, *J. Immunol.* 166:439-446, 2001).

Para determinar precisamente as freqüências de célula efetora *ex vivo* de células T $CD8^+$, análise de regressão linear foi usada. Conforme mostrado na Figura 1, células T $CD8^+$ purificadas com conta magnética foram testadas contra DC pulsada com peptídeo em uma faixa de números de células T $CD8^+$ em um ensaio ELISPOT IFN-γ. Um ensaio positivo foi determinado conforme descrito abaixo e, se positivo, a freqüência específica de antígeno seria determinada usando regressão linear.

Indivíduos não-infectados (n = 14), aqueles com LTBI (n = 20) e aqueles com TB ativa (n = 12) foram avaliados quanto a respostas de $CD8^+$ para um painel de antígenos de célula T $CD4^+$ Mtb, bem como DC infectada com Mtb. Todos os indivíduos testados tinham respostas de célula T CD8+ robustas para DC infectada com Mtb e eram de magnitude maior em indivíduos com TB ativa do que naqueles com TLBI ($p = 0,01$; Figura 2, Tabela I). No entanto, respostas de célula T $CD8^+$ para o painel de antígenos de Mtb foram encontradas quase exclusivamente naqueles infectados com Mtb pelo que diferenças estatisticamente significantes entre indivíduos não-infectados

e infectados com Mtb foram notadas para sete de dez antígenos para ambas a magnitude da resposta (Figura 2) e a proporção de ensaios positivos (Tabela I).

Tabela I.

Respostas de célula T CD8$^+$ a antígenos de TB conhecidos

Antígeno	Infectado com Mtb Nº de positivo[a]/ Nº testado (%)	Não-infectado com Mtb Nº de positivo[a]/ Nº testado (%)	Valor P (teste de fisher bilateral)
DC de Mtb	17/17 (100)	11/11 (100)	
Mtb39 Grupo A	13/30 (43	0/14 (0)	0,003
Mtb39 Grupo B	10/30 (33)	0/14 (0)	0,01
CFP10	14/30 (47)	1/14 (7)	0,02
Mtb 8,4	13/30 (43)	0/14 (0)	0,003
Mtb 9,9	10/25 (40)	1/14 (7)	0,06
ESAT 6	12/25 (48)	0/14 (0)	0,003
Ag85b Grupo A	5/22 (23)	1/14 (7)	0,37
Ag85b Grupo G	4/22 (18)	0/14 (0)	0,14
19 kd	6/22 (27)	1/12 (8)	0,38
EsxG	9/22 (41)	0/14 (0)	0,006

[a]Ensaio positivo definido no texto.

No entanto diferenças em respostas de célula T CD8$^+$ entre indivíduos com TB ativa e LTBI não foram estatisticamente diferentes. Embora respostas de célula T CD8$^+$ fortes fossem observadas contra muitos dos antígenos testados, é igualmente notado que vários indivíduos com respostas de célula T CD8$^+$ direcionadas a Mtb fortes não tiveram respostas demonstráveis a muitos dos antígenos testados.

Esses dados de freqüência *ex vivo* demonstram a presença de respostas de alta freqüência a vários antígenos de Mtb conhecidos, mas não esclarece alelo de restrição, epítopo mínimo ou hierarquia de dominância dentro do gene de interesse. Para se direcionar a esta questão, clonagem de diluição limitante de células T CD8$^+$ humanas usando DC infectada com Mtb foi realizada (vide Lewinsohn e outros, *J. Immunol.* 166:439-446, 2001) e painéis de ambos clones de célula T CD8$^+$ classicamente e não-classica-

mente restritos a HLA foram gerados. Usando grupos de peptídeo representando antígenos de $CD4^+$ conhecidos, a especificidade antigênica dos clones restritos a HLA-Ia pode ser definida em mais da metade dos clones (Tabela I).

Tabela II.

Muitos clones de célula T CD8+ reconhecem antígenos de célula T CD4+ conhecidos

Doador	Estado da TB	Clones de HLA-Ia (Nº)[a]	Antígeno Identificado (Nº)[b]	Nº de Antígenos Distintos (Nº)[c]	Nº de Epítopos Distintos (Nº)[d]
D431	TB Ativa	1	0	0	0
D432	TB Ativa	14	4	2	2
D466	TB Ativa	11	10	1	2
D571	TB Ativa	7	7	1	1
D480	TB Ativa	6	6	1	1
D481	TB Ativa	11	11	1	1
D426	LTBI	1	0	0	0
D443	LTBI	1	1	1	1
D454	LTBI	2	2	2	2
D504	LTBI	7	2	1	1
Total		61	42	10	11

[a]Número de clones derivados de doador.

[b]Número de clones para os quais antígeno cognato foi identificado.

[c]Número total de antígenos distintos identificados do conjunto de clone.

[d]Número total de epítopos distintos identificados do conjunto de clone.

Esta abordagem é mostrada em detalhes para um clone representativo único, D466 D6, derivado de um indivíduo com TB ativa. Conforme mostrado na Figura 3A, teste do clone contra DC autóloga pulsada com um painel de grupos de peptídeo definiu sem ambiguidade a especificidade antigênica como CFP10. O clone foi então testado contra cada um dos peptídeos de 15 mer que compreende o grupo CFP10, revelando que o epítopo estava contido dentro de CFP101-15 (Figura 3B). Cada peptídeo 8 aa, 9 aa, 10 aa e 11 aa possível foi então sintetizado e testado quanto à reatividade,

revelando atividade antigênica entre aa 2-11 (Figura 3C). Similarmente, cada clone foi testado contra cepas de célula linfoblastóide (LCL) compartilhando pelo menos um tipo de HLA com o doador (Figura 3D).

LCL autóloga e LCL IHW 9058, que compartilham B4501 e C1601, apresentam o epítopo para o clone, identificando ambos B4501 e C1601 como possíveis alelos de restrição. No entanto, CLC C1601+ D433 não apresentam o epítopo, eliminando C1601 como um alelo de restrição candidato. Deste modo D466 D6 é restrito por HLA-B4501. Conforme demonstrado na Figura 4, através do teste de cada epítopo plausível em uma ampla faixa de concentrações, o epítopo mínimo foi definido como CFP10-210 para D466 D6. Dados experimentais apoiando a designação do epítopo mínimo são providos para cada clone na Figura suplementar. Um sumário da especificidade antigênica, epítopo mínimo e alelo de restrição de HLA é apresentado na Tabela III. Inesperadamente, todos exceto um dos clones de célula T foram restritos por alelos de HLA-B. Ainda, uma minoria daqueles observados eram 9 aa de comprimento.

Tabela III. Sumário de Epítopos Identificados

Clone[a]	Gene	Número de Acesso	HLA-Alelo Restrito	Localização do Epítopo	Seqüência do Epítopo (SEQ ID NOS:26-38)	Nº SFU[b]	Afin. de Lig. MHC[c]	Região V beta
D160 1-B[d] (0)	CFP10	Rv3874	B44	2-11	AEMKTDAATL	360	38	
D160 1-6F[d] (0)	CFP10	Rv3874	B14	85-94	RADEEQQQAL	120	NA	5,3
D432 H12 (2)	CFP10	Rv3874	B3514	49-58	TAAQAAVVRF	258	2011[c]	IND
D466 A10 (10)	CFP10	Rv3874	B4501	2-9	AEMKTDAA	2458	48	22
D466 D6 (1)	CFP10	Rv3874	B4501	2-12	AEMKTDAATLA	1993	6,2	9
D481 C10 (10)	CFP10	Rv3874	B1502	75-83	NIRQAGVQY	1715	14[f]	13,6
D481 C11 (1)	CFP10	Rv3874	B1502	75-83	NIRQAGVQY	1715	14[f]	13,1
D480 F6 (6)	CFP10	Rv3874	B0801	3-11	EMKTDAATL	387	79	IND
D571 B12 (3)	CFP10	Rv3874	B4402	2-11	AEMKTDAATL	31	38	14
D571 E9 (4)	CFP10	Rv3874	B4402	2-11	AEMKTDAATL	31	38	8
D504 E4 (1)	Mtb9.8	Rv0287	A0201	3-11	LLDAHIPQL	<10	0,39	IND
D454 B10 (1)	Mtb9.8	Rv0287	B0801	53-61	AAHARFVAA	88	0,22	7,1
D454 H1-2 (1)	Mtb8.4	Rv1174c	B1501	5-15	AVINTTCNYGQ	24	10	14
D432 A3 (2)	Mtb8.4	Rv1174c	B3514	32-40	ASPVAQSYL	210	127[e]	22
D443 H9 (1)	Ag85B	Rv1886c	TBD	144-153	ELPQWLSANR	<10	NA	

[a]Número de clones irmãs em parênteses.
[b]Nº De SFU/250.000 células T CD8+ é mostrado.
[c]IC50 em nm é mostrada.
[d]*J. Immunol.* 2001 Jan 1 previamente publicado;166(1):439-46.
[e]Afinidade de ligação medida para B3501 é mostrada.
[f]Afinidade de ligação para B1501 é mostrada.
NA = Não-Disponível.
IND = Indeterminado.
TBD = A ser feito.

Devido ao fato de que cada um dos clones de célula T $CD8^+$ individuais foi derivado com base em cultivo de DC infectada com Mtb, foi determinado se ou não o antígeno e epítopos identificados refletiam epítopos imunodominantes *ex vivo*. Duas abordagens independentes foram seguidas, a primeira para determinar se a resposta estava presente em alta freqüência e a segunda para determinar qual proporção da resposta total ao antígeno é constituída pelo antígeno. Para determinar a freqüência de célula efetora *ex vivo*, conforme descrito na Figura 1, cada epítopo foi testado usando DC autóloga e células T $CD8^+$ purificadas com conta magnética do doador do qual os clones de célula T foram isolados. Um sumário das freqüências de célula efetora é apresentado na Tabela III. Para a maioria, os epítopos refletem respostas de alta freqüência, e então poderiam ser considerados uma resposta que foi iniciada pela exposição a Mtb. Notavelmente, clones de célula T isolados de quatro doadores reconhecidos CFP10. Para determinar se os epítopos definidos refletiam uma proporção substancial da resposta total ao antígeno de interesse, células T $CD8^+$ purificadas com conta magnética de três doadores com células mononucleares de sangue periférico (PMBC) disponíveis suficientes foram testadas quanto à reatividade a cada peptídeo de 15-mer individual, o grupo de peptídeo e peptídeo representando o epítopo mínimo. Como é demonstrado na Figura 5, as freqüências *ex vivo* para o epítopo mínimo, peptídeo(s) de 15-mer contendo o epítopo mínimo e grupo de peptídeo foram notavelmente concordantes. Esses dados sugerem que para cada doador a hierarquia de dominância foi claramente estabelecida, e é refletida nos clones originais. Finalmente, como é notado na Tabela III, clones filhas de especificidade idêntica foram freqüentemente identificadas, um resultado que seria previsto com base em uma hierarquia de imunodominância. Tingimento com TCR V beta foi usado para confirmar a relação clonal entre clones filhas. Interessantemente, em dois casos, o epítopo mínimo idêntico e restrição por HLA foram representados por dois clones distintos (Tabela III).

Devido ao fato de que muito trabalho em respostas de célula T $CD8^+$ humana para Mtb se apoiou no uso de algoritmos de previsão de HLA,

conforme cada epítopo era definido era perguntado se ou não os epítopos teriam sido previstos através dessas abordagens. Muitos desses epítopos não foram classificados fortemente. Isto poderia destacar as limitações desses algoritmos no momento em que eles foram usados. Para se endereçar a esta questão experimentalmente, a IC_{50} de cada peptídeo que tinha sido sintetizado no curso da definição do epítopo mínimo foi determinada contra um painel de moléculas de HLA humana. É mostrada na Tabela III a IC_{50} para o epítopo mínimo com o alelo de restrição cognato. Os dados demonstraram que os epítopos de célula T ligaram avidamente a HLA, e mostram um alto grau de concordância entre os dados de epítopo de célula T e dados de ligação de HLA.

Os dados demonstraram que respostas de célula T $CD8^+$ estão presentes em pessoas infectadas com Mtb em freqüências que são comparáveis com aqueles vistas seguindo muitas infecções virais comuns tal como vaccínia, influenza e CMV. Todos exceto um dos epítopos que foram mapeados foram restritos por moléculas de HLA-B. Os dados sugerem que usando uma abordagem guiada por célula T para identificação de epítopo, epítopos dominantes podem ser definidos em humanos infectados com Mtb.

Exemplo 3

Varredura de clones de célula T contra uma biblioteca de peptídeo genômico

Os clones de célula T classicamente restritos e não-classicamente restritos (vide Tabela II acima) que não reconheceram um dos grupos de peptídeo de antígeno de Mtb conhecidos (Rv3875, Rv3874, Rv1886c, Rv0287, Rv3763, Rv1174, Rv1196, Rv1793, Rv2346c, Rv1037c, Rv3619c e Rv1198) foram avaliados contra uma biblioteca de peptídeo genômico. Esta biblioteca de peptídeo representa 389 genes, representando aproximadamente 10% do genoma de Mtb. Os peptídeos são de 15 mers se sobrepondo 11 para cada produto de gene. 50 nmols de cada peptídeo foram sintetizados individualmente e então agrupados em 777 grupos de 50 peptídeos em um formato de 96 cavidades (nove placas). Cinco cavidades vazias e uma cavidade de um grupo de peptídeo irrelevante, SIV gag, foram incluídas em cada uma das nove placas. Para avaliar os clones contra a biblioteca de peptídeo genômico, os clones são primeiro expandidos e testados contra

DCs infectadas com Mtb para assegurar que cada clone desta expansão particular dê um sinal específico de Mtb robusto no ensaio ELISPOT. Então até seis clones de célula T são agrupados. Para a varredura, clones de célula T (5.000 células/cavidade de cada clone), DCs autólogas (20.000 células/cavidade), IL-2 (0,5 ng/ml) e os grupos de peptídeo (5 ug/ml, peptídeos individuais) foram incubados da noite para o dia a 37º C no ensaio ELISPOT. Apenas uma réplica técnica é feita por grupo porque 5000 clones de célula T por cavidade com um antígeno de peptídeo produziram uma resposta positiva esmagadora, resultando em um resultado definitivo. Seis clones clássicos de D504 foram avaliados contra a biblioteca de peptídeo genômica, levando ao encontro de um novo epítopo. Este epítopo era da família de quatro proteínas que inclui EsxJ, EsxW, EsxK e EsxP. Essas proteínas compartilham 98% de homologia e diferem em apenas 3 aminoácidos. Há um quinto membro desta família, EsxM (Rv1792), que não estava incluído na biblioteca de peptídeo genômico.

Os clones foram avaliados contra os quinze mers individuais para esses grupos de peptídeo. Todos os seis clones clássicos reconheceram EsxJ 21-35. Esta é uma região de EsxJ que é idêntica as outros quatro membros desta família. Em seguida, peptídeos de 9, 10 e 11 mers foram feitos destes 15 mers e avaliados contra cada clone. O epítopo mínimo foi determinado ser EsxJ 24-34. Em adição, a restrição por HLA foi verificada ser B5701.

Exemplo 4

Varredura adicional de clones de célula T contra uma biblioteca de peptídeo genômico

Onze clones clássicos de D432B foram avaliados contra a biblioteca de peptídeo genômico descrita acima. O antígeno foi determinado para dois clones, que levaram à identificação de dois novos epítopos, PE_PGRS42$_{47\text{-}55}$ e PE9$_{53\text{-}67}$. O epítopo mínimo para um clone foi determinado ser PE_PGRS42$_{47\text{-}55}$ e a restrição por HLA foi verificada ser B3514.O epítopo mínimo para o outro clone não é ainda determinado, mas está contido no PE9$_{53\text{-}67}$ de 15 mer. A restrição por HLA para este clone foi verificada ser B3905.

Tabela IV.

Detalhes de Novos Epítopos de Varreduras de Biblioteca de Peptídeo Genômico

Clone	Gene	Número de Acesso	Localização do Epítpo	Epítopo	No.SFU/250.000 CélulasT CD8+	MHC-Restrição	Afinidade de Ligação a MHC (IC_{50} nm)	Região beta TCR V
D504 F9 (6)	EsxJ*	Rv1038c	24-34 SEQ ID NO:2	QTVEDE-ARRMW	84	B5701	TBD	Indeterminado
D432 D8 (1)	PE9	Rv1088	53-67 SEQ ID NO:7	RLFNAN-AEEYHA-LSA	TBD	B3905	TBD	8
D432 H8 (1)	PE_PGR S42	Rv2487c	47-55 SEQ ID NO:8	VSAAIAG-LF	TBD	B3514	TBD	7,1

Número de clones reconhecendo epítopo de cada doador em parênteses. *Esta é uma família de proteínas que tem seqüências quase idênticas. A família consiste em Rv1038c, Rv1197, Rv2347, Rv3620c.

Tabela V. Sumário de Varreduras de Clone Completados

Doador	Estado da TB	Nº Clássico Disponível (avaliado)	Nº Não-clássico disponível (avaliado)	Nº de cavidades positivas em varredura	Nº de hits confirmados	Nº de epítopos novos	Nº de epítopo identificado em clones clássicos	Nº de epítopo NÃO-identificado em clones clássicos
426	PPD+	1 (1)	4 (4)	1	0	0	0	1
431	Ativa	1 (1)	1 (1)	1**	0	0	0	1
432	Ativa	11 (11)	14 (7)	11	3	2	3	8
454	PPD+	1* (0)	6 (4)	0	0	0	0	0
466	Ativa	1 (1)	4 (4)	1	0	0	0	1
504	PPD+	6 (6)	9 (9)	5	4	1	6	0

21 (20) 38 (29) 18 7 3 9 11

*O clone clássico de D454 não reconheceu Mtb quando da reexpansão e não foi avaliado contra a biblioteca.

** Os clones clássicos de 426 e 431 foram avaliados juntos, então havia uma cavidade positiva entre ambos clones.

Exemplo 5

Varredura de células T $CD8^+$ ex vivo contra uma biblioteca de peptídeo genômica

Células T $CD8^+$ de doador LTBI, D610 (SE Asian), foram avaliadas contra a biblioteca de peptídeo genômica descrita acima. Cada placa da biblioteca de peptídeo genômica foi avaliada em duplicata, para um total de 18 placas ELISPOT por varredura. Células T $CD8^+$ foram preparadas de PBMC criopreservadas por seleção de $CD8^+$ usando separação de conta magnética. Populações de célula resultantes continham □ 96% de células T $CD8^+$. Células T $CD8^+$ (250.000 células/cavidade), DC autólogas (20.000 células/cavidade) e IL-2 (0,5 ng/ml) foram adicionadas a peptídeo (final 5 ug/ml, peptídeos individuais) em placas ELISPOT. Cinco cavidades de controle médias são incluídas em cada placa. Para cada placa, a média dessas cinco cavidades foi subtraída de cada cavidade daquela placa para normalizar entre as placas. Cada replicação técnica em cada placa foi então *scored*. Uma cavidade foi marcada positiva se as unidades de formação de mancha (SFU), menos a média das cavidades médias, fosse maior do que ou igual a dez e a SFU fosse maior do que ou igual a duas vezes a média da média (Hudgens e outros, *J. Immunol. Methods.* 288:19-34, 2004). Este doador respondeu às quatro cavidades de peptídeo contendo EsxJ, EsxW, EsxK e EsxP. Células T $CD8^+$ foram então avaliadas contra cada 15 mer desses grupos de peptídeo e verificadas responder a apenas EsxJ 21-35, a mesma região de EsxJ, EsxW, EsxK e EsXP que é descrita no exemplo 3 acima.

Sete doadores adicionais foram avaliados contra a biblioteca de peptídeo genômico. As 10 primeiras respostas são detalhadas na Tabela 7. Os quatro grupos de peptídeo destacados em amarelo contêm peptídeos de apenas um gene. Esses quatro genes contêm quatro nove epítopos.

Tabela 7.

10 Principais Respostas de Varreduras de Grupo de Peptídeo de Sete Doadores. Unidades de Formação de Mancha são para 250.000 Células T $CD8^+$

"Pool" de Peptídeo	Doador	SFU Média	Números de Rv Representados em Cavidades	Categoria Funcional
C09_1	D560	208,2	Rv1860(50):	parede celular e processos celulares
C12_4	D545	156,4	Rv0468(27): Rv0456c(23):	metabolismo de lipídeo
A04_3	D454	136	Rv0284(17): Rv0288(11): Rv0287(22)	parede celular e processos celulares
B10_3	D560	112,3	Rv1273c(50):	parede celular e processos celulares
E04_4	D560	78,2	Rv0152c(40): Rv0151c(10):	PE/PPE
G12_8	D560	77,4	Rv3478(18): Rv3507(32):	PE/PPE
E07_4	D525	76,8	Rv0159c(50):	PE/PPE
A10_8	D560	70,4	Rv3136(47): Rv3144c(3):	PE/PPE
E11_8	D560	66,4	Rv3350c(50):	PE/PPE
E08_9	D545	60,2	Rv1404(13): Rv2711(37):	proteínas reguladoras

Exemplo 6

Modelos animais

Em pesquisa de tuberculose, o modelo de camundongo foi usado extensivamente para modelo de vários aspectos da doença. Camundongos podem ser infectados por uma variedade de vias incluindo intravenosa, intraperitoneal e traqueal. Uma via é aerossolização do organismo para infecção respiratória. Os camundongos são expostos ao aerossol em uma câmara (corpo inteiro enfraquecido ou infecção apenas no nariz). A dose da invenção pode ser variada manipulando a concentração de Mtb no nebulizador ou tempo de exposição. Uma infecção de dose baixa, tal como cerca de

50 unidades de formação de colônia (UFC) através de aerossol resulta em um aumento lento e uniforme em números bacterianos nos pulmões, geralmente atingido um pico em quatro semanas, que coincide com o número de pico de células T nos pulmões. O período inicial é considerado o estágio agudo de infecção. Seguindo infecção, há uma disseminação de bactérias para os nós linfáticos mediastinais. Inicialização de célula T é geralmente detectável entre duas e três semanas. Após cerca de quatro semanas os números bacterianos estabilizam, e há uma resposta patológica progressiva lenta. Este sistema é de uso para modelagem da infecção ativa.

A habilidade de uma composição de interesse em prevenir infecção em um modelo animal pode ser avaliada usando o método descrito aqui. A eficácia da composição de interesse pode ser monitorada através da medição da resposta de célula T, tal como o número de células T $CD8^+$ ou $CD4^+$ respondendo a um polipeptídeo de Mtb em uma amostra biológica. Para esses ensaios células T *com um são contatadas* com pelo menos um polipeptídeo de *Mycobacterium,* e uma célula apresentando antígeno apresentando o um ou mais polipeptídeos de *Mycobacterium.* Os polipeptídeos de *Mycobacterium* incluem a seqüência de aminoácido mostrada como (a) uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID N O:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 ou SEQ ID NO:12; ou (b) pelo menos nove a vinte aminoácidos consecutivos de pelo menos uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:7, SEQ ID N O:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 ou SEQ ID NO:12, onde os nove a vinte aminoácidos consecutivos especificamente se ligam a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I. É determinado se as células T reconhecem especificamente o polipeptídeo de *Mycobacterium.* Um aumento no número de células T que especificamente reconhecem o polipeptídeo de Mtb indica que a composição é eficaz.

Modelos animais exemplares são descritos abaixo (vide também

Repique e outros, *Infec. Immunol.* 70:3318-3323, 2002, incorporado aqui a título de referência para um protocolo adicional).

A. Modelo de Camundongo de Curto Prazo:

Camundongos C57BL/6 são vacinados com uma composição de acordo com o protocolo apropriado e então descansados por 4 a 6 semanas. Camundongos imunizados são infectados com um aerossol de dose baixa (50-100 UFC) de *M. tuberculosis* virulento e proteção é avaliada estimando o número de bacilos viáveis 30 dias pós-provocação.

Contagens viáveis são realizadas no pulmão e baço de camundongos através de homogeneização dos órgãos e plaqueamento de diluições de 10 vezes seriais em placas de ágar 7H11. As placas são incubadas por até 21 dias e o número de unidades de formação de colônia por órgão determinado.

Camundongos vacinados com BCG têm aproximadamente proteção de 1Log10 em seus pulmões e baços quando comparado com camundongos tratados com PBS.

Uma amostra biológica é obtida antes da administração da composição de interesse e após administração da composição de interesse. Alternativamente, amostras biológicas são obtidas de animais tratados com veículo e de animais tratados com a composição de interesse. Um aumento no número de células T que ligam um polipeptídeo de Mtb conforme aqui descrito indica que a composição é eficaz.

B. Modelo de porquinho-da-índia de curto prazo

Porquinhos-da-índia Hartley exogâmicos são vacinados com uma composição incluindo um ou mais polipeptídeo de Mtb, ou um polinucleotídeo codificando esses um ou mais polipeptídeos e então descansados por 8 a 10 semanas. Porquinhos-da-índia imunizados são infectados com uma dose de aerossol baixa (10-30 UFC) de *M. tuberculosis* virulento e proteção é avaliada estimando o número de bacilos viáveis 30 dias pós-provocação.

Contagens viáveis são realizadas no pulmão e baço de porquinhos-da-índia através de homogeneização dos órgãos e plaqueamento de diluições 10 vezes seriais em placas de ágar 7H11. Placas são incubadas

por até 21 dias e o número de unidades de formação de colônia por órgão determinado. Segmentos do pulmão e baço são também tomados para análises histológicas.

Porquinhos-da-índia vacinados com BCG têm proteção de aproximadamente 2-3Log10 em seus pulmões e baço quando comparado com porquinhos-da-índia tratados com PBS. Ainda, porquinhos-da-índia vacinados com BCG têm granulomas bem definidos quando comparado com animais não-vacinados.

Uma amostra biológica é obtida antes da administração da composição de interesse e após administração da composição de interesse. Alternativamente, amostras biológicas são obtidas de animais tratados com veículo e de animais tratados com a composição de interesse. Um aumento no número de células T que ligam um polipeptídeo de Mtb conforme aqui descrito indica que a composição é eficaz.

C. Modelo de porquinho-da-índia de longo prazo

O modelo de porquinho-da-índia é similar ao modelo de camundongo, mas os experimentos são do tipo sobrevivência abertos e podem durar até 2 anos. Porquinhos-da-índia desenvolvem granulomas 'clássicos' similares a humanos com tuberculose ativa (TB), e conforme necrose do tecido pulmonar progride, eles começam a perder peso e morrem de TB similar a humanos. O número de unidades de formação de colônia nos pulmões e baço pode ser avaliado. Exame histológico pode ser também realizado para determinar o grau de envolvimento do pulmão e destruição de tecido. Após exposição a aerossol de baixa dose no porquinho-da-índia o número de organismos aumenta progressivamente durante as três primeiras semanas e então atinge um platô em um estado crônico. Durante os últimos estágios de infecção há carga bacteriana aumentada no pulmão e isto está associado com uma piora da condição patológica. Sem tratamento, há um aumento concomitante em ambas células CD4 e CD8 nos pulmões de porquinhos-da-índia infectados.

Porquinhos-da-índia Hartley exogâmicos são vacinados com a vacina do experimento de acordo com o protocolo apropriado e então des-

cansados por 8 a 10 semanas. Porquinhos-da-índia imunizados são então infectados com um aerossol de dose baixa (10-30 UFC) de *M. tuberculosis* virulento. Os porquinhos-da-índia são pesados semanalmente e monitorados diariamente quanto a sinais de doença (tal como respiração aumentada e falha em se desenvolver). Porquinhos-da-índia não-vacinados sucumbem à infecção de 20 a 25 semanas pós-provocação, enquanto porquinhos-da-índia vacinados com BCG sobrevivem por 50 a 55 semanas pós-provocação.

Na necropsia, o pulmão e baço são avaliados quanto ao número de UFC e a extensão de patologia. A proteção relativa da composição experimental é comparada com animais vacinados com BCG.

Uma amostra biológica é obtida antes da administração da composição de interesse e após administração da composição de interesse. Alternativamente, amostras biológicas são obtidas de animais tratados com veículo e de animais tratados com a composição de interesse. Um aumento no número de células T que ligam um polipeptídeo de Mtb conforme aqui descrito indica que a composição é eficaz.

Será aparente que os detalhes precisos dos métodos ou composições descritos podem ser variados ou modificados sem se afastar do espírito da invenção descrita. Todas tais modificações e variações que se encaixarem no escopo e espírito das reivindicações abaixo são reivindicadas.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> Oregon Health and Science University
David, Lewinsohn M.
Deborah, Lewinsohn A.

<120> MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE UMA INFECÇÃO POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

<130> 899-77364-03

<150> US 60/782,364

<151> 2006-03-14

<160> 38

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be A ou T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa can be T ou A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (59)..(59)

<223> Xaa qualquer aminoácido ou não aminoácido

<400> 1

Met Xaa Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala
1 5 10 15

Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg
20 25 30

Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met
35 40 45
Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Xaa Xaa Met Asn Gln Ala Phe
50 55 60
Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val Arg
65 70 75 80
Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu
85 90 95
Ser

<210> 2
<211> 97
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 2

Met Ala Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala
1 5 10 15
Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg
20 25 30
Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met
35 40 45
Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Thr Gln Met Asn Gln Ala Phe
50 55 60
Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val Arg
65 70 75 80
Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu
85 90 95
Ser

<210> 3
<211> 98
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 3

Met Ala Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala
1 5 10 15
Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg
20 25 30
Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met
35 40 45
Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Ala Gln Met Asn Gln Ala Phe
50 55 60
Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val Arg
65 70 75 80
Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu
85 90 95
Ser Ser

<210> 4
<211> 97
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 4

Met Ala Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala
1 5 10 15
Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg
20 25 30
Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met
35 40 45
Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Thr Met Asn Gln Ala Phe Arg
50 55 60
Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val Arg Asp
65 70 75 80
Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu Ser
85 90 95
Ser

<210> 5

<211> 98
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 5
Met Ala Thr Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala
1 5 10 15
Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg
20 25 30
Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met
35 40 45
Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Ala Gln Met Asn Gln Ala Phe
50 55 60
Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val Arg
65 70 75 80
Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu
85 90 95
Ser Ser
<210> 6
<211> 98
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 6
Met Thr Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala
1 5 10 15
Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg
20 25 30
Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met
35 40 45
Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Thr Gln Met Asn Gln Ala Phe
50 55 60
Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val Arg
65 70 75 80

Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu
85 90 95
Ser Ser
<210> 7
<211> 144
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 7
Met Ser Tyr Met Ile Ala Thr Pro Ala Ala Leu Thr Ala Ala Ala Thr
1 5 10 15
Asp Ile Asp Gly Ile Gly Ser Ala Val Ser Val Ala Asn Ala Ala Ala
20 25 30
Val Ala Ala Thr Thr Gly Val Leu Ala Ala Gly Gly Asp Glu Val Leu
35 40 45
Ala Ala Ile Ala Arg Leu Phe Asn Ala Asn Ala Glu Glu Tyr His Ala
50 55 60
Leu Ser Ala Gln Val Ala Ala Phe Gln Thr Leu Phe Val Arg Thr Leu
65 70 75 80
Thr Gly Gly Cys Gly Val Phe Arg Arg Arg Arg Gly Arg Gln Cys Val
85 90 95
Thr Ala Ala Glu His Arg Ala Ala Gly Ala Gly Arg Arg Gln Arg Arg
100 105 110
Arg Arg Ser Gly Asp Gly Gln Trp Arg Leu Arg Gln Gln Arg His Phe
115 120 125
Gly Cys Gly Gly Gln Pro Glu Phe Arg Gln His Ser Glu His Arg Arg
130 135 140
<210> 8
<211> 694
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 8
Val Ser Leu Val Ile Ala Thr Pro Gln Leu Leu Ala Thr Ala Ala Leu

1 5 10 15
Asp Leu Ala Ser Ile Gly Ser Gln Val Ser Ala Ala Asn Ala Ala Ala
20 25 30
Ala Met Pro Thr Thr Glu Val Val Ala Ala Ala Ala Asp Glu Val Ser
35 40 45
Ala Ala Ile Ala Gly Leu Phe Gly Ala His Ala Arg Gln Tyr Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Val Gln Val Ala Ala Phe His Glu Gln Phe Val Gln Ala Leu
65 70 75 80
Thr Ala Ala Ala Gly Arg Tyr Ala Ser Thr Glu Ala Ala Val Glu Arg
85 90 95
Ser Leu Leu Gly Ala Val Asn Ala Pro Thr Glu Ala Leu Leu Gly Arg
100 105 110
Pro Leu Ile Gly Asn Gly Ala Asp Gly Thr Ala Pro Gly Gln Pro Gly
115 120 125
Ala Ala Gly Gly Leu Leu Phe Gly Asn Gly Gly Asn Gly Ala Ala Gly
130 135 140
Gly Phe Gly Gln Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ala Gly Leu Ile Gly
145 150 155 160
Asn Gly Gly Asn Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Ala
165 170 175
Gly Gly Asn Gly Gly Trp Leu Trp Gly Asn Gly Gly Asn Gly Gly Val
180 185 190
Gly Gly Thr Ser Val Ala Ala Gly Ile Gly Gly Ala Gly Gly Asn Gly
195 200 205
Gly Asn Ala Gly Leu Phe Gly His Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly
210 215 220
Ala Gly Leu Ala Gly Ala Asn Gly Val Asn Pro Thr Pro Gly Pro Ala
225 230 235 240
Ala Ser Thr Gly Asp Ser Pro Ala Asp Val Ser Gly Ile Gly Asp Gln
245 250 255
Thr Gly Gly Asp Gly Gly Thr Gly Gly His Gly Thr Ala Gly Thr Pro

260 265 270

Thr Gly Gly Thr Gly Gly Asp Gly Ala Thr Ala Thr Ala Gly Ser Gly

275 280 285

Lys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Gly Asp Gly Gly Thr Ala Ala Ala Gly

290 295 300

Gly Gly Gly Gly Asn Gly Gly Asp Gly Gly Val Ala Gln Gly Asp Ile

305 310 315 320

Ala Ser Ala Phe Gly Gly Asp Gly Gly Asn Gly Ser Asp Gly Val Ala

325 330 335

Ala Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Phe Val

340 345 350

His Ile Ala Thr Ala Thr Ser Thr Gly Gly Ser Gly Gly Phe Gly Gly

355 360 365

Asn Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Gly Ala Asp Gly Gly Ala Gly Gly

370 375 380

Ala Gly Gly Asn Gly Gly Ala Gly Gly Leu Leu Phe Gly Asp Gly Gly

385 390 395 400

Asn Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ile Gly Gly Asp Gly Ala Thr

405 410 415

Gly Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Asn Ala Gly Ile Ala Arg Phe Asp

420 425 430

Ser Pro Asp Pro Glu Ala Glu Pro Asp Val Val Gly Gly Lys Gly Gly

435 440 445

Asp Gly Gly Lys Gly Gly Ser Gly Leu Gly Val Gly Gly Ala Gly Gly

450 455 460

Thr Gly Gly Ala Gly Gly Asn Gly Gly Ala Gly Gly Leu Leu Phe Gly

465 470 475 480

Asn Gly Gly Asn Gly Gly Asn Ala Gly Ala Gly Gly Asp Gly Gly Ala

485 490 495

Gly Val Ala Gly Gly Val Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ala

500 505 510

Thr Phe His Glu Asp Pro Val Ala Gly Val Trp Ala Val Gly Gly Val

515 520 525

Gly Gly Asp Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Leu Gly Val Gly Gly Val

530 535 540

Gly Gly Ala Gly Gly Val Gly Gly Lys Gly Gly Ala Ser Gly Met Leu

545 550 555 560

Ile Gly Asn Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Gly Val Gly Gly Ala Gly

565 570 575

Gly Val Gly Gly Ala Gly Gly Asp Gly Gly Asn Gly Gly Ser Gly Gly

580 585 590

Asn Ala Ser Thr Phe Gly Asp Glu Asn Ser Ile Gly Gly Ala Gly Gly

595 600 605

Thr Gly Gly Asn Gly Gly Asn Gly Ala Asn Gly Gly Asn Gly Gly Ala

610 615 620

Gly Gly Ile Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Phe Leu Ser Gly

625 630 635 640

Ala Ala Gly Val Ser Gly Ala Asp Gly Ile Gly Gly Ala Gly Gly Ala

645 650 655

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Glu Ala Gly Ala Gly

660 665 670

Gly Leu Thr Asn Gly Pro Gly Ser Pro Gly Val Ser Gly Thr Glu Gly

675 680 685

Met Ala Gly Ala Pro Gly

690

<210> 9

<211> 325

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

Met His Gln Val Asp Pro Asn Leu Thr Arg Arg Lys Gly Arg Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ile Ala Ala Met Ala Ser Ala Ser Leu Val Thr Val Ala

20 25 30

Val Pro Ala Thr Ala Asn Ala Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro
35 40 45
Thr Thr Ala Ala Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro
50 55 60
Ala Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr Pro Asn
65 70 75 80
Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro Pro Ala Asp Pro Asn
85 90 95
Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg
100 105 110
Ile Asp Asn Pro Val Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp
115 120 125
Val Glu Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu Ser
130 135 140
Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro Pro Pro Val Ala
145 150 155 160
Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala
165 170 175
Ser Ala Glu Ala Thr Asp Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp
180 185 190
Met Gly Glu Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu
195 200 205
Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr
210 215 220
Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro Asn Gly Gln Ile Trp Thr
225 230 235 240
Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro
245 250 255
Gln Arg Trp Phe Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp
260 265 270
Lys Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu Val Ala
275 280 285

Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu Pro Ala Pro Ala Pro
290 295 300
Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln
305 310 315 320
Arg Thr Leu Pro Ala
325

<210> 10
<211> 582
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 10

Met Leu Leu Ala Leu Leu Arg Gln His Ile Arg Pro Tyr Arg Arg Leu
1 5 10 15
Val Ala Met Leu Met Met Leu Gln Leu Val Ser Thr Leu Ala Ser Leu
20 25 30
Tyr Leu Pro Thr Val Asn Ala Ala Ile Val Asp Asp Gly Val Ala Lys
35 40 45
Gly Asp Thr Ala Thr Ile Val Arg Leu Gly Ala Val Met Leu Gly Val
50 55 60
Thr Gly Leu Gln Val Leu Cys Ala Ile Gly Ala Val Tyr Leu Gly Ser
65 70 75 80
Arg Thr Gly Ala Gly Phe Gly Arg Asp Leu Arg Ser Ala Met Phe Glu
85 90 95
His Ile Ile Thr Phe Ser Glu Arg Glu Thr Ala Arg Phe Gly Ala Pro
100 105 110
Thr Leu Leu Thr Arg Ser Thr Asn Asp Val Arg Gln Ile Leu Phe Leu
115 120 125
Val Gln Met Thr Ala Thr Val Leu Val Thr Ala Pro Ile Met Cys Val
130 135 140
Gly Gly Ile Ile Met Ala Ile His Gln Glu Ala Ala Leu Thr Trp Leu
145 150 155 160
Leu Leu Val Ser Val Pro Ile Leu Ala Val Ala Asn Tyr Trp Ile Ile

165 170 175

Ser His Met Leu Pro Leu Phe Arg Arg Met Gln Ser Leu Ile Asp Gly

180 185 190

Ile Asn Arg Val Met Arg Asp Gln Leu Ser Gly Val Arg Val Val Arg

195 200 205

Ala Phe Thr Arg Glu Gly Tyr Glu Arg Asp Lys Phe Ala Gln Ala Asn

210 215 220

Thr Ala Leu Ser Asn Ala Ala Leu Ser Ala Gly Asn Trp Gln Ala Leu

225 230 235 240

Met Leu Pro Val Thr Thr Leu Thr Ile Asn Ala Ser Ser Val Ala Leu

245 250 255

Ile Trp Phe Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gly Gln Met Gln Val Gly

260 265 270

Ser Leu Ile Ala Phe Leu Ser Tyr Phe Ala Gln Ile Leu Met Ala Val

275 280 285

Leu Met Ala Thr Met Thr Leu Ala Val Leu Pro Arg Ala Ser Val Cys

290 295 300

Ala Glu Arg Ile Thr Glu Val Leu Ser Thr Pro Ala Ala Leu Gly Asn

305 310 315 320

Pro Asp Asn Pro Lys Phe Pro Thr Asp Gly Val Thr Gly Val Val Arg

325 330 335

Leu Ala Gly Ala Thr Phe Thr Tyr Pro Gly Ala Asp Cys Pro Val Leu

340 345 350

Gln Asp Ile Ser Leu Thr Ala Arg Pro Gly Thr Thr Thr Ala Ile Val

355 360 365

Gly Ser Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Val Ser Leu Ile Cys Arg

370 375 380

Leu Tyr Asp Val Thr Ala Gly Ala Val Leu Val Asp Gly Ile Asp Val

385 390 395 400

Arg Glu Tyr His Thr Glu Arg Leu Trp Ser Ala Ile Gly Leu Val Pro

405 410 415

Gln Arg Ser Tyr Leu Phe Ser Gly Thr Val Ala Asp Asn Leu Arg Tyr

420 425 430

Gly Gly Gly Pro Asp Gln Val Val Thr Glu Gln Glu Met Trp Glu Ala

435 440 445

Leu Arg Val Ala Ala Ala Asp Gly Phe Val Gln Thr Asp Gly Leu Gln

450 455 460

Thr Arg Val Ala Gln Gly Gly Val Asn Phe Ser Gly Gly Gln Arg Gln

465 470 475 480

Arg Leu Ala Ile Ala Arg Ala Val Ile Arg Arg Pro Ala Ile Tyr Val

485 490 495

Phe Asp Asp Ala Phe Ser Ala Leu Asp Val His Thr Asp Ala Lys Val

500 505 510

His Ala Ser Leu Arg Gln Val Ser Gly Asp Ala Thr Ile Ile Val Val

515 520 525

Thr Gln Arg Ile Ser Asn Ala Ala Gln Ala Asp Gln Val Ile Val Val

530 535 540

Asp Asn Gly Lys Ile Val Gly Thr Gly Thr His Glu Thr Leu Leu Ala

545 550 555 560

Asp Cys Pro Thr Tyr Ala Glu Phe Ala Ala Ser Gln Ser Leu Ser Ala

565 570 575

Thr Val Gly Gly Val Gly

580

<210> 11

<211> 468

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11

Met Ser Tyr Val Ile Ala Ala Pro Glu Met Leu Ala Thr Thr Ala Ala

1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ile Gly Ser Ala Ile Arg Ala Ala Ser Ala Ser Ala

20 25 30

Ala Gly Pro Thr Thr Gly Leu Leu Ala Ala Ala Ala Asp Glu Val Ser

35 40 45

Ser Ala Ala Ala Ala Leu Phe Ser Glu Tyr Ala Arg Glu Cys Gln Glu
50 55 60
Val Leu Lys Gln Ala Ala Ala Phe His Gly Glu Phe Thr Arg Ala Leu
65 70 75 80
Ala Ala Ala Gly Ala Ala Tyr Ala Gln Ala Glu Ala Ser Asn Thr Ala
85 90 95
Ala Met Ser Gly Thr Ala Gly Ser Ser Gly Ala Leu Gly Ser Val Gly
100 105 110
Met Leu Ser Gly Asn Pro Leu Thr Ala Leu Met Met Gly Gly Thr Gly
115 120 125
Glu Pro Ile Leu Ser Asp Arg Val Leu Ala Ile Ile Asp Ser Ala Tyr
130 135 140
Ile Arg Pro Ile Phe Gly Pro Asn Asn Pro Val Ala Gln Tyr Thr Pro
145 150 155 160
Glu Gln Trp Trp Pro Phe Ile Gly Asn Leu Ser Leu Asp Gln Ser Ile
165 170 175
Ala Gln Gly Val Thr Leu Leu Asn Asn Gly Ile Asn Ala Glu Leu Gln
180 185 190
Asn Gly His Asp Val Val Val Phe Gly Tyr Ser Gln Ser Ala Ala Val
195 200 205
Ala Thr Asn Glu Ile Arg Ala Leu Met Ala Leu Pro Pro Gly Gln Ala
210 215 220
Pro Asp Pro Ser Arg Leu Ala Phe Thr Leu Ile Gly Asn Ile Asn Asn
225 230 235 240
Pro Asn Gly Gly Val Leu Glu Arg Tyr Val Gly Leu Tyr Leu Pro Phe
245 250 255
Leu Asp Met Ser Phe Asn Gly Ala Thr Pro Pro Asp Ser Pro Tyr Gln
260 265 270
Thr Tyr Met Tyr Thr Gly Gln Tyr Asp Gly Tyr Ala His Asn Pro Gln
275 280 285
Tyr Pro Leu Asn Ile Leu Ser Asp Leu Asn Ala Phe Met Gly Ile Arg
290 295 300

Trp Val His Asn Ala Tyr Pro Phe Thr Ala Ala Glu Val Ala Asn Ala
305 310 315 320
Val Pro Leu Pro Thr Ser Pro Gly Tyr Thr Gly Asn Thr His Tyr Tyr
325 330 335
Met Phe Leu Thr Gln Asp Leu Pro Leu Leu Gln Pro Ile Arg Ala Ile
340 345 350
Pro Phe Val Gly Thr Pro Ile Ala Glu Leu Ile Gln Pro Asp Leu Arg
355 360 365
Val Leu Val Asp Leu Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Ala Asp Val Pro Thr
370 375 380
Pro Ala Ser Leu Phe Ala Pro Ile Asn Pro Ile Ala Val Ala Ser Ala
385 390 395 400
Leu Ala Thr Gly Thr Val Gln Gly Pro Gln Ala Ala Leu Val Ser Ile
405 410 415
Gly Leu Leu Pro Gln Ser Ala Leu Pro Asn Thr Tyr Pro Tyr Leu Pro
420 425 430
Ser Ala Asn Pro Gly Leu Met Phe Asn Phe Gly Gln Ser Ser Val Thr
435 440 445
Glu Leu Ser Val Leu Ser Gly Ala Leu Gly Ser Val Ala Arg Leu Ile
450 455 460
Pro Pro Ile Ala
465
<210> 12
<211> 3716
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 12
Met Glu Phe Pro Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Val Leu Met Tyr
1 5 10 15
Ser Gly Ala Gly Ser Ser Pro Leu Leu Ala Ala Ala Ala Ala Trp Asp
20 25 30
Gly Leu Ala Glu Glu Leu Gly Ser Ala Ala Val Ser Phe Gly Gln Val

35 40 45

Thr Ser Gly Leu Thr Ala Gly Val Trp Gln Gly Ala Ala Ala Ala Ala

50 55 60

Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Gly Trp Leu Gly Ser Val Ala

65 70 75 80

Ala Ala Ala Glu Ala Val Ala Gly Gln Ala Arg Val Val Val Gly Val

85 90 95

Phe Glu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Val Asp Pro Ala Leu Val Ala Ala

100 105 110

Asn Arg Ala Arg Leu Val Ala Leu Ala Val Ser Asn Leu Leu Gly Gln

115 120 125

Asn Thr Pro Ala Ile Ala Ala Ala Glu Ala Glu Tyr Glu Leu Met Trp

130 135 140

Ala Ala Asp Val Ala Ala Met Ala Gly Tyr His Ser Gly Ala Ser Ala

145 150 155 160

Ala Ala Ala Ala Leu Pro Ala Phe Ser Pro Pro Ala Gln Ala Leu Gly

165 170 175

Gly Gly Val Gly Ala Phe Leu Thr Ala Leu Phe Ala Ser Pro Ala Lys

180 185 190

Ala Leu Ser Leu Asn Ala Gly Leu Gly Asn Val Gly Asn Tyr Asn Val

195 200 205

Gly Leu Gly Asn Val Gly Val Phe Asn Leu Gly Ala Gly Asn Val Gly

210 215 220

Gly Gln Asn Leu Gly Phe Gly Asn Ala Gly Gly Thr Asn Val Gly Phe

225 230 235 240

Gly Asn Leu Gly Asn Gly Asn Val Gly Phe Gly Asn Ser Gly Leu Gly

245 250 255

Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gly Asn Ile Gly Leu Gly Asn Ala Gly Ser

260 265 270

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Asn Leu Gly Val Gly Asn Ile Gly Phe Gly

275 280 285

Asn Thr Gly Thr Asn Asn Val Gly Val Gly Leu Thr Gly Asn His Leu

290 295 300

Thr Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn Ile Gly Leu Phe

305 310 315 320

Asn Ser Gly Thr Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser Gly Thr Gly Asn

325 330 335

Phe Gly Val Phe Asn Ser Gly Asn Tyr Asn Thr Gly Val Gly Asn Ala

340 345 350

Gly Thr Ala Ser Thr Gly Leu Phe Asn Ala Gly Asn Phe Asn Thr Gly

355 360 365

Val Val Asn Val Gly Ser Tyr Asn Thr Gly Ser Phe Asn Ala Gly Asp

370 375 380

Thr Asn Thr Gly Gly Phe Asn Pro Gly Gly Val Asn Thr Gly Trp Leu

385 390 395 400

Asn Thr Gly Asn Thr Asn Thr Gly Ile Ala Asn Ser Gly Asn Val Asn

405 410 415

Thr Gly Ala Phe Ile Ser Gly Asn Phe Asn Asn Gly Val Leu Trp Val

420 425 430

Gly Asp Tyr Gln Gly Leu Phe Gly Val Ser Ala Gly Ser Ser Ile Pro

435 440 445

Ala Ile Pro Ile Gly Leu Val Leu Asn Gly Asp Ile Gly Pro Ile Thr

450 455 460

Ile Gln Pro Ile Pro Ile Leu Pro Thr Ile Pro Leu Ser Ile His Gln

465 470 475 480

Thr Val Asn Leu Gly Pro Leu Val Val Pro Asp Ile Val Ile Pro Ala

485 490 495

Phe Gly Gly Gly Ile Gly Ile Pro Ile Asn Ile Gly Pro Leu Thr Ile

500 505 510

Thr Pro Ile Thr Leu Phe Ala Gln Gln Thr Phe Val Asn Gln Leu Pro

515 520 525

Phe Pro Thr Phe Ser Leu Gly Lys Ile Thr Ile Pro Gln Ile Gln Thr

530 535 540

Phe Asp Ser Asn Gly Gln Leu Val Ser Phe Ile Gly Pro Ile Val Ile

545 550 555 560
Asp Thr Thr Ile Pro Gly Pro Thr Asn Pro Gln Ile Asp Leu Thr Ile
565 570 575
Arg Trp Asp Thr Pro Pro Ile Thr Leu Phe Pro Asn Gly Ile Ser Ala
580 585 590
Pro Asp Asn Pro Leu Gly Leu Leu Val Ser Val Ser Ile Ser Asn Pro
595 600 605
Gly Phe Thr Ile Pro Gly Phe Ser Val Pro Ala Gln Pro Leu Pro Leu
610 615 620
Ser Ile Asp Ile Glu Gly Gln Ile Asp Gly Phe Ser Thr Pro Pro Ile
625 630 635 640
Thr Ile Asp Arg Ile Pro Leu Thr Val Gly Gly Gly Val Thr Ile Gly
645 650 655
Pro Ile Thr Ile Gln Gly Leu His Ile Pro Ala Ala Pro Gly Val Gly
660 665 670
Asn Thr Thr Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly
675 680 685
Gly Val Ser Gly Phe Gly Asn Val Gly Ala Gly Ser Ser Gly Trp Trp
690 695 700
Asn Gln Ala Pro Ser Ala Leu Leu Gly Ala Gly Ser Gly Val Gly Asn
705 710 715 720
Val Gly Thr Leu Gly Ser Gly Val Leu Asn Leu Gly Ser Gly Ile Ser
725 730 735
Gly Phe Tyr Asn Thr Ser Val Leu Pro Phe Gly Thr Pro Ala Ala Val
740 745 750
Ser Gly Ile Gly Asn Leu Gly Gln Gln Leu Ser Gly Val Ser Ala Ala
755 760 765
Gly Thr Thr Leu Arg Ser Met Leu Ala Gly Asn Leu Gly Leu Ala Asn
770 775 780
Val Gly Asn Phe Asn Thr Gly Phe Gly Asn Val Gly Asp Val Asn Leu
785 790 795 800
Gly Ala Ala Asn Ile Gly Gly His Asn Leu Gly Leu Gly Asn Val Gly

805 810 815

Asp Gly Asn Leu Gly Leu Gly Asn Ile Gly His Gly Asn Leu Gly Phe

820 825 830

Ala Asn Leu Gly Leu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Val Gly Asn Val Gly

835 840 845

Phe Gly Asn Ala Gly Ile Asn Asn Tyr Gly Leu Ala Asn Met Gly Val

850 855 860

Gly Asn Ile Gly Phe Ala Asn Thr Gly Thr Gly Asn Ile Gly Ile Gly

865 870 875 880

Leu Val Gly Asp His Arg Thr Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Ile

885 890 895

Gly Asn Ile Gly Leu Phe Asn Ser Gly Thr Gly Asn Val Gly Phe Phe

900 905 910

Asn Ser Gly Thr Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Arg Phe Asn

915 920 925

Thr Gly Ile Gly Asn Ser Gly Thr Ala Ser Thr Gly Leu Phe Asn Ala

930 935 940

Gly Ser Phe Ser Thr Gly Ile Ala Asn Thr Gly Asp Tyr Asn Thr Gly

945 950 955 960

Ser Phe Asn Ala Gly Asp Thr Asn Thr Gly Gly Phe Asn Pro Gly Gly

965 970 975

Ile Asn Thr Gly Trp Phe Asn Thr Gly His Ala Asn Thr Gly Leu Ala

980 985 990

Asn Ala Gly Thr Phe Gly Thr Gly Ala Phe Met Thr Gly Asp Tyr Ser

995 1000 1005

Asn Gly Leu Leu Trp Arg Gly Gly Tyr Glu Gly Leu Val Gly Val

1010 1015 1020

Arg Val Gly Pro Thr Ile Ser Gln Phe Pro Val Thr Val His Ala

1025 1030 1035

Ile Gly Gly Val Gly Pro Leu His Val Ala Pro Val Pro Val Pro

1040 1045 1050

Ala Val His Val Glu Ile Thr Asp Ala Thr Val Gly Leu Gly Pro

1055 1060 1065
Phe Thr Val Pro Pro Ile Ser Ile Pro Ser Leu Pro Ile Ala Ser
1070 1075 1080
Ile Thr Gly Ser Val Asp Leu Ala Ala Asn Thr Ile Ser Pro Ile
1085 1090 1095
Arg Ala Leu Asp Pro Leu Ala Gly Ser Ile Gly Leu Phe Leu Glu
1100 1105 1110
Pro Phe Arg Leu Ser Asp Pro Phe Ile Thr Ile Asp Ala Phe Gln
1115 1120 1125
Val Val Ala Gly Val Leu Phe Leu Glu Asn Ile Ile Val Pro Gly
1130 1135 1140
Leu Thr Val Ser Gly Gln Ile Leu Val Thr Pro Thr Pro Ile Pro
1145 1150 1155
Leu Thr Leu Asn Leu Asp Thr Thr Pro Trp Thr Leu Phe Pro Asn
1160 1165 1170
Gly Phe Thr Ile Pro Ala Gln Thr Pro Val Thr Val Gly Met Glu
1175 1180 1185
Val Ala Asn Asp Gly Phe Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Thr Phe
1190 1195 1200
Pro Arg Ala Ser Ala Gly Val Thr Gly Leu Ser Val Gly Leu Asp
1205 1210 1215
Ala Phe Thr Leu Leu Pro Asp Gly Phe Thr Leu Asp Thr Val Pro
1220 1225 1230
Ala Thr Phe Asp Gly Thr Ile Leu Ile Gly Asp Ile Pro Ile Pro
1235 1240 1245
Ile Ile Asp Val Pro Ala Val Pro Gly Phe Gly Asn Thr Thr Thr
1250 1255 1260
Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1265 1270 1275
Gly Phe Ala Asn Val Gly Ala Gly Thr Ser Gly Trp Trp Asn Gln
1280 1285 1290
Gly His Asp Val Leu Ala Gly Ala Gly Ser Gly Val Ala Asn Ala

1295 1300 1305

Gly Thr Leu Ser Ser Gly Val Leu Asn Val Gly Ser Gly Ile Ser

1310 1315 1320

Gly Trp Tyr Asn Thr Ser Thr Leu Gly Ala Gly Thr Pro Ala Val

1325 1330 1335

Val Ser Gly Ile Gly Asn Leu Gly Gln Gln Leu Ser Gly Phe Leu

1340 1345 1350

Ala Asn Gly Thr Val Leu Asn Arg Ser Pro Ile Val Asn Ile Gly

1355 1360 1365

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

1370 1375 1380

Asp Leu Asn Trp Gly Ala Ala Asn Ile Gly Ala Gln Asn Leu Gly

1385 1390 1395

Leu Gly Asn Leu Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Gly Asn Ile Gly

1400 1405 1410

Ala Gly Asn Val Gly Phe Ala Asn Ser Gly Pro Ala Val Gly Leu

1415 1420 1425

Ala Gly Leu Gly Asn Val Gly Leu Ser Asn Ala Gly Ser Asn Asn

1430 1435 1440

Trp Gly Leu Ala Asn Leu Gly Val Gly Asn Ile Gly Leu Ala Asn

1445 1450 1455

Thr Gly Thr Gly Asn Ile Gly Ile Gly Leu Val Gly Asp Tyr Gln

1460 1465 1470

Thr Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Ser Gly Asn Ile Gly Leu

1475 1480 1485

Phe Asn Ser Gly Thr Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Thr Gly Thr

1490 1495 1500

Gly Asn Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Phe Asn Thr Gly Ile

1505 1510 1515

Gly Asn Ser Gly Thr Gly Ser Thr Gly Leu Phe Asn Ala Gly Asn

1520 1525 1530

Phe Asn Thr Gly Ile Ala Asn Pro Gly Ser Tyr Asn Thr Gly Ser

1535 1540 1545

Phe Asn Val Gly Asp Thr Asn Thr Gly Gly Phe Asn Pro Gly Asp

1550 1555 1560

Ile Asn Thr Gly Trp Phe Asn Thr Gly Ile Met Asn Thr Gly Thr

1565 1570 1575

Arg Asn Thr Gly Ala Leu Met Ser Gly Thr Asp Ser Asn Gly Met

1580 1585 1590

Leu Trp Arg Gly Asp His Glu Gly Leu Phe Gly Leu Ser Tyr Gly

1595 1600 1605

Ile Thr Ile Pro Gln Phe Pro Ile Arg Ile Thr Thr Thr Gly Gly

1610 1615 1620

Ile Gly Pro Ile Val Ile Pro Asp Thr Thr Ile Leu Pro Pro Leu

1625 1630 1635

His Leu Gln Ile Thr Gly Asp Ala Asp Tyr Ser Phe Thr Val Pro

1640 1645 1650

Asp Ile Pro Ile Pro Ala Ile His Ile Gly Ile Asn Gly Val Val

1655 1660 1665

Thr Val Gly Phe Thr Ala Pro Glu Ala Thr Leu Leu Ser Ala Leu

1670 1675 1680

Lys Asn Asn Gly Ser Phe Ile Ser Phe Gly Pro Ile Thr Leu Ser

1685 1690 1695

Asn Ile Asp Ile Pro Pro Met Asp Phe Thr Leu Gly Leu Pro Val

1700 1705 1710

Leu Gly Pro Ile Thr Gly Gln Leu Gly Pro Ile His Leu Glu Pro

1715 1720 1725

Ile Val Val Ala Gly Ile Gly Val Pro Leu Glu Ile Glu Pro Ile

1730 1735 1740

Pro Leu Asp Ala Ile Ser Leu Ser Glu Ser Ile Pro Ile Arg Ile

1745 1750 1755

Pro Val Asp Ile Pro Ala Ser Val Ile Asp Gly Ile Ser Met Ser

1760 1765 1770

Glu Val Val Pro Ile Asp Ala Ser Val Asp Ile Pro Ala Val Thr

1775 1780 1785
Ile Thr Gly Thr Thr Ile Ser Ala Ile Pro Leu Gly Phe Asp Ile
1790 1795 1800
Arg Thr Ser Ala Gly Pro Leu Asn Ile Pro Ile Ile Asp Ile Pro
1805 1810 1815
Ala Ala Pro Gly Phe Gly Asn Ser Thr Gln Met Pro Ser Ser Gly
1820 1825 1830
Phe Phe Asn Thr Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gly Ile Gly Asn Leu
1835 1840 1845
Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Leu Asn Gln Ala Gly Ala Gly Ser
1850 1855 1860
Leu Val Gly Thr Leu Ser Gly Leu Gly Asn Ala Gly Thr Leu Ala
1865 1870 1875
Ser Gly Val Leu Asn Ser Gly Thr Ala Ile Ser Gly Leu Phe Asn
1880 1885 1890
Val Ser Thr Leu Asp Ala Thr Thr Pro Ala Val Ile Ser Gly Phe
1895 1900 1905
Ser Asn Leu Gly Asp His Met Ser Gly Val Ser Ile Asp Gly Leu
1910 1915 1920
Ile Ala Ile Leu Thr Phe Pro Pro Ala Glu Ser Val Phe Asp Gln
1925 1930 1935
Ile Ile Asp Ala Ala Ile Ala Glu Leu Gln His Leu Asp Ile Gly
1940 1945 1950
Asn Ala Leu Ala Leu Gly Asn Val Gly Gly Val Asn Leu Gly Leu
1955 1960 1965
Ala Asn Val Gly Glu Phe Asn Leu Gly Ala Gly Asn Val Gly Asn
1970 1975 1980
Ile Asn Val Gly Ala Gly Asn Leu Gly Gly Ser Asn Leu Gly Leu
1985 1990 1995
Gly Asn Val Gly Thr Gly Asn Leu Gly Phe Gly Asn Ile Gly Ala
2000 2005 2010
Gly Asn Phe Gly Phe Gly Asn Ala Gly Leu Thr Ala Gly Ala Gly

2015 2020 2025

Gly Leu Gly Asn Val Gly Leu Gly Asn Ala Gly Ser Gly Ser Trp

2030 2035 2040

Gly Leu Ala Asn Val Gly Val Gly Asn Ile Gly Leu Ala Asn Thr

2045 2050 2055

Gly Thr Gly Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr Gly Asp Tyr Arg Thr

2060 2065 2070

Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn Leu Gly Leu Phe

2075 2080 2085

Asn Ser Gly Thr Gly Asn Ile Gly Phe Phe Asn Thr Gly Thr Gly

2090 2095 2100

Asn Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Tyr Ser Thr Gly Val Gly

2105 2110 2115

Asn Ala Gly Thr Ala Ser Thr Gly Leu Phe Asn Ala Gly Asn Phe

2120 2125 2130

Asn Thr Gly Leu Ala Asn Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Gly Ser Leu

2135 2140 2145

Asn Val Gly Ser Phe Asn Thr Gly Gly Val Asn Pro Gly Thr Val

2150 2155 2160

Asn Thr Gly Trp Phe Asn Thr Gly His Thr Asn Thr Gly Leu Phe

2165 2170 2175

Asn Thr Gly Asn Val Asn Thr Gly Ala Phe Asn Ser Gly Ser Phe

2180 2185 2190

Asn Asn Gly Ala Leu Trp Thr Gly Asp Tyr His Gly Leu Val Gly

2195 2200 2205

Phe Ser Phe Ser Ile Asp Ile Ala Gly Ser Thr Leu Leu Asp Leu

2210 2215 2220

Asn Glu Thr Leu Asn Leu Gly Pro Ile His Ile Glu Gln Ile Asp

2225 2230 2235

Ile Pro Gly Met Ser Leu Phe Asp Val His Glu Ile Val Glu Ile

2240 2245 2250

Gly Pro Phe Thr Ile Pro Gln Val Asp Val Pro Ala Ile Pro Leu

2255 2260 2265

Glu Ile His Glu Ser Ile His Met Asp Pro Ile Val Leu Val Pro

2270 2275 2280

Ala Thr Thr Ile Pro Ala Gln Thr Arg Thr Ile Pro Leu Asp Ile

2285 2290 2295

Pro Ala Ser Pro Gly Ser Thr Met Thr Leu Pro Leu Ile Ser Met

2300 2305 2310

Arg Phe Glu Gly Glu Asp Trp Ile Leu Gly Ser Thr Ala Ala Ile

2315 2320 2325

Pro Asn Phe Gly Asp Pro Phe Pro Ala Pro Thr Gln Gly Ile Thr

2330 2335 2340

Ile His Thr Gly Pro Gly Pro Gly Thr Thr Gly Glu Leu Lys Ile

2345 2350 2355

Ser Ile Pro Gly Phe Glu Ile Pro Gln Ile Ala Thr Thr Arg Phe

2360 2365 2370

Leu Leu Asp Val Asn Ile Ser Gly Gly Leu Pro Ala Phe Thr Leu

2375 2380 2385

Phe Ala Gly Gly Leu Thr Ile Pro Thr Asn Ala Ile Pro Leu Thr

2390 2395 2400

Ile Asp Ala Ser Gly Ala Leu Asp Pro Ile Thr Ile Phe Pro Gly

2405 2410 2415

Gly Tyr Thr Ile Asp Pro Leu Pro Leu His Leu Ala Leu Asn Leu

2420 2425 2430

Thr Val Pro Asp Ser Ser Ile Pro Ile Ile Asp Val Pro Pro Thr

2435 2440 2445

Pro Gly Phe Gly Asn Thr Thr Ala Thr Pro Ser Ser Gly Phe Phe

2450 2455 2460

Asn Ser Gly Ala Gly Gly Val Ser Gly Phe Gly Asn Val Gly Ser

2465 2470 2475

Asn Leu Ser Gly Trp Trp Asn Gln Ala Ala Ser Ala Leu Ala Gly

2480 2485 2490

Ser Gly Ser Gly Val Leu Asn Val Gly Thr Leu Gly Ser Gly Val

2495 2500 2505

Leu Asn Val Gly Ser Gly Val Ser Gly Ile Tyr Asn Thr Ser Val

2510 2515 2520

Leu Pro Leu Gly Thr Pro Ala Val Leu Ser Gly Leu Gly Asn Val

2525 2530 2535

Gly His Gln Leu Ser Gly Val Ser Ala Ala Gly Thr Ala Leu Asn

2540 2545 2550

Gln Ile Pro Ile Leu Asn Ile Gly Leu Ala Asp Val Gly Asn Phe

2555 2560 2565

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

2570 2575 2580

Asn Leu Gly Ala Gln Asn Leu Gly Leu Gly Asn Val Gly Thr Gly

2585 2590 2595

Asn Leu Gly Phe Ala Asn Val Gly His Gly Asn Ile Gly Phe Gly

2600 2605 2610

Asn Ser Gly Leu Thr Ala Gly Ala Ala Gly Leu Gly Asn Thr Gly

2615 2620 2625

Phe Gly Asn Ala Gly Ser Ala Asn Tyr Gly Phe Ala Asn Gln Gly

2630 2635 2640

Val Arg Asn Ile Gly Leu Ala Asn Thr Gly Thr Gly Asn Ile Gly

2645 2650 2655

Ile Gly Leu Val Gly Asp Asn Leu Thr Gly Ile Gly Gly Leu Asn

2660 2665 2670

Ser Gly Ala Gly Asn Ile Gly Leu Phe Asn Ser Gly Thr Gly Asn

2675 2680 2685

Ile Gly Phe Phe Asn Ser Gly Thr Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn

2690 2695 2700

Ser Gly Ser Phe Asn Thr Gly Ile Gly Asn Ser Gly Thr Gly Ser

2705 2710 2715

Thr Gly Leu Phe Asn Ala Gly Ser Phe Asn Thr Gly Val Ala Asn

2720 2725 2730

Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Gly Ser Phe Asn Ala Gly Asp Thr Asn

2735 2740 2745
Thr Gly Gly Phe Asn Pro Gly Thr Ile Asn Thr Gly Trp Phe Asn
2750 2755 2760
Thr Gly His Thr Asn Thr Gly Ile Ala Asn Ser Gly Asn Val Gly
2765 2770 2775
Thr Gly Ala Phe Met Ser Gly Asn Phe Ser Asn Gly Leu Leu Trp
2780 2785 2790
Arg Gly Asp His Glu Gly Leu Phe Ser Leu Phe Tyr Ser Leu Asp
2795 2800 2805
Val Pro Arg Ile Thr Ile Val Asp Ala His Leu Asp Gly Gly Phe
2810 2815 2820
Gly Pro Val Val Leu Pro Pro Ile Pro Val Pro Ala Val Asn Ala
2825 2830 2835
His Leu Thr Gly Asn Val Ala Met Gly Ala Phe Thr Ile Pro Gln
2840 2845 2850
Ile Asp Ile Pro Ala Leu Thr Pro Asn Ile Thr Gly Ser Ala Ala
2855 2860 2865
Phe Arg Ile Val Val Gly Ser Val Arg Ile Pro Pro Val Ser Val
2870 2875 2880
Ile Val Glu Gln Ile Ile Asn Ala Ser Val Gly Ala Glu Met Arg
2885 2890 2895
Ile Asp Pro Phe Glu Met Trp Thr Gln Gly Thr Asn Gly Leu Gly
2900 2905 2910
Ile Thr Phe Tyr Ser Phe Gly Ser Ala Asp Gly Ser Pro Tyr Ala
2915 2920 2925
Thr Gly Pro Leu Val Phe Gly Ala Gly Thr Ser Asp Gly Ser His
2930 2935 2940
Leu Thr Ile Ser Ala Ser Ser Gly Ala Phe Thr Thr Pro Gln Leu
2945 2950 2955
Glu Thr Gly Pro Ile Thr Leu Gly Phe Gln Val Pro Gly Ser Val
2960 2965 2970
Asn Ala Ile Thr Leu Phe Pro Gly Gly Leu Thr Phe Pro Ala Thr

2975 2980 2985
Ser Leu Leu Asn Leu Asp Val Thr Ala Gly Ala Gly Gly Val Asp
2990 2995 3000
Ile Pro Ala Ile Thr Trp Pro Glu Ile Ala Ala Ser Ala Asp Gly
3005 3010 3015
Ser Val Tyr Val Leu Ala Ser Ser Ile Pro Leu Ile Asn Ile Pro
3020 3025 3030
Pro Thr Pro Gly Ile Gly Asn Ser Thr Ile Thr Pro Ser Ser Gly
3035 3040 3045
Phe Phe Asn Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gly Phe Gly Asn Phe
3050 3055 3060
Gly Ala Gly Thr Ser Gly Trp Trp Asn Gln Ala His Thr Ala Leu
3065 3070 3075
Ala Gly Ala Gly Ser Gly Phe Ala Asn Val Gly Thr Leu His Ser
3080 3085 3090
Gly Val Leu Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Ile Tyr Asn Thr
3095 3100 3105
Ser Thr Leu Gly Val Gly Thr Pro Ala Leu Val Ser Gly Leu Gly
3110 3115 3120
Asn Val Gly His Gln Leu Ser Gly Leu Leu Ser Gly Gly Ser Ala
3125 3130 3135
Val Asn Pro Val Thr Val Leu Asn Ile Gly Leu Ala Asn Val Gly
3140 3145 3150
Ser His Asn Ala Gly Phe Gly Asn Val Gly Glu Val Asn Leu Gly
3155 3160 3165
Ala Ala Asn Leu Gly Ala His Asn Leu Gly Phe Gly Asn Ile Gly
3170 3175 3180
Ala Gly Asn Leu Gly Phe Gly Asn Ile Gly His Gly Asn Val Gly
3185 3190 3195
Val Gly Asn Ser Gly Leu Thr Ala Gly Val Pro Gly Leu Gly Asn
3200 3205 3210
Val Gly Leu Gly Asn Ala Gly Gly Asn Asn Trp Gly Leu Ala Asn

3215 3220 3225
Val Gly Val Gly Asn Ile Gly Leu Ala Asn Thr Gly Thr Gly Asn
3230 3235 3240
Ile Gly Ile Gly Leu Thr Gly Asp Tyr Gln Thr Gly Ile Gly Gly
3245 3250 3255
Leu Asn Ser Gly Ala Gly Asn Leu Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ala
3260 3265 3270
Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Thr Gly Thr Gly Asn Phe Gly Leu
3275 3280 3285
Phe Asn Ser Gly Ser Phe Asn Thr Gly Val Gly Asn Ser Gly Thr
3290 3295 3300
Gly Ser Thr Gly Leu Phe Asn Ala Gly Ser Phe Asn Thr Gly Val
3305 3310 3315
Ala Asn Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Gly Ser Phe Asn Val Gly Asp
3320 3325 3330
Thr Asn Thr Gly Gly Phe Asn Pro Gly Ser Ile Asn Thr Gly Trp
3335 3340 3345
Leu Asn Ala Gly Asn Ala Asn Thr Gly Val Ala Asn Ala Gly Asn
3350 3355 3360
Val Asn Thr Gly Ala Phe Val Thr Gly Asn Phe Ser Asn Gly Ile
3365 3370 3375
Leu Trp Arg Gly Asp Tyr Gln Gly Leu Ala Gly Phe Ala Val Gly
3380 3385 3390
Tyr Thr Leu Pro Leu Phe Pro Ala Val Gly Ala Asp Val Ser Gly
3395 3400 3405
Gly Ile Gly Pro Ile Thr Val Leu Pro Pro Ile His Ile Pro Pro
3410 3415 3420
Ile Pro Val Gly Phe Ala Ala Val Gly Gly Ile Gly Pro Ile Ala
3425 3430 3435
Ile Pro Asp Ile Ser Val Pro Ser Ile His Leu Gly Leu Asp Pro
3440 3445 3450
Ala Val His Val Gly Ser Ile Thr Val Asn Pro Ile Thr Val Arg

3455 3460 3465
Thr Pro Pro Val Leu Val Ser Tyr Ser Gln Gly Ala Val Thr Ser
3470 3475 3480
Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Ile Trp Val Lys Pro Ser Phe Phe
3485 3490 3495
Pro Gly Ile Arg Ile Ala Pro Ser Ser Gly Gly Gly Ala Thr Ser
3500 3505 3510
Thr Gln Gly Ala Tyr Phe Val Gly Pro Ile Ser Ile Pro Ser Gly
3515 3520 3525
Thr Val Thr Phe Pro Gly Phe Thr Ile Pro Leu Asp Pro Ile Asp
3530 3535 3540
Ile Gly Leu Pro Val Ser Leu Thr Ile Pro Gly Phe Thr Ile Pro
3545 3550 3555
Gly Gly Thr Leu Ile Pro Thr Leu Pro Leu Gly Leu Ala Leu Ser
3560 3565 3570
Asn Gly Ile Pro Pro Val Asp Ile Pro Ala Ile Val Leu Asp Arg
3575 3580 3585
Ile Leu Leu Asp Leu His Ala Asp Thr Thr Ile Gly Pro Ile Asn
3590 3595 3600
Val Pro Ile Ala Gly Phe Gly Gly Ala Pro Gly Phe Gly Asn Ser
3605 3610 3615
Thr Thr Leu Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Thr Gly Ala Gly Gly
3620 3625 3630
Gly Ser Gly Phe Ser Asn Thr Gly Ala Gly Met Ser Gly Leu Leu
3635 3640 3645
Asn Ala Met Ser Asp Pro Leu Leu Gly Ser Ala Ser Gly Phe Ala
3650 3655 3660
Asn Phe Gly Thr Gln Leu Ser Gly Ile Leu Asn Arg Gly Ala Gly
3665 3670 3675
Ile Ser Gly Val Tyr Asn Thr Gly Ala Leu Gly Val Val Thr Ala
3680 3685 3690
Ala Val Val Ser Gly Phe Gly Asn Val Gly Gln Gln Leu Ser Gly

3695 3700 3705

Leu Leu Phe Thr Gly Val Gly Pro

3710 3715

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 13

Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg Met Trp

1 5 10

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 14

Val Ser Ala Ala Ile Ala Gly Leu Phe

1 5

<210> 15

<211> 297

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 15

atggcctcgc gttttatgac ggatccgcac gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag 60

gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatc 120

tcgggcgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat gacccagatg 180

aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc 240

gacgccaaca actacgaaca gcaagagcag gcctcccagc agatcctcag cagctga 297

<210> 16

<211> 297

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 16

atggcctcac gttttatgac ggatccgcac gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag 60
gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatt 120
tccggtgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat ggcccagatg 180
aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc 240
gacgccaaca actacgagca gcaagagcag gcctcccagc agatcctcag cagctaa 297

<210> 17
<211> 297
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 17

atggcctcac gttttatgac ggatccgcat gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag 60
gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatt 120
tccggtgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat gacctagatg 180
aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc 240
gacgccaaca actacgaaca gcaagagcag gcctcccagc agatcctgag cagctag 297

<210> 18
<211> 297
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 18

atggcaacac gttttatgac ggatccgcac gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag 60
gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatc 120
tcgggcgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat ggcccagatg 180
aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc 240
gacgccaaca actacgagca gcaagagcag gcctcccagc agatcctcag cagctaa 297

<210> 19
<211> 297
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 19

atgacctcgc gttttatgac ggatccgcac gcgatgcggg acatggcggg ccgttttgag
60

gtgcacgccc agacggtgga ggacgaggct cgccggatgt gggcgtccgc gcaaaacatt 120
tccggcgcgg gctggagtgg catggccgag gcgacctcgc tagacaccat gacccagatg 180
aatcaggcgt ttcgcaacat cgtgaacatg ctgcacgggg tgcgtgacgg gctggttcgc 240
gacgccaaca actacgaaca gcaagagcag gcctcccagc agatcctcag cagctga 297

<210> 20
<211> 435
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 20

atgtcataca tgattgccac accagcggcg ttgacggcgg cggcaacgga tatcgacggg 60
attggctcgg cggttagcgt tgcgaacgcc gcggcggtcg ccgcgacaac cggagtgctg 120
gccgccggtg gcgatgaagt gttggcggcc atcgctaggc tgttcaacgc aaacgccgag 180
gaatatcacg ccctcagcgc gcaggtggcg gcgtttcaaa ccctgtttgt gcgcaccttg 240
actgggggt gcggagtctt tcgccggcgc cgaggccgcc aatgcgtcac agctgcagag 300
catcgcgcgg caggtgcggg gcgccgtcaa cgccgtcgcc ggtcaggtga cgggcaatgg 360
cggctccggc aacagcggca cttcggctgc ggcggccaac ccgaattccg acaacacagc 420
gagcatcgcc gatag 435

<210> 21
<211> 2085
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 21

gtgtcgttgg tgatcgcgac gccgcagctg ctggcaactg cggctttgga tttagcgagt 60
attggttcgc aggtgagcgc ggctaatgcg gccgcggcga tgccgacgac ggaagtggtg 120
gctgcggctg ccgatgaagt gtcggcggcg attgcggggt tgttcggggc ccatgctcgg 180
cagtatcagg cgctcagcgt acaggtggca gcgtttcacg agcagtttgt gcaggcgttg 240
actgcggccg cgggtcggta tgccagcact gaggccgctg ttgagcggag tctgctgggt 300
gcggtgaatg cgcccaccga ggcgcttttg gggcgcccgt tgatcggaaa cggcgccgac 360
gggacggcac ccgggcagcc tggcgcggcc ggcgggttgc tgtttggcaa cggtggcaac 420
ggcgcggctg gcgggttcgg tcaaaccggc ggcagcggag gcgcggccgg gttgatcggc 480
aacggcggca acggcggggc cggtggtacc ggcgcggccg gcggtgccgg tgggaacggg 540
gggtggttgt ggggcaacgg cggcaacggc ggtgtcggcg gcaccagcgt ggccgcaggc 600

atcgggggtg cgggcggtaa cggcggcaac gccgggctgt tcggccatgg cggcgccggt 660
ggtaccggcg gcgccggcct cgccggggca aacggggtca atcccacgcc cggccccgcg 720
gccagcaccg gggacagccc ggcagatgtg tccggcatcg gtgatcaaac cggcggcgac 780
ggcggcacgg gcggccatgg cactgccggc acgccgaccg gtggcaccgg cggcgacggt 840
gccaccgcga cggcaggctc gggcaaggcc accggcggtg ccggtggtga cggcggtacc 900
gccgctgccg gtggcggcgg cggcaacggc ggcgacggcg gagtcgcgca gggcgacatt 960
gcgagcgcct ttggcggtga tggtggcaac gggtccgacg gtgtagccgc cggcagtggg 1020
ggtggtagcg gcggcgccgg aggcggcgct ttcgtacaca tcgccactgc cacctctacc 1080
ggtggtagcg gcggtttcgg tggtaacggg gctgccagtg ccgcctccgg cgccgacggt 1140
ggcgcagggg gagctggcgg caatggtggc gccggcgggt tgctattcgg tgatggcggc 1200
aacggtggcg ccggtggcgc gggtggtatc ggtggtgacg gcgccacggg ggggcccggg 1260
ggaagcggcg gcaacgctgg catcgcgagg tttgacagcc cagaccccga ggcagaaccc 1320
gatgtggtcg gcggcaaggg tggtgatggc ggcaagggcg gcagcggcct tggcgtcggc 1380
ggcgccggcg ggaccggcgg cgcgggcggc aacggcggcg ccggcgggtt gttgttcggc 1440
aacggcggca acggcggcaa cgccggggcc ggcggggatg gcggcgccgg cgttgccggt 1500
ggggttggcg gtaacggcgg cggtggtggc accgcgacgt ttcacgaaga cccggtcgct 1560
ggtgtctggg cggtcggtgg cgtaggtggt gatggtggct ccggcggcag ctcgcttggt 1620
gtcggcgggg tgggcggagc cggtggcgtg ggtggcaagg gtggcgccag cggcatgttg 1680
atcggcaacg gcggcaacgg tggcagcggc ggagtcggtg gggccggtgg agtcggcggg 1740
gctggcggtg acggcggcaa cggcggctcc ggtggcaacg ccagtacttt tggcgatgag 1800
aactccatcg gcggggccgg cgggacgggc ggcaacgggg gcaacggcgc aaacggcggt 1860
aacggtggcg ctggcggtat tgccggcggt gcgggtgggt ccggagggtt cctcagcggt 1920
gccgcaggag tcagcggcgc tgacggtatc ggtggcgcgg gcggcgcagg cggtgccggt 1980
ggcgcgggcg gtagcggcgg tgaggcaggc gcgggggccc tcaccaacgg ccccgggtcc 2040
cctggcgttt ccggcaccga aggcatggcc ggcgcgcccg gctag 2085

<210> 22
<211> 978
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 22

atgcatcagg tggaccccaa cttgacacgt cgcaagggac gattggcggc actggctatc 60
gcggcgatgg ccagcgccag cctggtgacc gttgcggtgc ccgcgaccgc caacgccgat 120

ccggagccag cgcccccggt acccacaacg gccgcctcgc cgccgtcgac cgctgcagcg 180
ccacccgcac cggcgacacc tgttgccccc ccaccaccgg ccgccgccaa cacgccgaat 240
gcccagccgg gcgatcccaa cgcagcacct ccgccggccg acccgaacgc accgccgcca 300
cctgtcattg ccccaaacgc accccaacct gtccggatcg acaacccggt tggaggattc 360
agcttcgcgc tgcctgctgg ctgggtggag tctgacgccg cccacttcga ctacggttca 420
gcactcctca gcaaaaccac cggggacccg ccatttcccg gacagccgcc gccggtggcc 480
aatgacaccc gtatcgtgct cggccggcta gaccaaaagc tttacgccag cgccgaagcc 540
accgactcca aggccgcggc ccggttgggc tcggacatgg gtgagttcta tatgccctac 600
ccgggcaccc ggatcaacca ggaaaccgtc tcgctcgacg ccaacggggt gtctggaagc 660
gcgtcgtatt acgaagtcaa gttcagcgat ccgagtaagc cgaacggcca gatctggacg 720
ggcgtaatcg gctcgcccgc ggcgaacgca ccggacgccg ggccccctca gcgctggttt 780
gtggtatggc tcgggaccgc caacaacccg gtggacaagg gcgcggccaa ggcgctggcc 840
gaatcgatcc ggcctttggt cgccccgccg ccggcgccgg caccggctcc tgcagagccc 900
gctccggcgc cggcgccggc cggggaagtc gctcctaccc cgacgacacc gacaccgcag 960
cggaccttac cggcctga 978

<210> 23
<211> 1749
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 23

atgctcctgg ccctgctgcg ccagcacatc cgaccgtacc gccggctggt cgcgatgctg 60
atgatgctgc agctggtcag caccctggct tcgctatacc tcccgacggt caacgccgca 120
atcgtcgacg acggcgtcgc caagggcgac accgccacca tcgtacggct gggtgcggtg 180
atgcttgggg tgaccggatt gcaggtgctg tgcgcgatcg gggcggtcta tctgggctcc 240
cggaccgggg cgggtttcgg ccgtgacctg cgctcggcaa tgttcgaaca catcatcacc 300
ttctcggaac gcgagaccgc ccgattcggc gctccgacgt tgttgacccg cagcaccaac 360
gacgtccggc agatcctgtt cctggtccag atgaccgcca ccgtgctggt caccgcaccg 420
atcatgtgcg tcggcggaat catcatggcc atccaccagg aggccgcgct gacatggctg 480
ctgctggtca gcgttccgat tctggccgta gcaaactact ggatcatctc ccacatgctg 540
ccgctcttcc gccgcatgca gagcctgatc gacggcatca accgggtgat gcgcgatcag 600
ctgtccgggg tgcgagtggt ccgcgccttc acccgcgaag gctatgaacg cgacaagttc 660
gcgcaggcca atacggcgct gtcgaatgcc gcactgagcg ccggcaactg gcaagcactg 720

atgctgccgg tgaccacgct gaccatcaac gcatccagcg tcgcactgat ctggttcggt 780
gggctacgca tcgacagcgg ccagatgcag gtcggctccc tgatcgcctt cctgtcctac 840
ttcgcccaga tcctgatggc ggtgttgatg gcgaccatga cgctggccgt gctgccacga 900
gcgtcggtct gcgccgaacg catcaccgag gtgctttcca cgcccgccgc actcggtaac 960
cccgacaatc ccaagttccc gacggacggg gtcacgggcg tagtgcgctt ggctggcgca 1020
acctttacct atcctggcgc cgactgcccg gtgctgcagg acatttcgtt gactgcgcgg 1080
cccggtacca ccaccgcgat cgtcggcagt accggttcgg gcaagtcgac actggtgtcg 1140
ttgatctgcc ggctctacga cgtcaccgct ggcgcggtct tggttgacgg tatcgacgtc 1200
cgcgagtacc acaccgagcg gctctggtca gcgatcgggc tggtgcccca gcgcagctac 1260
ctcttctccg gaaccgtcgc ggacaacctg cgctacggcg ggggcccaga ccaggtagtc 1320
accgagcagg agatgtggga ggcgctgcgg gtcgccgcgg ccgacggctt tgtacaaaca 1380
gacgggctgc agacgcgtgt cgcccaaggt ggtgtcaact tctccggcgg gcagcgccaa 1440
cggctggcga tagcccgagc ggtcatccga cgtccggcca tctatgtgtt cgacgacgcg 1500
ttctccgcac ttgacgtgca caccgacgcc aaagtccacg catcgctgcg acaggtatct 1560
ggtgatgcaa ccatcattgt tgttacacaa cggatttcga atgccgctca ggccgaccag 1620
gtcatcgttg tcgataacgg taagatcgtc ggcacgggca cccacgaaac gctgctggcc 1680
gattgcccca cctatgccga attcgccgcc tcacaatcgc tgagcgccac ggtcgggggt 1740
gtagggtga 1749

<210> 24
<211> 1407
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 24

atgtcctacg tcatcgcggc cccggagatg ttggcaacga cggccgcgga cgtggacggg 60
atcggttcgg cgatacgagc ggccagcgcg tccgctgcgg gtccaacgac cggactgctg 120
gccgcggccg ccgatgaggt gtcgtcggcc gctgcagcgc tgttcagcga atacgcgcgc 180
gaatgtcaag aggtcctaaa gcaggctgcg gcgttccatg gcgagttcac ccgggcgctg 240
gctgccgccg gggccgccta tgcccaggct gaagccagca acaccgctgc tatgtcgggc 300
accgccgggt ccagcggcgc cctcggttct gtcgggatgc tgtcaggcaa cccgctaacc 360
gcgttgatga tgggcggcac cggggaaccg atccttagtg accgcgtctt ggcgatcatt 420
gacagcgcat acattcggcc cattttcggg cccaacaacc cggtcgccca gtacacgccc 480
gagcagtggt ggccgtttat cgggaacctg tcactggacc aatccatcgc ccagggtgtc 540

acgctgctga acaacggcat caacgcggaa ctacaaaatg ggcatgacgt cgtcgttttc 600
ggctactcgc aaagcgccgc ggtagcgacc aatgaaatac gcgctcttat ggcgttacca 660
ccgggccaag ccccagatcc aagccggctg gctttcacgt tgatcggtaa tatcaataac 720
cccaacggcg gcgtcctcga gcgttacgtg ggcctttacc tcccgttctt ggatatgtcg 780
ttcaacggtg cgactccacc ggattccccc taccagacct acatgtacac cggccaatac 840
gacggctacg cccacaaccc gcagtacccg ctcaatatct tgtcggacct caacgccttc 900
atgggcatca gatgggtgca caacgcgtac cccttcaccg cggccgaggt tgccaatgcc 960
gtgccgttgc ccacgtctcc gggctacacc ggcaacaccc attactacat gtttctgacc 1020
caggacctgc cgctgttgca gccgattcgc gccatcccct tcgtagggac cccaatagcc 1080
gagctgattc agcccgacct acgggtgcta gtcgacttgg gctatggcta cggctacgcc 1140
gacgtaccca ccccggccag cctgttcgcg ccaatcaacc cgatcgccgt ggcctcggcc 1200
ctggcgaccg ggaccgtgca aggcccccaa gccgccctag taagcatcgg attgttaccg 1260
cagtccgcgc tacccaatac gtatccgtat cttccgtcgg cgaatccggg cctgatgttc 1320
aacttcggtc aatccagtgt gacggagttg tcggtgctca gtggcgccct cgggtccgta 1380
gcgagattga ttccaccgat cgcgtga 1407

<210> 25
<211> 11151
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 25

atggagtttc cggtgttgcc accggaaatc aactccgtgc tgatgtattc gggtgcgggg 60
tcgagcccgt tgctggcggc ggccgcggcg tgggatgggc tggctgagga gttggggtcg 120
gcggcggtgt cgtttgggca ggtgacgtcg ggcctgacgg cgggggtgtg gcagggtgcg 180
gcggcggcgg cgatggcggc cgcggcggcg ccgtatgcgg ggtggttggg ttcggtggcg 240
gccgcggccg aggcggtggc cgggcaggcg cgggtggtgg tgggggtctt tgaggcggcg 300
ttggcggcga cggtggatcc ggcgctggtg gcggccaacc gggcgcggct ggtggcgttg 360
gcggtgtcga atctgttggg gcagaacacg ccggcgatcg cggccgccga ggccgagtac 420
gagctgatgt gggccgccga tgtggcggcg atggccggct accattccgg cgcgtcggct 480
gctgccgcgg cgttgccggc gttcagccca ccggcgcagg cgctgggggg aggtgtcggc 540
gcgttcctta ccgccctgtt cgccagccct gcgaaggcgc tgagcctgaa tgcgggtttg 600
ggcaatgtcg gcaattacaa cgtcgggttg ggcaatgtcg gggtgttcaa cctgggcgcg 660
ggcaatgtgg gtgggcagaa tctgggtttc gggaatgccg gtggcaccaa tgtcgggttc 720

ggcaacctcg gtaacgggaa tgtcgggttc ggcaactccg gtctgggggc gggcctggcc 780
ggcttgggca atatcgggtt gggcaatgcg ggcagcagca actatggttt cgcaaacctg 840
ggtgtgggca acatcggttt cggcaacacc ggcaccaaca acgtcggcgt cgggctcacc 900
ggcaaccacc tgacgggtat cgggggcctg aattcgggca ccgggaatat cgggttgttc 960
aactccggca ccgggaatgt ggggttcttc aattcgggga ccgggaactt cggggtgttc 1020
aactcgggta attacaacac cggtgtcggt aatgcgggga cggccagcac ggggttgttc 1080
aatgccggca atttcaacac cggcgtggtg aacgtgggca gttacaacac cggcagtttc 1140
aacgccggcg acaccaacac cggtggcttc aaccccggcg gtgtgaacac cggctggctg 1200
aacaccggca acaccaacac cggcatcgcc aactcgggca acgtcaacac cggcgcgttc 1260
atctcgggca acttcaacaa cggcgtgctg tgggtgggtg actaccaggg cctgttcggc 1320
gtctccgccg gctcgtcgat ccccgcaatt cccatcggcc tggtgctcaa cggcgacatc 1380
ggcccgatca ccatccagcc catcccgatc ctgcccacca tcccgctcag cattcaccaa 1440
accgtcaact tgggcccgct ggtggttccc gacatcgtga tccccgcctt cggcggcggt 1500
atcggcatac ccatcaacat cggcccgctg accatcacac ccatcaccct gtttgcccaa 1560
cagacatttg tcaaccaatt gccctttccc accttcagtt tagggaaaat cacaattcca 1620
caaatccaaa cctttgattc taacggtcag cttgtcagct ttatcggccc tatcgttatc 1680
gacaccacca ttcccggacc caccaatcca cagattgatt taacgatcag atgggatacc 1740
cctccgatca cgctgttccc gaatggcatc agtgctcccg ataatccttt ggggttgctg 1800
gtgagtgtgt cgatcagtaa cccgggcttt accatcccgg gatttagtgt tcccgcgcag 1860
ccgttgccgt tgtcgatcga tatcgagggc cagatcgacg ggttcagcac cccgccgatc 1920
acgatcgatc gcatcccccct gaccgtgggg ggcggggtca cgatcggccc catcacgatc 1980
cagggccttc atatcccggc ggcgccggga gtggggaaca ccaccacggc cccgtcgtcg 2040
ggattcttca actccggtgc gggtggggtg tcgggtttcg gcaacgtcgg cgcgggcagc 2100
tcgggctggt ggaaccaggc gccgagcgcg ctgttggggg ccggttcggg tgttggcaac 2160
gtgggcaccc tgggctcggg tgtgctcaac ctgggctcag ggatctcggg gttctacaac 2220
accagcgtgt tgcctttcgg gacaccggcg gcggtgtcgg gcatcggcaa cctgggccag 2280
cagctgtcgg gggtgtcggc ggcgggaacc acgctgcgct cgatgctcgc cggcaacctc 2340
gggttggcca atgtgggcaa cttcaacacc gggttcggaa atgtcgggga cgtcaacctg 2400
ggtgcggcca acatcggtgg gcacaacctg ggcctgggca atgtcgggga cggcaacctg 2460
gggttgggca acatcggcca tggcaacctg gggtttgcca acttgggcct gaccgccggc 2520
gcggcggggg tgggcaatgt tggttttggc aatgccggca tcaacaacta tggcttggcg 2580
aacatgggtg tgggcaatat tgggtttgcc aacaccggca cgggcaacat cgggatcggg 2640

ctggtcgggg accatcggac cgggatcggg ggcttgaact ccggcatcgg caatatcggg 2700
ttgttcaact ccggcaccgg caacgtcggg ttcttcaatt ccgggaccgg caacttcggc 2760
atcgggaact ccggccgctt caacaccggg atcggtaata gcggaacggc cagcaccggg 2820
ctcttcaatg ccggcagctt cagcaccggc atcgccaaca ctggtgacta caacacgggc 2880
agcttcaacg ccggcgacac caacaccggt ggcttcaacc cgggcggcat caacaccggc 2940
tggttcaaca ccgggcatgc caacaccggg ttggccaacg cgggcacctt cggcaccggc 3000
gccttcatga cgggcgacta cagcaacggc ctgttgtggc ggggcggcta cgagggcctg 3060
gtcggcgtcc gcgtcgggcc cacgatctcc caattcccgg tcaccgtgca cgcgatcggc 3120
ggggtgggcc cgctgcatgt ggcgcccgtc ccggtacccg ccgtgcacgt cgagatcacc 3180
gacgccaccg tcggcctggg tccgttcacc gtcccaccga tcagcattcc ctcacttccc 3240
atcgccagca tcaccggaag cgtggacctg gccgcaaaca ccatctcgcc gattcgcgct 3300
cttgacccgc tcgccggttc gatagggctt tttctcgagc cgttccgcct cagtgaccca 3360
tttatcacca ttgatgcgtt ccaagttgtt gccggtgtct tgttcctaga gaacatcatt 3420
gtgcccggcc tcacggttag cggtcagata ttggtcaccc cgacaccaat tcccctaacc 3480
ctcaacttgg acaccacccc gtggacgctt ttcccgaatg gtttcaccat tcccgcgcaa 3540
acccccgtga cggtgggtat ggaggtcgcc aacgacgggt tcaccttctt cccgggtggg 3600
ctgacctttc cgcgggcctc cgccggggtc accggactgt ccgtggggct ggacgcgttc 3660
acgctgttgc ccgacgggtt caccctcgac accgtgccgg cgaccttcga cggcaccatc 3720
ctcatcggcg atatcccgat cccgatcatc gatgtgccgg cggtgccggg gttcggcaac 3780
accaccacgg ccccatcgtc ggggttcttc aacaccggcg gcggcggtgg atcggggttc 3840
gccaacgtcg gcgcgggcac gtcgggctgg tggaaccagg ggcacgacgt gttagcaggg 3900
gcgggctcgg gagttgccaa tgccggcacg ctgagctcgg gcgtgctgaa cgtcggctcg 3960
gggatctccg ggtggtacaa caccagcacc ctgggagcgg gcaccccggc ggtggtctcg 4020
ggcatcggca acctcggcca gcagctgtcg gggttcttgg caaatgggac cgtgctcaac 4080
cggagcccca ttgtcaatat cgggtgggcc gatgtgggcg cgttcaacac cgggttgggc 4140
aatgtggggg acctcaactg gggtgcggcc aacatcggcg cgcagaacct gggcctgggc 4200
aatctcggca gcgggaacgt cgggttcggc aacatcggtg ccggcaacgt cgggttcgcc 4260
aactcgggtc cggcggtggg cctggccggc ctgggcaacg tggggttgag caatgccggc 4320
agcaacaact gggggctggc caacctgggt gtgggcaaca tcgggttggc caacaccggc 4380
acgggcaaca tcgggatcgg gctggtcggc gactaccaga ccggcatcgg cggcctcaac 4440
tcgggtagtg gcaatatcgg attgttcaat tccggcaccg gcaatgtcgg gttcttcaac 4500
accggcaccg gcaacttcgg actgttcaac tccggtagtt tcaacaccgg catcggtaat 4560

agcggaaccg gcagtactgg gctcttcaat gccggcaatt tcaacaccgg catcgccaac 4620
cccgggtcgt acaacacggg cagcttcaat gtcggtgata ccaacaccgg tggtttcaac 4680
ccgggcgaca tcaacaccgg ctggttcaac accggcatta tgaatacggg cacccgcaac 4740
accggcgccc tcatgtcggg gaccgacagc aacggcatgc tgtggcgcgg cgaccacgag 4800
ggcctgttcg gcctgtccta tggcatcacg atcccgcaat tcccgatccg catcaccacg 4860
actggcggta tcggccccat cgtcatcccg gacaccacga tccttccgcc gctgcacctg 4920
cagatcaccg gcgacgcgga ctacagcttc accgtgcccg acatccccat ccccgccatc 4980
cacatcggca tcaatggcgt cgtcaccgtc ggcttcaccg ccccggaagc caccctgctg 5040
tccgccctga agaataacgg tagcttcatc agcttcggcc ccatcacgct ctcgaatatc 5100
gatattccgc ccatggattt cacgttaggc ctgcccgttc ttggtcctat cacgggccaa 5160
ctcggaccaa ttcatcttga gccaatcgtg gtggccggga tcggtgtgcc cctggagatc 5220
gagcccatcc ccctggatgc gatttcgttg agtgagtcga ttcctatccg catacctgtt 5280
gatattccgg cctcggtcat cgatgggatt tcaatgtcgg aagtggtgcc gatcgatgcg 5340
tccgtggaca tcccggcggt cacgatcaca ggcaccacca tttccgcgat cccgctgggc 5400
ttcgacattc gcaccagtgc cggacccctc aacatcccga tcatcgacat cccggcggcg 5460
ccgggcttcg ggaactcgac ccagatgccg tcgtcggggt tcttcaacac cggtgccggc 5520
ggcggatcgg gcatcggcaa cttgggtgcg ggcgtgtcgg gcctgctcaa ccaggccggc 5580
gcggggtcac tggtggggac actctcgggg ctgggcaatg ccggcaccct ggcctcgggt 5640
gtgctgaact ccggcaccgc catctccggg ctgttcaacg tgagcacgct ggacgccacc 5700
accccggcgg tgatctcggg gttcagcaac ctcggcgacc atatgtcggg ggtgtccatc 5760
gatggcctga tcgcgatcct caccttccca cctgccgagt ccgtgttcga tcagatcatc 5820
gacgcggcca tcgccgagct gcagcacctc gacatcggca acgctttggc cttgggcaat 5880
gtcggcgggg tgaacctcgg tttggctaac gtcggtgagt tcaacctggg tgcgggcaac 5940
gtcggcaaca tcaacgtcgg cgccggcaac ctcggcggca gcaacttggg gttgggcaac 6000
gtcgggaccg gcaacctcgg gttcggcaac atcggtgccg gcaatttcgg attcggcaac 6060
gcgggcctga ccgcgggcgc ggggggcctg ggcaatgtgg ggttgggtaa cgccggcagc 6120
ggcagctggg ggttggccaa cgtgggtgtg ggcaatatcg ggttggccaa caccggcacc 6180
ggcaacatcg ggatcgggct gaccggggac tatcggaccg ggatcggcgg cctgaactcg 6240
ggcaccggga acctcgggtt gttcaactcg ggcaccggca acatcgggtt cttcaacacc 6300
gggaccggga acttcgggct gttcaactcg ggcagttaca gcaccggtgt ggggaatgcg 6360
ggcacggcca gcaccgggtt gttcaacgcg gggaacttca acaccggtct ggccaatgcc 6420
ggctcctaca acaccggcag cctcaacgtg ggcagcttca acaccggcgg cgtcaacccg 6480

ggcaccgtca acaccggctg gttcaacacc ggccacacca acaccggcct gttcaacacc 6540
ggcaacgtca acaccggcgc gttcaactcc ggcagcttca acaacggggc gctgtggacc 6600
ggtgactacc acgggctggt cggcttctcc ttcagcatcg acatcgccgg cagcaccctg 6660
ctggacctca acgaaaccct caacctgggc cccatccaca tcgagcagat cgacatcccc 6720
ggcatgtcgc tgttcgacgt ccacgaaatc gtcgagatcg gacccttcac catcccgcag 6780
gtcgatgttc ccgcgatacc gctagagatc cacgaatcga tccacatgga tcccatcgtc 6840
ctggtgcccg ccaccacaat tcccgcacag acgagaacca ttccgctgga catccccgcc 6900
tcacccgggt caaccatgac gcttccgctc atcagcatgc gcttcgaagg cgaggactgg 6960
atcctcgggt cgaccgcggc gattcccaat ttcggagacc ccttcccggc gcccacccag 7020
ggcatcacca ttcacaccgg ccctggcccc ggaacgaccg gcgagctcaa gatatctatt 7080
ccgggtttcg agattccgca aatcgctacc acgagattcc tgttggacgt gaacatcagc 7140
ggtggtctgc cggccttcac cttgttcgcg ggtggcctga cgatccccac gaacgccatc 7200
ccgttaacga tcgatgcgtc cggcgcgctg gatccgatca cgattttccc gggtgggtac 7260
acgatcgacc cgctgccgct gcacctggcg ctgaatctca ccgtgcccga cagcagcatc 7320
ccgatcatcg atgtcccgcc gacgccaggg ttcggcaaca ccacggcgac cccgtcgtcg 7380
gggttcttca actccggcgc cggtggggtg tcggggttcg gaaacgtcgg gtcgaacctg 7440
tcgggctggt ggaaccaggc ggcgagcgcg ctggcggggt cgggatcggg ggtgttgaat 7500
gtcggcacgc tgggctcggg tgtgctcaac gtcggctcgg gtgtctcggg gatctacaac 7560
accagcgtgt tgccgctcgg gacgccggcg gtgctgtcgg gcctcggcaa cgtcggccat 7620
cagctgtcgg gcgtgtctgc ggccgggacc gcgttgaacc agatccccat cctcaacatc 7680
gggttggcgg atgtgggcaa cttcaacgtc gggttcggca acgtcgggga cgttaacctg 7740
ggcgcggcca acctcggtgc gcaaaacctg gggctgggca acgtcggcac cggcaacctc 7800
ggcttcgcca acgtcggcca cggcaatatc ggtttcggca attcgggtct gaccgccggc 7860
gcggccggcc tgggcaacac ggggttcggc aatgccggca gcgccaacta tggtttcgcc 7920
aaccagggcg tgcgcaacat cgggttggcc aacaccggca ccggcaacat cgggatcggg 7980
ctggtggggg acaacctcac cggcatcggg ggcctgaact ccggtgccgg caatatcggc 8040
ttgttcaact ccggcaccgg caacatcggg ttcttcaact ccgggaccgg caacttcggc 8100
atcggtaact cgggcagctt caacaccggc atcggcaata gcggaacggg cagcactggg 8160
ctcttcaatg ccggcagctt caacaccggc gtggccaacg ccggcagcta caacaccggc 8220
agcttcaatg ccggcgacac caacaccggg gggttcaacc cgggcaccat caacaccggc 8280
tggttcaaca ccggccacac caataccggc atcgccaact cgggcaacgt cggcaccggc 8340
gcgttcatgt cgggcaactt cagcaacggc ctgttgtggc ggggtgatca cgagggcctg 8400

ttcagcctgt tctacagcct cgacgtgccc cggatcacca tcgtggacgc ccacctcgac 8460
ggcggcttcg gacccgtggt cctcccgccc atcccggtgc cggccgttaa tgcgcacctg 8520
accggaaacg tcgcgatggg cgcattcacc attccgcaga tcgacatccc cgcactcacc 8580
ccaaacatca ccggaagcgc cgccttccgc atcgttgtgg ggtccgtgcg cattccgccg 8640
gtgagtgtca ttgtggagca aataatcaac gcctcggttg gggcggagat gaggatagat 8700
cccttcgaaa tgtggactca aggcactaat ggccttggta taaccttcta ttcattcgga 8760
tcggccgacg gttcgcccta cgccaccggc ccactcgttt tcggcgccgg cacgagcgac 8820
ggaagccatc tcaccatttc cgcgtccagc ggggcgttta ccactccgca gctcgaaact 8880
ggcccgatca cgttgggctt ccaggtgccc ggcagcgtca acgcgatcac cctcttcccc 8940
ggtggtttga cgttcccggc gacctcgctg ctgaacctgg acgtgaccgc cggcgccggc 9000
ggcgtggaca tcccggccat cacctggccc gagatcgcgg cgagcgccga cggctcggtg 9060
tatgtcctcg ccagcagcat cccgctgatc aacatcccgc ccaccccggg cattgggaac 9120
agcaccatca ccccgtcgtc gggcttcttc aacgccggcg cgggcggggg atcgggcttc 9180
ggcaacttcg gcgcgggcac ctcgggctgg tggaaccagg cgcacaccgc gctggcgggg 9240
gcgggctcgg gttttgccaa cgttggcacg ctgcattccg gtgtgctcaa cctgggctcg 9300
ggtgtctcgg ggatctacaa caccagcacg ctgggggtgg ggaccccggc gctggtctca 9360
ggcctgggca acgtcggcca ccaactgtcg gggctgcttt ccggcgggtc cgcggtgaac 9420
ccggtgaccg ttctgaatat cgggttggcc aacgtcggca gccacaacgc cggtttcggc 9480
aatgtcgggg aggtcaacct gggcgcggcc aacctcggcg cgcacaacct gggcttcgga 9540
aatatcggcg ccggcaacct ggggttcggc aatattggcc acggcaatgt cggagtcggc 9600
aactcgggtc tgaccgcggg cgtgccgggc ctgggcaatg tggggttggg caatgccggc 9660
ggcaacaact gggggttggc caacgtgggc gtgggcaata tcgggttggc caacaccggc 9720
accggcaaca ttgggatcgg gctgaccggc gactaccaga ccggcatcgg cggcctaaat 9780
tccggtgccg gcaacctggg gttgttcaac tccggcgccg gcaacgtcgg gttcttcaac 9840
accgggaccg gcaacttcgg gttgttcaac tccggcagct tcaacaccgg cgtcggcaat 9900
agcggaacgg gcagcactgg gctcttcaat gccggcagtt tcaacaccgg tgtggccaac 9960
gccggcagct acaacacggg cagcttcaat gtcggtgaca ccaacaccgg gggcttcaac 10020
ccgggcagca tcaacaccgg ctggctcaac gccggcaacg ccaacaccgg ggtggccaac 10080
gcgggcaatg tcaacaccgg cgccttcgtc accggcaact tcagcaacgg catcctgtgg 10140
cgcggcgact accagggcct ggccggcttc gccgtgggct acaccctccc gctgttcccc 10200
gcggtgggcg ccgacgtcag cggcgggatc ggcccgatta ccgtgctgcc gcccatccac 10260
atcccgccca ttccggtcgg cttcgccgcg gtcggtggca tcggcccgat cgccatcccg 10320

gacatctctg ttccatccat tcacttgggc ctcgaccccg ccgtccatgt cggctccatc 10380
accgtcaacc ccattaccgt caggaccccg cccgtgctcg tcagttactc ccaaggagcc 10440
gtcaccagca cgtccggacc aacctcagag atttgggtca agcccagctt cttccccgga 10500
atccggatcg cgccctctag cggcgggggt gcaacgtcca cgcaaggggc atactttgtg 10560
gggcccatct ccatcccctc cggcacggtg accttcccgg gattcaccat ccccctcgac 10620
ccgatcgaca tcggcctgcc ggtgtcgctg accatcccgg ggttcaccat cccgggcggc 10680
accctgatcc ccaccctccc gctgggcctc gcgttgtcca atggcatccc gcccgtcgac 10740
atcccggcca tcgttctcga ccggatcttg ctggacctgc acgccgacac cactatcggc 10800
ccgatcaacg tcccgatcgc cgggttcggc ggggcgccgg gtttcgggaa ctcgaccacg 10860
ctgccgtcgt cgggcttctt caacaccgga gctggcggcg gttcgggctt tagcaacacc 10920
ggcgcgggca tgtcgggatt gctcaacgcg atgtcggatc cgctgctcgg gtcggcgtcg 10980
ggcttcgcca acttcggcac ccagctctcc ggcatcctca accgcggcgc cggcatctcg 11040
ggcgtgtaca acaccggcgc gctgggtgtt gtcaccgcgg ccgtcgtctc gggtttcggc 11100
aacgtcggcc agcaactgtc gggcttgctc ttcaccggcg tcgggcccta a 11151

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 26
Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 27
Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 28

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe

1 5 10

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 29

Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 30

Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 31

Asn Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 32

Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33

Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu

1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 34

Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 35

Ala Ala His Ala Arg Phe Val Ala Ala

1 5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 36

Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln

1 5 10

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 37

Ala Ser Pro Val Ala Gln Ser Tyr Leu

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 38

Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg

1 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em um indivíduo compreendendo:

contato de uma amostra biológica do indivíduo compreendendo células T com um ou mais polipeptídeos de *Mycobacterium*, e uma célula apresentando antígeno apresentando o um ou mais polipeptídeos de *Mycobacterium* em que o um ou mais polipeptídeos de *Mycobacterium* compreendem uma seqüência de aminoácido mostrada como

(a) uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 ou SEQ ID NO: 12;

(b) pelo menos nove a vinte aminoácidos consecutivos de pelo menos uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 OU SEQ ID NO: 12; em que os nove a vinte aminoácidos consecutivos especificamente se ligam a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I; e

determinação de se as células T especificamente reconhecem o polipeptídeo de *Mycobacterium,* em que a presença de células T que especificamente reconhecem o polipeptídeo de *Mycobacterium* detecta *Mycobacterium tuberculosis* no indivíduo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 1.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 que especificamente se ligam a MHC classe I ou um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido QTVEDE

ARRMW (aminoácidos 24 a 34 de SEQ ID NO: 1).

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 2.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2 que especificamente se ligam a HMC classe I.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido VSAAIAGLF (aminoácidos 47 a 55 de SEQ ID NO: 2).

8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 3.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 3 que especificamente se ligam a MHC classe I.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende aminoácidos 53 a 67 de SEQ ID NO: 3.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 4.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 4 que especificamente se ligam a MHC classe I.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 5.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 5 que especificamente se ligam a MHC classe I.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada

como SEQ ID NO: 6.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 6 que especificamente se ligam a MHC classe I.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 7.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 7 que especificamente se ligam a MHC classe I.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 8.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 8 que especificamente se ligam a MHC classe I.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 9.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 9 que especificamente se ligam a MHC classe I.

23. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 10.

24. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 10 que especificamente se ligam a MHC classe I.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 11.

26. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipep-

tídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 11 que especificamente se ligam a MHC classe I.

27. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende a seqüência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO: 12.

28. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende pelo menos nove aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 12 que especificamente se ligam a MHC classe I.

29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-28, em que as células T são células T CD8+.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, em que a determinação de se as células T $CD8^+$ especificamente reconhecem o polipeptídio de *Mycobacterium* é determinada medindo a secreção de uma citocina a partir das células T $CD8^+$.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, em que a citocina é interferon (IFN)-γ.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a medição da secreção de IFN-γ é determinada usando um anticorpo que especificamente se liga a IFN-γ.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-32, em que a amostra biológica é sangue, células mononucleares de sangue periférico isoladas, células mononucleares isoladas

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-32, em que as células T são culturadas *in vitro* com o polipeptídeo de *Mycobacterium.*

35. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-33, em que o polipeptídio é administrado ao indivíduo.

36. Método de detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em um indivíduo compreendendo:

administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de *Mycobacterium* à pele do indivíduo, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende uma seqüência de aminoácido mostrada como (a)

uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 ou SEQ ID NO: 12; ou

(b) pelo menos nove a vinte aminoácidos consecutivos de pelo menos uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 OU SEQ ID NO: 12; em que os nove a vinte aminoácidos consecutivos especificamente se ligam a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I; e

detecção da presença de células T CD8+ que especificamente reconhecem o polipeptídeo de *Mycobacterium* no indivíduo.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, em que a detecção da presença de células T CD8+ compreende detecção da presença de células T CD8+ *in vivo.*

38. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-37, em que a detecção da presença de células T CD8+ compreende detecção de uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada.

39. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-38, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* é administrado intradermalmente ao indivíduo, e em que a reação de hipersensibilidade do tipo retardada é medida através da medição de vermelhidão, inchaço ou endurecimento da pele.

40. Método de detecção de uma infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em um indivíduo compreendendo

detecção da presença de um polipeptídeo de *Mycobacterium* ou um polinucleotídeo codificando o polipeptídio em uma amostra do indivíduo, em que o polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende uma seqüência de aminoácido mostrada como uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID

NO: 10, SEQ ID NO: 11 ou SEQ ID NO: 12.

41. Método de acordo com a reivindicação 40 compreendendo determinar a presença do polipeptídeo de *Mycobacterium.*

42. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a detecção da presença do polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende o uso de um anticorpo que especificamente se liga a polipeptídeo de *Mycobacterium.*

43. Método de acordo com a reivindicação 40 compreendendo determinar a presença do polinucleotídeo de *Mycobacterium.*

44. Método de acordo com a reivindicação 43, em que a determinação da presença do polipeptídeo de *Mycobacterium* compreende o uso de reação de cadeia de polimerase.

45. Método de acordo com a reivindicação 40, em que a amostra biológica é sangue, células mononucleares de sangue periférico, esputo, uma biópsia de pulmão, uma biópsia de nó linfático, saliva, fluido espinhal cerebral ou células T isoladas.

46. Método de detecção de células T expressando CD8 que especificamente reconhecem SEQ ID NO: 1 em um indivíduo compreendendo

(A) contato de células mononucleares de sangue periférico isoladas do indivíduo com um reagente compreendendo

(1) um polipeptídeo de *Mycobacterium* compreendendo pelo menos nove a vinte aminoácidos consecutivos de pelo menos uma das seqüências de aminoácido mostradas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 ou SEQ ID NO: 12, em que os nove a vinte aminoácidos consecutivos especificamente se ligam a complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I;

(2) polipeptídeo de cadeia pesada HLA e β2-microglobulina; e

(3) estreptavidina, em que o reagente é marcado ou não-marcado; e

(B) detecção da presença do reagente ligado às células mononucleares de sangue periférico, deste modo detectando células T expres-

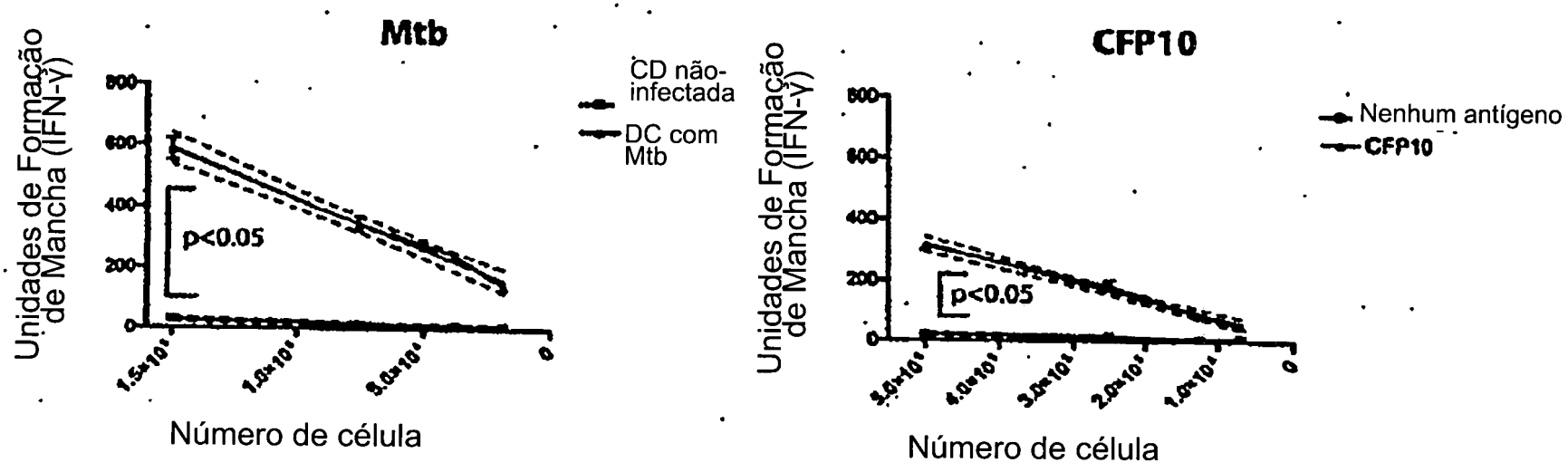
sando CD8 que especificamente se ligam ao polipeptídeo de *Mycobacterium.*

47. Método de acordo com a reivindicação 46 compreendendo ainda quantificação do número de células T CD8+ que se ligam ao reagente.

48. Método de acordo com a reivindicação 46, em que o reagente é marcado.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, em que o marcador é fluorcromo.

FIG. 1


Mtb
Unidades de Formação de Mancha (IFN-γ)
800
600
400
200
0
p<0.05
1.5×10⁵
1.0×10⁵
5.0×10⁴
0
Número de célula
CD não-infectada
DC com Mtb
CFP10
Unidades de Formação de Mancha (IFN-γ)
800
600
400
200
0
p<0.05
5.0×10⁵
4.0×10⁵
3.0×10⁵
2.0×10⁵
1.0×10⁵
0
Número de célula
Nenhum antígeno
CFP10

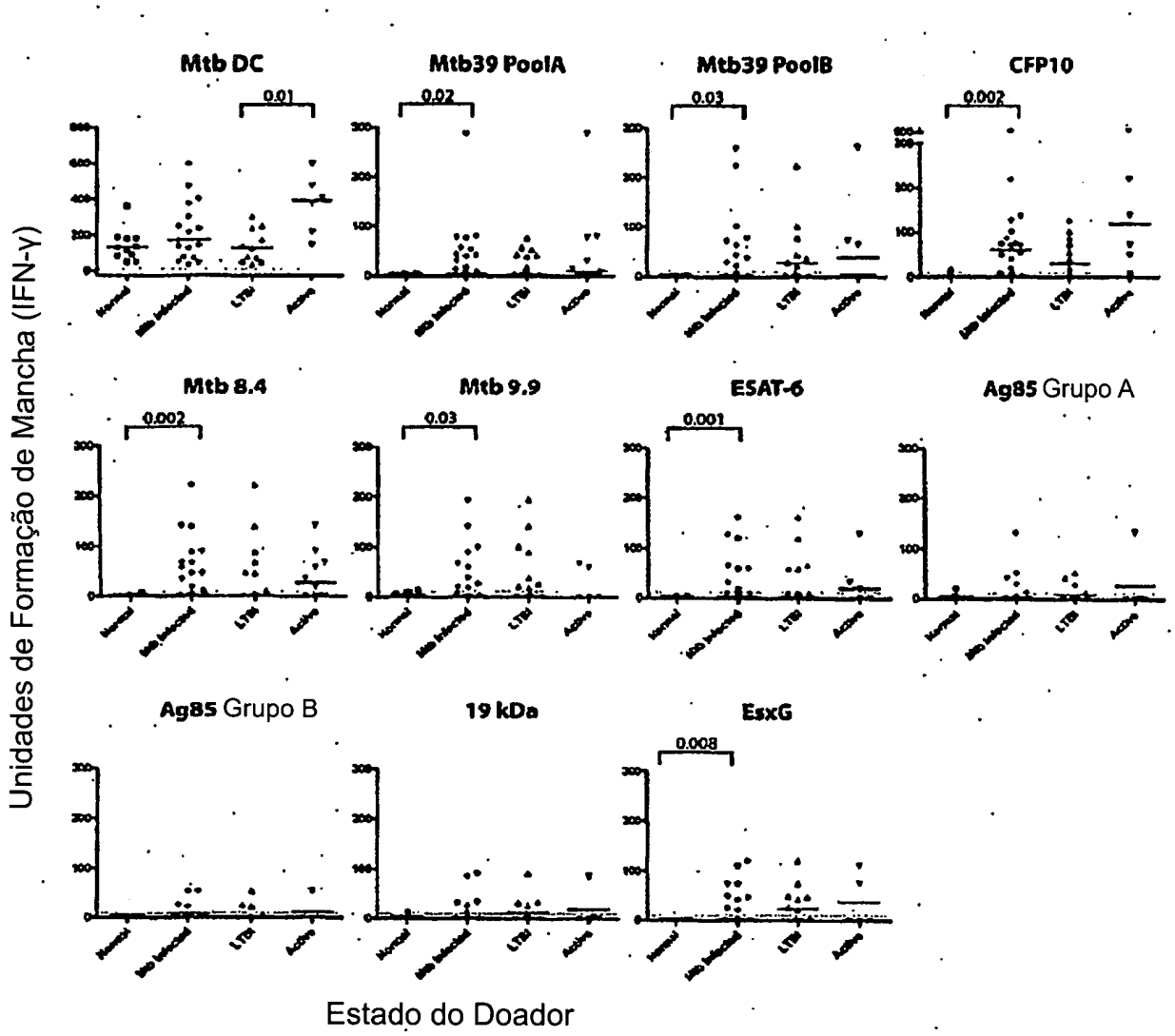
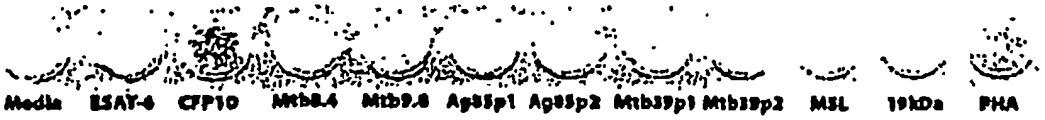
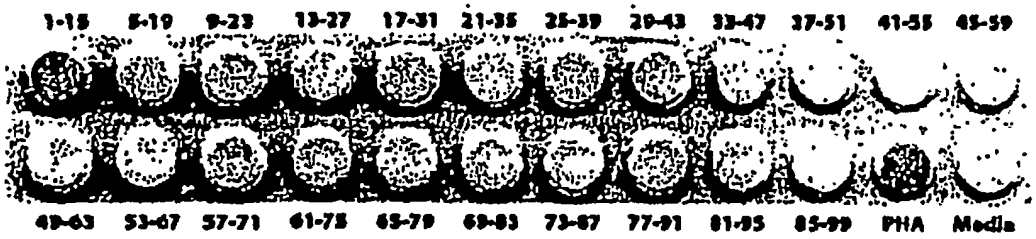

Mtb DC
0.01
Mtb39 PoolA
0.02
Mtb39 PoolB
0.03
CFP10
0.002
Mtb 8.4
0.002
Mtb 9.9
0.03
ESAT-6
0.001
Ag85 Grupo A
Ag85 Grupo B
19 kDa
EsxG
0.008
Unidades de Formação de Mancha (IFN-γ)
Estado do Doador

FIG. 2

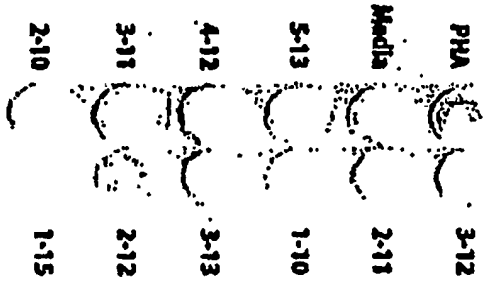
a)Identificação de antígeno



b)Identificação de Peptídeo de 15 mer



c)Identificação de Epítopos Mínimos



d)Identificação de Alelo de restrição

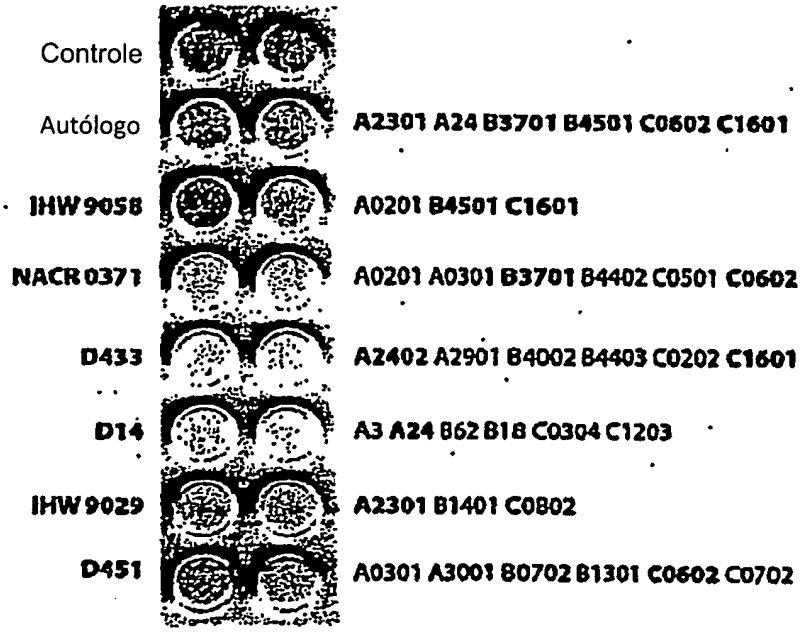


FIG. 3

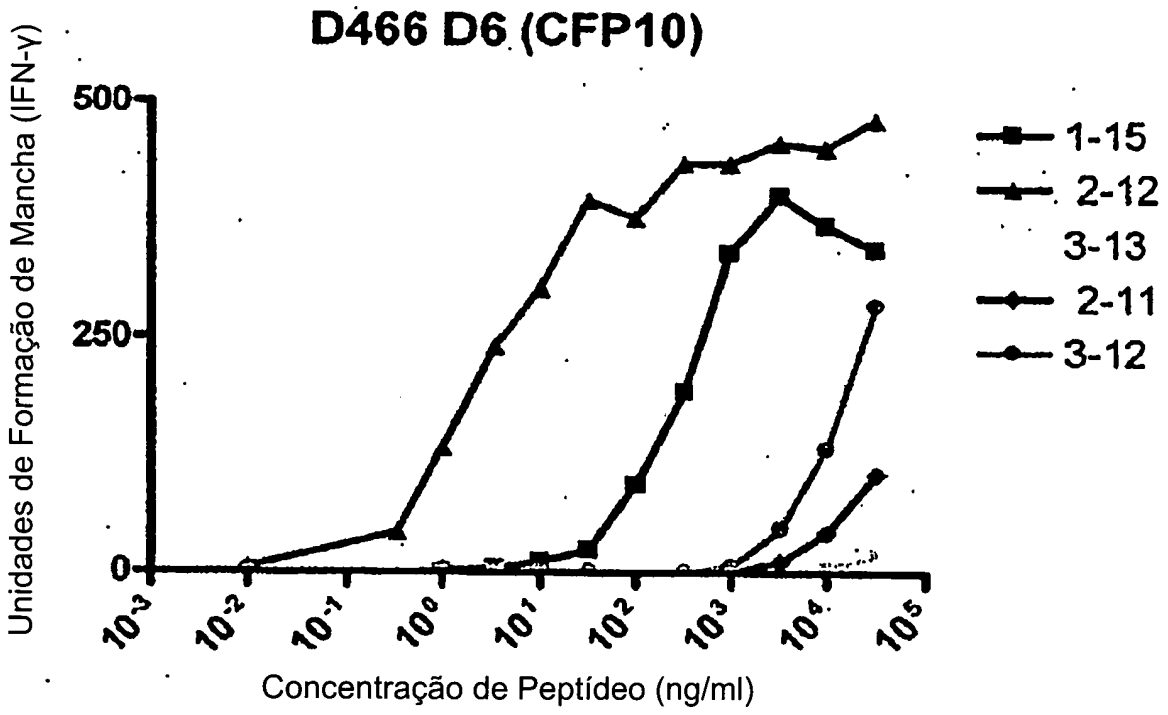

D466 D6 (CFP10)
Unidades de Formação de Mancha (IFN-γ)
500
250
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
10^{4}
10^{5}
Concentração de Peptídeo (ng/ml)
1-15
2-12
3-13
2-11
3-12

FIG. 4

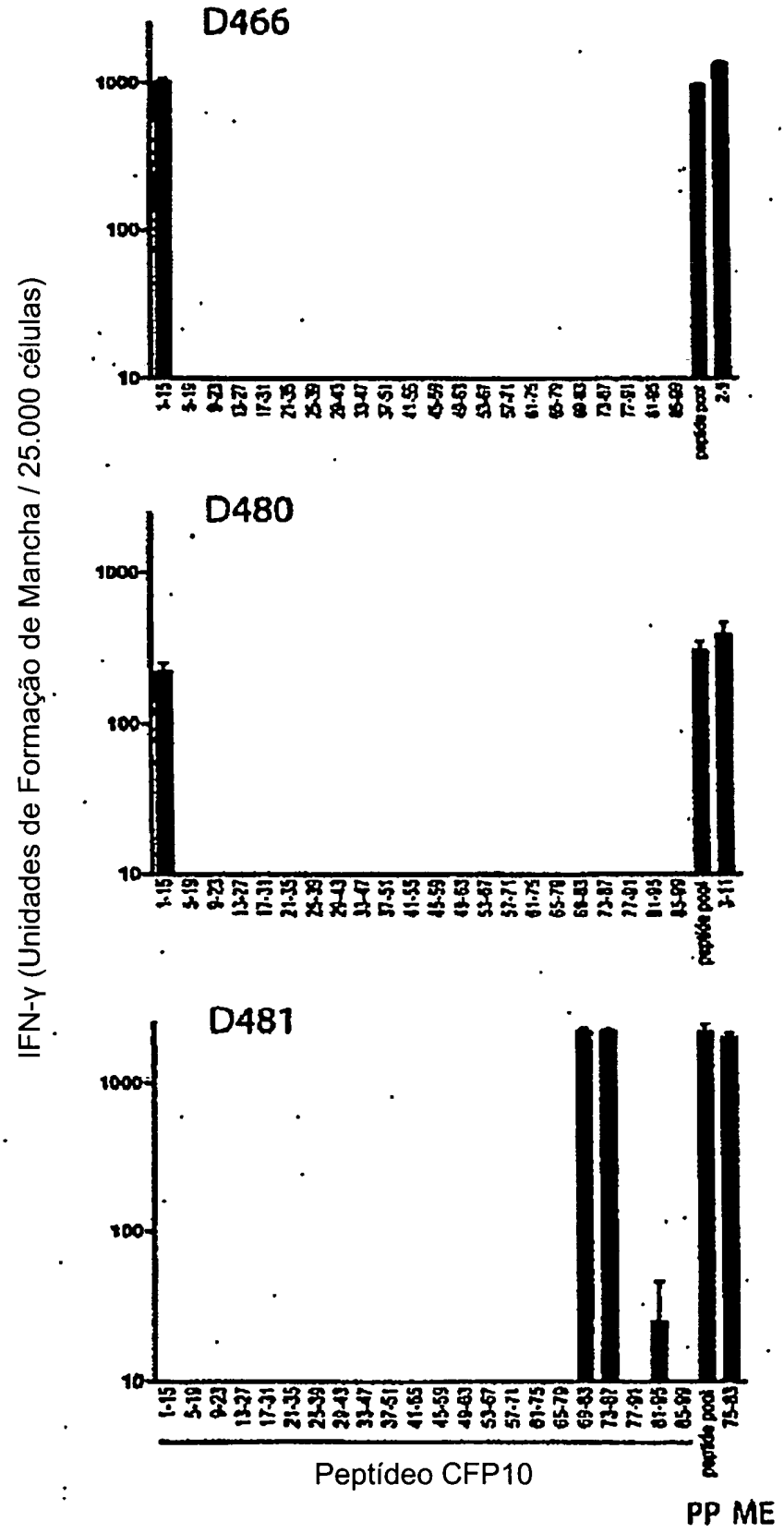

D466
D480
D481
IFN-γ (Unidades de Formação de Mancha / 25.000 células)
1000
100
10
Peptídeo CFP10
PP ME

FIG. 5

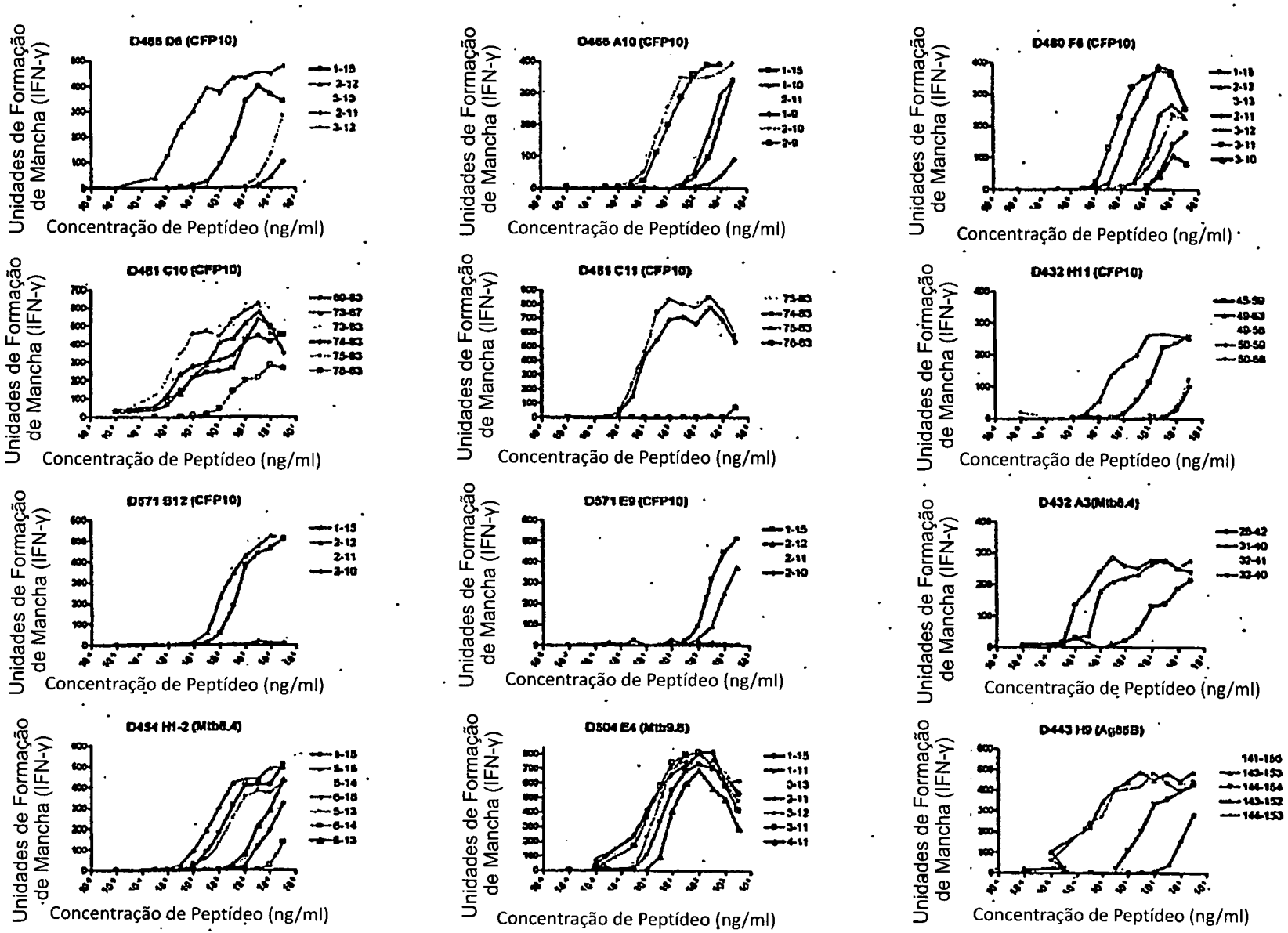

D455 D6 (CFP10)
D455 A10 (CFP10)
D460 F6 (CFP10)
D461 C10 (CFP10)
D461 C11 (CFP10)
D432 H11 (CFP10)
D571 B12 (CFP10)
D571 E9 (CFP10)
D432 A3(Mtb8.4)
D454 H1-2 (Mtb8.4)
D504 E4 (Mtb9.8)
D443 H9 (Ag85B)
Unidades de Formação de Mancha (IFN-γ)
Concentração de Peptídeo (ng/ml)

FIG. 6

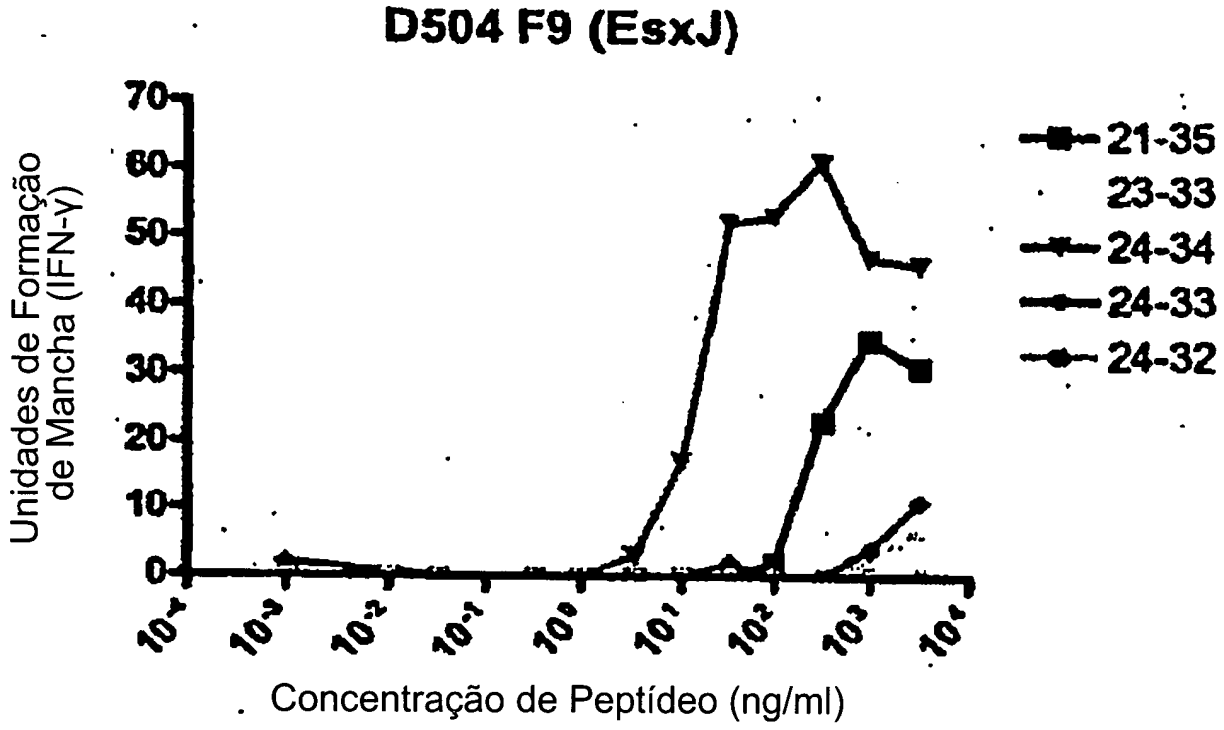

D504 F9 (EsxJ)
Unidades de Formação de Mancha (IFN-γ)
70
60
50
40
30
20
10
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
10^{4}
Concentração de Peptídeo (ng/ml)
21-35
23-33
24-34
24-33
24-32

FIG. 7

PI0708912-0

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE UMA INFECÇÃO POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*".**

A presente invenção refere-se a métodos para detecção de uma infecção com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em um indivíduo que são descritos. Os métodos incluem detecção da presença de células T CD8+ que especificamente reconhecem polipeptídio de Mtb. Os métodos incluem ensaios *in vitro* para detecção da presença de células T CD8+ em uma amostra biológica, e ensaios *in vivo* que detectam uma reação de hipersensibilidade do tipo retardado. Os métodos podem também incluir detecção de polipeptídios e polinucleotídeos de Mtb. Reagentes para detecção de uma infecção por Mtb são também descritos.