

(11) Número de Publicação: **PT 1007688 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/52 (2007.10) **C12N 9/02** (2007.10)

C07K 14/35 (2007.10) **C12N 15/62** (2007.10)

C07K 16/12 (2007.10) **C12N 1/21** (2007.10)

C12Q 1/68 (2007.10) **G01N 33/53** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1997.07.25**

(30) Prioridade(s): **1996.07.26 US 22713 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.06.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.05.21**
159/2008

(73) Titular(es):

INSTITUT PASTEUR

25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX F-75015 PARIS
FR

(72) Inventor(es):

BRIGITTE GICQUEL

FR

MARY JACKSON

FR

(74) Mandatário:

MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA

RUA ARCO DA CONCEIÇÃO, N.º 3, 1º ANDAR 1100-028
LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTIGENE DESATURASE DE MYCOBACTERIUM TEJBERCULOSIS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

ANTIGENE DESATURASE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A tuberculose e a lepra, causadas pelos bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *M leprae*, respectivamente, são as duas principais doenças micobacterianas. As micobactérias patogénicas têm a capacidade de sobreviver dentro de células fagocitárias do hospedeiro. Das interacções entre o hospedeiro e as bactérias resulta a patologia da infecção tuberculosa através dos danos nos tecidos causados pela resposta imunitária do hospedeiro (Andersen & Brennan, 1994). Alternativamente, a protecção do hospedeiro depende também das suas interacções com micobactérias.

A identificação dos antígenos bacterianos envolvidos nestas interacções com o sistema imunitário é essencial para a compreensão dos mecanismos patogénicos de micobactérias e da resposta imunológica do hospedeiro em relação à evolução da doença. É também de grande importância para a melhoria das estratégias de controlo da doença micobacteriana através da vacinação e imunodiagnóstico.

Ao longo dos anos, seguiram-se várias estratégias para identificar antígenos micobacterianos. Ferramentas bioquímicas para fraccionar e analisar proteínas bacterianas permitiram o isolamento de proteínas antigénicas seleccionadas pela sua capacidade de provocar respostas celulares B ou T (Romain et al., 1993, Sorensen

et al., 1995). O recente desenvolvimento de métodos de genética molecular para micobactérias (Jacobs et al., 1991; Snapper et al., 1990; Hatful, 1993; Young et al., 1985) permitiu a construção de bibliotecas de expressão de ADN tanto de *M. tuberculosis* como de *M. leprae* no vector γ gt 11 e a sua expressão em *E. coli*. A triagem destas bibliotecas recombinantes usando anticorpos policlonais ou monoclonais de murino e soros de pacientes conduziram à identificação de numerosos antígenos (Braibant et al., 1994; Hermans et al., 1995; Thole & van der Zee, 1990). No entanto, a maior parte deles passaram a pertencer ao grupo de proteínas de choque térmico altamente conservadas (Thole & van der Zee, 1990; Young et al., 1990).

A observação em modelos animais de que a protecção específica contra a tuberculose era conferida apenas por administração de vacina BCG viva sugeriu que proteínas micobacterianas segregadas devem desempenhar um papel importante na indução de imunidade protectora. Estas proteínas mostraram induzir respostas imunitárias mediadas por células e imunidade protectora em cobaias ou modelos murídeos de tuberculose (Pal & Horwitz, 1992; Andersen, 1994; Haslow et al., 1995). Recentemente, adaptou-se uma metodologia genética para a identificação de proteínas exportadas com base em fusões de gene *PhoA* a micobactérias por Lym et al. (1995). Isso permitiu o isolamento de fragmentos de ADN de *M. tuberculosis* codificando proteínas exportadas. Entre elas, a já conhecida lipoproteína de 19 kDa (Lee et al., 1992) e a proteína ERP similar ao antígeno de 28 kDa de *M. leprae* (Berthet et al., 1995).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Caracterizámos uma nova proteína exportada de *M. tuberculosis*, designada DES, identificada usando metodologia de fusão de gene *PhoA*. O gene *des*, que parece conservado entre espécies micobacterianas, codifica uma proteína antigénica altamente reconhecida por soros humanos, tanto de pacientes de tuberculose como de lepra, mas não por soros de bovino tuberculoso. A sequência de aminoácido da proteína DES contém dois conjuntos de motivos que são característicos dos locais activos de enzimas da família de proteína di-ferro-oxo de classe II. Entre esta família, a proteína DES apresenta homologias significativas em relação desaturases de estearoil-ACP solúveis.

Deve compreender-se que tanto a descrição geral precedente como a descrição detalhada seguinte são apenas exemplificativas e explicativas e não restritivas da invenção, como se reivindica.

Os desenhos anexados, que estão incorporados nesta, e constituem parte desta, especificação, ilustram várias formas de realização da invenção e, juntamente com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

A invenção será ainda clarificada pelos exemplos seguintes, que pretendem ser puramente exemplificativos da invenção.

Bactérias, meio e condições de crescimento

Os plasmídeos e estirpes bacterianas usados neste estudo estão listados na Fig. 8. Culturas de *E. coli* DH5 α de BL21 (DE3)pLysS são feitas crescer de forma padronizada em meio Luria B (Difco) a 37°C. Culturas de Micobactéria são feitas crescer em meio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com Tween 0,05%, glicerol (0,2%) e ADC (glucose, 0,2%; fracção V de BSA, 0,05% e NaCl, 0,085%) a 37°C. Quando requeridos, os antibióticos são adicionados nas seguintes concentrações: ampicilina (100 μ g/ml), canamicina (20 μ g/ml).

Soros humanos e bovinos

Obtiveram-se espécimes de soro de 20 indivíduos com tuberculose pulmonar ou extra-pulmonar (infectados com *M. tuberculosis*) do sanatório de Bligny (França). Obtiveram-se 6 soros de pacientes tuberculosos humanos infectados com *M. bovis* e 24 soros de pacientes vacinados com BCG sofrendo de outras patologias, respectivamente do Instituto Pasteur (Madagáscar) e do Centro de Biologia Médica especializada (CBMS) (Instituto Pasteur, Paris). Obtiveram-se soros de bovinos tuberculosos (infectados com *M. bovis*) de CNEVA (Maison Alfort).

Procedimentos de sub-clonagem

Adquiriram-se enzimas de restrição e ligase-ADN T4 em Gibco/BPL, Boehringer Mannheim e New England Biolabs. Todas as enzimas foram usadas de acordo com as recomendações do

fabricante. Uma escala de 1 kb de marcadores de massa molecular de ADN era de Gibco/BPL. Os fragmentos de ADN usados nos procedimentos de clonagem foram purificados em gel usando o kit Geneclean II (BIO 101 Inc., La Jolla, Calif.). Isolaram-se cosmídeos e plasmídeos por lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Converteram-se estirpes bacterianas por electroporação usando a unidade Gene Pulser (Laboratórios Bio-Rad, Richmond, Calif.).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 é um mapa de restrição do fragmento *EcoRV* de 4,5 kb que codifica o gene *des* de *M. tuberculosis*.

A Fig. 2 mostra as sequências de nucleótidos e de aminoácido derivadas do gene *des* de *M. tuberculosis*.

A Fig. 3 mostra uma análise de sequência comparativa das proteínas di-ferro-oxo de classe II e da proteína Des de *M. tuberculosis*. Os resíduos sombreados indicam ligandos "cluster" de ligandos de ferro plausíveis na proteína Des de *M. tuberculosis*. As letras a negro, emolduradas e não sombreadas, são resíduos plausíveis envolvidos na rede de ligações de hidrogénio ao "cluster". Outras letras a negro indicam resíduos conservados que se acredita participarem no local de ligação O₂. Os intervalos introduzidos na sequência de DES são indicados por pontos. Os números de ordem são como se segue: V0155, redutase ribonucleótida de vírus Epstein-Barr; M58499, hidrolase metano-monooxigenase de *Methylococcus capsulatus*, M60276, polipéptido dmpN fenol hidrolase de *Pseudomonas* sp. estirpe CF 600; M59857,

estearoil-ACP desaturase de *Ricinus communis* e D38753, estearoil-ACP desaturase de *O. sativa*.

A Fig. 4 é uma análise Southern blot da distribuição do gene *des* noutras espécies micobacterianas. O ADN de várias estirpes micobacterianas foi digerido com *Pst*I, sofreu electroforese, foi transferido para uma membrana de nylon por técnica Southern blot e hidrolisado usando sonda B, como se mostra na Fig. 1.

A Fig. 5 mostra um gel SDS-PAGE de extractos, solúveis e insolúveis, de *E. coli*. expressando a proteína DES no plasmídeo pETdes (I-1718).

A Fig. 6 mostra os resultados de ELISAs da sensibilidade da resposta de anticorpos ao antigene DES de pacientes humanos tuberculosos e não tuberculosos.

A Fig. 7 mostra a sequências de nucleótidos e de aminoácido derivada do gene *des* de *Mycoplasma tuberculosis*. As sequências sublinhadas correspondem às caixas -35 e -10 do promotor e uma sequência Shine Dalgarno que corresponde ao suposto local de ligação ribossómica, respectivamente. A adenosina marcada "+1" corresponde ao local de iniciação da transcrição.

A Fig. 8 é uma tabela dos plasmídeos e estirpes bacterianas usados nesta aplicação.

A Fig. 9 é um Western blot que mostra o reconhecimento da proteína DES purificada por anticorpos de bovinos e de humanos infectados com *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

Análise Southern blot e hibridação em colónia

Separaram-se fragmentos de ADN para radiomarcção em géis de agarose a 0,7% (Gibco BRL) num sistema tampão Tris-borato-EDTA (Sambrook et al., 1989) e isolaram-se do gel usando Geneclean II (BIO 101). Realizou-se a radiomarcção com o kit de marcação com base em amplificação aleatória Megaprime (Amersham) com 5 μ Ci de (α - 32 P)dCTP e a marca não incorporada foi removida por passagem através de uma Coluna Nick (Pharmacia). Realizou-se análise Southern blot em NaOH 0,4 M com membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham) de acordo com a técnica Southern (Southern, 1975), realizou-se pré-hibridação e hibridação como recomendado pelo fabricante usando tampão RHB (Amersham). A lavagem a 65°C foi como se segue: duas lavagens com 2XSSPE (NaCl+ 150 mM, NaH₂PO₄ 8,8 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) - SDS 0,1% de 15 minutos cada, uma lavagem com 1XSSPE-SDS 0,1% durante 10 minutos, duas lavagens com 2XSSPE-SDS 0,1% de 15 minutos cada. Prepararam-se auto-radiografias por exposição com película de raios X (Kodak X-Omat AR) a -80°C durante a noite. Realizou-se hibridação em colónia usando discos de membrana de nylon (Hybond-N+ 0,45 μ m, Amersham). Colónias de *E. coli* absorvidas nas membranas foram lisadas numa solução (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M), antes de serem colocadas por um minuto num forno microondas para fixar o ADN. Realizaram-se a hibridação e as lavagens como descrito para a análise Southern Blot.

Sequenciação e análise de ADN

Determinaram-se sequências de ADN plasmídeo bicatenário pelo método de terminação de cadeia dideoxi (Sanger et al., 1977) usando o Kit de sequenciação Taq Dye Deoxy Terminator Cycle (Applied Biosystems) num sistema GeneAmp PCR 9600 (Perkin Elmer) e passagem num Sistema de Análise de ADN por estiramento Modelo 373 (Applied Biosystems). A sequência foi reunida e processada usando ADN Strider™ (CEA, França) e os pacotes de programas de Genetics Computer Group da Universidade do Wisconsin (UWCGC). Usou-se o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990) para procurar semelhança em bases de dados de proteínas.

Expressão e purificação da proteína DES em E. coli

Amplificou-se por PCR um fragmento 1043 bp NdeI-BamHI do gene *des* usando nucleótidos JD8 (5'-CGGCATATGTCAGCCAAGCTGACCGACCTGCAG-3') e JD9 (5'-CCGGGATCCCGCGCI-CGCCGCIUTGCATOGTOG-3') e clonou-se em locais NdeI-BamHI de pET14b (Novagen) para gerar pET-des. Realizaram-se amplificações PCR num *cycler* térmico de ADN (Perkin Elmer), usando polimerase Taq (cetus) de acordo com as recomendações do fabricante. A PCR consistiu num ciclo de desnaturação (95°C, 6 min) seguido de 25 ciclos de amplificação consistindo em desnaturação (95°C, 1 min), recozimento (57°C, 1 min) e extensão do iniciador a (72°C, 1 min). No vector pET-des, a expressão do gene *des* está sob controlo do bacteriófago T7 e o antígeno DES é expresso como uma proteína de fusão contendo seis resíduos histidina. A expressão do gene *des* foi induzida por adição de IPTG 0,4 mM no meio de cultura. Purificou-se a proteína DES usando uma resina de afinidade por níquel quelatado, de acordo com as recomendações do fornecedor (Qiagen,

Chatsworth, Calif.). Associada à localização da proteína DES em corpos de inclusão citoplásmica, realizou-se a purificação sob condições de desnaturação em tampões de hidrocloreto de guanidina. A proteína foi eluída em tampão A (hidrocloreto de guanidina 6 M, NaH_2PO_4 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 8) contendo EDTA 100 mM. A proteína purificada foi mantida e usada em tampão A já que todas as tentativas de a solubilizar noutros tampão foram mal sucedidas.

SDS-PAGE e immunoblotting

Realizou-se electroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli (1970). Para ensaios de Western blot (immunoblotting), usaram-se aproximadamente 10 μg de proteína DES purificada num gel de poliacrilamida-SDS e transferiu-se para membranas de nitrocelulose (Hybond C extra, Amersham) usando um dispositivo Bio-Rad mini transblot de acordo com as recomendações do fabricante (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.). Visualizou-se o rendimento da transferência por formação de mancha transitória com Ponceau Rouge. Incubou-se a membrana com soro humano ou bovino diluído 1/200^e a 37°C durante 1 hora com um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina de caprino anti-humano (Promega) ou de coelho anti-bovino (Byosys) IgG diluído 1/2500^e durante 30 minutos a 37°C. A cor da reacção foi revelada por adição de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (0,165 mg/ml) toluidino nitroazul de tetrazólio (0,33 mg/ml) como substratos.

ELISA

Os soros humanos ou bovinos foram testados em relação a anticorpos contra DES por ensaio de imuno-absorção enzimática (ELISA). Revestiram-se as placas de micro titulação de 96 cavidades com 0,1 µg (por cavidade) de proteína DES purificada em tampão A de hidrocloreto de guanidina (hidrocloreto de guanidina 6 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 8) (1 h a 37°C e 16 h a 4°C). Após três lavagens, saturaram-se as cavidades com albumina de soro bovino a 3% em solução salina com tampão fosfato (PBS) durante 30 min à temperatura ambiente. Após três lavagens, adicionaram-se às cavidades soros diluídos de 1/50^e a 1/3200^e em tampão (PBS, Tween 20 a 0,1%, albumina de soro bovino a 1%) durante 2 h a 37°C. Após três lavagens, trataram-se as cavidades com conjugado caprino anti-humano IgG e fosfatase alcalina (Promega) diluído 1/4000^e durante 1 h a 37°C. Depois, adicionaram-se 4 mg de p-nitrofenilfosfato por ml como substrato. Após 20 min de incubação a 37°C, leram-se as placas fotometricamente a uma densidade óptica de 405 nm em Autoreader micro-ELISA (Dynatech, Mames la Coquette, França).

Estatística

A resposta de anticorpo dos diferentes soros testados foi comparada usando teste t de student. A $P \geq 0,05$ foi considerada insignificante.

Sequência de nucleótidos e número de ordem

As sequências de nucleótidos de *des* foram depositadas na Base de Dados de Sequência Genómica (GSDB) com o número de ordem U49839.

Clonagem do gene des

A construção de uma biblioteca de fusões de ADN genómico de *M. tuberculosis* ao gene *phoA* e a sua expressão em *M. smegmatis*, descrita por Lime et al. (1995), conduz ao isolamento de vários clones *PhoA*⁺. O pExp421 é o plasmídeo ancorado por um dos clones *PhoA*⁺ seleccionado dessa biblioteca. A detecção de fosfatase alcalina enzimaticamente activa indica que a inserção pExp421 contem sinais de exportação e de expressão funcional. A análise de restrição mostrou que pExp421 contem uma inserção de 1,1 kb. A determinação parcial da sua sequência identificou um ORF de 577 bp, designado *des*, fundido em estrutura ao gene *phoA* e apresentando dois motivos, de 9 e 14 aminoácidos, conservados com desaturases de estearoil-acilo transportador de proteína (ACP) solúveis (Lime et al., 1995).

Para isolar todo o comprimento do gene *des*, a biblioteca de cosmídeo genómico de *M. tuberculosis* H37Rv pYUB18 (Jacobs et al., 1991) foi analisada por hibridação em colónia com a sonda de 1,1 kb (sonda A, ver Fig. 1). Foram seleccionados dois cosmídeos de hibridação designados C₃ e C₄ para posterior isolamento do gene. Os cosmídeos C₃ e C₄ foram cindidos com diversas enzimas de restrição e sujeitos a análise Southern blot usando o fragmento de 1,1 kb como uma sonda.

O perfil de restrição de EcoRV revelou um único fragmento de restrição de 4,5 kb que foi sub-clonado em pBluescrit KS' (Stratagene) para dar plasmídeo pBS-des.

Caracterização do gene des

Determinou-se a sequência de ADN da ORF de *des* completa (Fig. 2). Verificou-se que o gene *des* cobre uma região de 1017 bp, codificando uma proteína de aminoácido 339 com uma massa molecular calculada de 37 kDa. A ORF começa com um codão de partida ATG potencial na posição 549 e termina com um codão stop TAG na posição 1565. Existe um motivo Shine-Dalgarno potencial (GGAGG) na posição -8 a montante do ATG. O conteúdo G+C da ORF (62%) é consistente com o conteúdo GC observado em genoma micobacteriano. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos deduzidos do gene *des* foram comparadas com sequências em bases de dados. Mostraram homologias muito elevadas em relação ao gene *aadX* de *M. leprae* localizado no cosmídeo B2266, depositado no GenBank como parte do projecto de sequenciação genómica de *M. leprae* (número de ordem no GenBank nº U15182). Dentro da região codificante, as sequências de ADN eram 79% idênticas enquanto que as sequências codificadas eram 80% idênticas (88% incluindo os resíduos conservados). O gene *des* pontuou significativamente contra desaturases de estearoil-ACP solúveis: 44% de identidade ao nível do nucleótido, 30% de identidade (51% incluindo os resíduos conservados) ao nível de aminoácido, em relação à estearoil-ACP desaturase de *Oryza sativa* (número de ordem nº D38752).

Apesar da detecção de uma actividade enzimática *phoA* no clone *M. smegmatis* ancorando o pExp412 sugerir que a

proteína DES é exportada, não se encontraram semelhantes estruturais entre a proteína DES de aminoácido N-terminais e sequências sinais de proteínas exportadas bacterianas (Izard & Kendall, 1994).

Tal como no genoma de *M. leprae*, foi localizado uma segunda ORF apresentando homologias elevadas em relação ao suposto gene NtrB de *M. leprae* (cosmídeo B2266) a jusante do gene *des* em *M. tuberculosis*, Fig. 2. De forma interessante, as duas ORF, *des* e "NtrB", estão separadas em *M. tuberculosis* por duas repetições directas de 66 nucleótidos sobrepondo-se em 9 nucleótidos (Fig. 2). Apesar de *M. leprae* e *M. tuberculosis* parecerem partilhar a mesma organização genética nesta parte do cromossoma, estas repetições estão ausentes do genoma de *M. leprae*.

A proteína des apresenta os motivos aminoácido conservados das proteínas di-ferro-oxo de classe II

Análises posteriores da sequência de aminoácido da proteína DES revelaram a presença de motivos conservados encontrados apenas nas proteínas di-ferro-oxo de classe II (Fox et al., 1994) (Fig. 3). Estas proteínas são proteínas que contêm clusters di-ferro ligados por pontes oxo (Fe-O-Fe). Elas possuem na sua estrutura secundária hélices 4-alfa envolvidas nos ligandos cluster derivados de proteína. Como revelado em estudos de estrutura por raios X, nestas proteínas, o eixo di-ferro está orientado paralelamente ao longo do eixo das quatro hélices ligadas aos ligandos decorrentes das quatro hélices descontínuas, B, C, E e F. A proteína DES de *M. tuberculosis* parece ter os mesmos resíduos com locais activos das enzimas di-ferro-oxo de

classe II. Isto inclui resíduos Glu e His (E₁₀₇ e H₁₁₀ na hélice C, E₁₉₇ e H₂₀₀ na hélice F) que são ligandos para os átomos de ferro, resíduos Asp, Glu e Arg (E₁₀₆ e R₁₀₉ na hélice C, D₁₉₆ na hélice F) que estão envolvidos numa rede de ligações de hidrogénio ao cluster e resíduos Ile e Thr que podem fazer parte do local de ligação O₂ (T₁₇₀ na hélice E, I₁₉₃ na hélice F). Assim, a proteína DES de *M. tuberculosis* contém na sua sequência primária dois motivos conservados D/E(ENXH) separados por 85 aminoácidos.

Esta família de proteínas di-ferro-oxo de classe II contém até à data redutases ribonucleótido, hidroxilases hidrocarboneto (metano-monooxigenase, tolueno-4-monooxigenase e fenol-hidroxilase) e desaturases ACP solúveis. Em todo o alinhamento de sequência, a proteína DES apresenta maior homologia com desaturases de estearoil-ACP solúveis do que com redutases ribonucleótido ou hidroxilases bacterianas. A percentagem de identidade ao nível de aminoácido da proteína DES considerou-se ser de 30% com a desaturase de estearoil-ACP de *Oryza sativa*, enquanto é apenas de 17% com a metano-monooxigenase de *Methylococcus capsulatus* (número de ordem n° M58499), 17,5% com a fenol-hidroxilase de *Pseudomonas* sp CF 600 (número de ordem n° M60276) e 17,7% com a redutase ribonucleótido de Epstein Barr (número de ordem n° V015555). As homologias em relação às desaturases $\Delta 9$ solúveis dizem respeito maioritariamente aos aminoácidos localizados dentro do local activo em hélices C, E e F (Fig. 3).

Distribuição do gene des noutras espécies micobacterianas

Analizou-se a presença do gene *des* em ADN cromossômico PstI-digesta de várias estirpes micobacterianas pelo método Southern blot (Fig. 4). A sonda usada (sonda B) é um produto de amplificação PCR correspondendo aos nucleótidos 572 a 1589 (ver Fig. 1). A sonda sofreu hibridação em todo o ADN micobacteriano testado. Detectaram-se sinais fortes em *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. Africanum* e *M. avium*. Foram visíveis sinais fracos em *M. microti*, *M. xenopi*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis*. Assim, o gene *des* parece estar presente em cópia única pelo menos no crescimento lento de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. Africanum*, *M. avium* e *M. xenopi*, bem como no crescimento rápido de *M. smegmatis*.

Expressão do gene des em E. coli

Com vista a sobre-expressar a proteína DES, o gene *des* foi sub-clonado em vector de expressão pET 14b (Novagen) com base no promotor bacteriófago T7. Foi clonado um produto de amplificação PCR do gene *des* (ver materiais e métodos) em locais *NdeI-BamHI* do vector, conduzindo ao plasmídeo pET-*des*. Na indução IPTG de células *E. coli* BL21 DE3 pLysS ancorando o plasmídeo pET-*des* foi produzida em excesso uma proteína de cerca de 40kDa. O tamanho da proteína produzida em excesso está de acordo com a massa molecular calculada a partir do polipéptido deduzido. Como se mostra na Fig. 5, a grande maioria da proteína DES produzida em excesso está presente na matéria insolúvel de células *E. coli*. Isto resulta provavelmente da precipitação da proteína super concentrada em citoplasma *E. coli* formando assim corpos de inclusão. Para ser capaz de dissolver a proteína, realizou-se a purificação usando uma resina de afinidade por níquel

quelatado sob condições de desnaturação em tampões de hidrocloreto de guanidina. Entre todas as condições testadas (pH, detergentes...), a única condição na qual a proteína pode ser eluída sem precipitação na coluna e permanecer solúvel foi num tampão contendo hidrocloreto de guanidina 6M.

Imunogenicidade da proteína DES após infecção

Testaram-se 20 amostras de soro de pacientes humanos infectados com *M. tuberculosis* (4 com tuberculose extra-pulmonar, 15 com tuberculose pulmonar e 1 com ambas as formas da doença), 6 soros de pacientes humanos infectados com *M. bovis* e 4 soros de bovino infectado com *M. bovis* tanto em mistura como tomados individualmente em ensaios immunoblot para determinar a frequência de reconhecimento da proteína DES purificada por anticorpos a partir de bovinos ou humanos infectados. Vinte dos 20 soros de pacientes humanos infectados com *M. tuberculosis* e 6 dos 6 soros de pacientes humanos infectados com *M. bovis* reconheceram o antígeno recombinante como mostrado pela reacção com a banda de 37 kDa (Fig. 9). Além disso, uma *pool* de soros de pacientes humanos com lepra lepromatosa também reagiu contra o antígeno DES.

Em contraste, a *pool* de espécimes de soro de bovino infectado com *M. bovis* não reconhece a proteína DES. Estes resultados indicam que a proteína DES é altamente imunogénica em pacientes humanos tuberculosos. Ambos os pacientes com tuberculose pulmonar ou extra-pulmonar reconhecem o antígeno.

Dimensão da resposta de anticorpo de pacientes humanos

Usou-se um ensaio de imuno-absorção enzimática (ELISA) para comparar a sensibilidade das diferentes amostras de soro de 20 pacientes tuberculosos (15 infectados por *M. tuberculosis* e 5 infectados por *M. bovis*) ao antígeno DES. Realizou-se a mesma técnica para comparar a sensibilidade da resposta de anticorpo ao DES de 20 pacientes tuberculosos à da resposta de 24 pacientes (vacinados com BCG) sofrendo de outras patologias. Como se mostra na Fig. 6, pacientes que sofrem de outras patologias que não tuberculose reagem pouco ao antígeno DES (média $OD_{405}=0,17$ para uma diluição de soro de $1/100^e$). A resposta de anticorpo média dos pacientes tuberculosos infectados por *M. tuberculosis* ou *M. bovis* contra o mesmo antígeno é muito mais sensível ($OD_{405}=0,32$ e $OD_{405}=0,36$, respectivamente, para uma diluição de soro de $1/100^e$). Esta diferença na sensibilidade da resposta imunológica é em termos estatísticos altamente significativa em todas as diluições de $1/50^e$ a $1/3200^e$ como se mostra por um teste t de student ($t_{95}=5,18$; $6,57$; $6,16$, $5,79$; $4,43$; $2,53$ e $1,95$, em diluições de soro de $1/50^e$, $1/100^e$, $1/200^e$, $1/400^e$, $1/800^e$, $1/1600^e$ e $1/3200^e$, respectivamente).

Não se detectaram diferenças na sensibilidade da resposta de anticorpo entre paciente sofrendo de tuberculose pulmonar ou extra-pulmonar.

A metodologia de fusão de gene *PhoA* permitiu a identificação de uma nova proteína antigénica exportada de *M. tuberculosis*.

Esta proteína de 37 kDa contém resíduos aminoácido conservados que são característicos das proteínas di-ferro-oxo de classe II. As proteínas desta família são todas enzimas que requerem ferro para a sua actividade. Elas incluem redutases ribonucleótido, hidroxilases hidrocarboneto e desaturases de estearoil-ACP. A proteína DES de *M. tuberculosis* só apresenta homologias significativas em relação a desaturases de estearoil-ACP de plantas (44% de identidade ao nível de nucleótido e 30% de identidade ao nível de aminoácido) que são também enzimas exportadas quando são deslocadas através das membranas cloroplásticas (Keegstra & Olsen, 1989). Este resultado sugere que a proteína DES pode estar envolvida na biosíntese de ácido gordo micobacteriano. Além disso, a localização da proteína fora do citoplasma seria consistente com o seu papel no metabolismo de lípido, uma vez que os lípidos representam 60% dos constituintes da parede celular e que parte da bio-síntese de ácidos micólicos volumosos contendo 60 a 90 átomos de carbono ocorre fora do citoplasma. Entre todos os diferentes passos do metabolismo de lípido, as reacções de desaturação têm especial interesse, primeiro porque muito frequentemente ocorrem nos passos iniciais da bio-síntese de lípidos e segundo porque, através do controlo que têm na taxa de insaturação de membranas, contribuem para a adaptação de micobactérias ao seu ambiente (Wheeler & Ratledge, 1984). Caracterizou-se bioquimicamente um sistema enzimático que envolve uma desaturase de estearoil-Coenzima A (análoga às desaturases de esteroil-ACP de plantas), que catalisa desaturação oxidativa dos derivados CoA de ácido esteárico e plamítico para os correspondentes ácidos gordos mono-insaturados $\Delta 9$, em *Mycobacterium phlei* (Fulco & Bloch,

1962; Fulco & Bloch, 1964; Kashiwabara & al., 1975; Kashiwabara & Sato, 1973). Verificou-se que este sistema estava firmemente ligado a uma estrutura membranosa (Fulco & Bloch, 1964). Assim, espera-se que a desaturase de estearoil-Coenzima A de *M. tuberculosis* (desaturase $\Delta 9$) seja uma enzima exportada. Testaram-se extractos de sonicação de *E. coli* expressando a proteína DES em relação à actividade de desaturação $\Delta 9$ de acordo com o método descrito por Legrand e Besadoun (1991), usando (estearoil-CoA) ^{14}C como substrato. No entanto, não se conseguiu detectar nenhuma actividade de desaturação $\Delta 9$. Este resultado está provavelmente associado ao facto dos sistemas de desaturação serem complexos multi-enzima envolvendo cadeias de transporte de electrões e numerosos co-factores, frequentemente difíceis de tornar funcionais *in vitro*. Sendo *E. coli* e micobactéria muito diferentes do ponto de vista do metabolismo lipídico, a desaturase $\Delta 9$ recombinante de *M. tuberculosis* pode não dispor em *E. coli* de todos os co-factores e enzimas associadas requeridos para a actividade ou pode não interagir adequadamente com eles. Além disso, nem todos os co-factores envolvidos no processo de desaturação de micobactérias são conhecidos e podem estar ausentes no meio de incubação.

No entanto, se a proteínas DES codifica uma desaturase $\Delta 9$, uma questão surpreendente diz respeito à sua sequência primária. De facto, todas as desaturases animais, fúngicas e as duas únicas $\Delta 9$ bacterianas sequenciadas até à data (Sakamoto et al., 1994) são proteínas de membrana integral que foram classificadas numa terceira classe de proteínas de di-ferro-oxo com base nas suas sequências primárias envolvendo resíduos histidina conservados (Shanklin et al.,

1994). As desaturases $\Delta 9$ de plantas são as únicas desaturases a possuir o tipo de sequência primária das proteínas de di-ferro-oxo de classe II (Shanklin & Somerville, 1991). Ainda não foram encontradas bactérias que tenham uma desaturase $\Delta 9$ do tipo das plantas.

Como foi mostrado em ensaios immunoblotting e ELISA, a proteína DES é um antígeno altamente imunogénico que motiva resposta celular B em 100% dos pacientes humanos tuberculosos infectados por *M. tuberculosis* ou *M. bovis* testados, independentemente da forma da doença (extra-pulmonar ou pulmonar). Ela provoca também uma resposta de anticorpo em pacientes com lepra lepromatosa. De forma interessante, apesar de precisarem de ser testados mais soros, bovinos tuberculosos não parecem reconhecer o antígeno DES. Além disso, os ensaios ELISA mostraram que é possível distinguir pacientes tuberculosos de pacientes que sofrem de outras patologias com base na sensibilidade da sua resposta de anticorpo ao antígeno DES. O antígeno DES é portanto um bom candidato a ser usado para diagnóstico em soro de tuberculose em pacientes humanos. A razão porque os pacientes não tuberculosos testados reconhecem num baixo nível a proteína DES pode dever-se ao facto de serem todos indivíduos vacinados com BCG (em que a BCG expressa a proteína) ou a uma reactividade cruzada da sua resposta de anticorpo com outros antígenos bacterianos. Seria agora interessante conhecer se o antígeno DES possui epítotos juntamente com a sua célula B. Os epítotos celulares T que são os únicos protectores na resposta imunológica do hospedeiro contra micobactérias patogénicas. Se a proteína DES for também um bom estimulador da resposta celular T na

maioria dos pacientes tuberculosos, ela pode ser usada tanto individualmente como fazendo parte de um “cocktail” de antígenos no projecto de uma vacina sub-unitária contra a tuberculose.

As referências aqui citadas estão listadas nas páginas seguintes e são explicitamente incorporadas por referência.

Outras formas de realização da invenção serão manifestas para os peritos a partir da consideração da especificação e prática da invenção aqui reveladas. Pretende-se que a especificação e os exemplos sejam considerados apenas exemplificativos sendo o verdadeiro âmbito e espírito da invenção indicado pelas reivindicações que se seguem.

1. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.M. Myers e D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215:430-410.

2. Andersen, A.B. e P. Breanan, 1994. Proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, p. 307-332. In B.R. Bloom (ed.), *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. ASM, Washington, DC.

3. Andersen, P., 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect. Immun.* 62:2536-2544.

4. Berthet, F.X., J. Rauzier, E.M. Lim, W. Philipp, B. Gicquel e D. Portnoï, 1995. Characterization of the *M. tuberculosis* *erp* gene encoding a potential cell surface

protein with repetitive structures. Microbiology, 141: 2123-2130.

5. Braibant, M., L.D. Wit, P. Peirs, M. Kalai, J. Ooms, A. Drowart, K. Huygen e J. Content, 1994. Structure of the Mycobacterium tuberculosis antigen 88, a protein related to the Escherichia coli PstA periplasmic phosphate permease subunit, Infection and immunity, 62:849-854.

6. Fox, B.G., J. Shanklin, J. Ali, TM. Loerh e J. Sanders-Loerb, 1994. Resonance Raman evidence for an Fe-O-Fe center in stearoyl-ACP desaturase. Primary sequence identity with other diiron-oxo proteins. Biochemistry 33: 12776-12786.

7. Fulco, AJ. e K. Bloch, 1962. Cofactor requirements for fatty acid desaturation in Mycobacterium phlei. Biochim. Biophys. Acta. 63:545-546.

8. Fulco, AJ. e K. Bloch, 1964. Cofactor requirements for the formation of Δ^9 unsaturated fatty acids in Mycobacterium phlei. The Journal of Biological Chemistry. 239:993-997.

9. Haslov, K., A. Andersen, S. Nagai, A. Gottschau, T. Sorensen e P. Andersen, 1995. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infection and immunity, 63:804-810.

10. Hatfull, G.F. 1993. Genetic transformation of mycobacteria. Trends in microbiology, 1:310-314.

11. Hermans, P.W.M., F. Abebe, V.1.0 Kuteyi, A.H.J. Kolk, J.E.R. Thole e M. Harboe, 1995. Molecular and immunological

characterization of the highly conserved antigen 84 from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *Infection and Immunity*, 63:954-960.

12. Izard J.W. e D.A. Kendall, 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters, *Molecular Microbiology*, 13:765-773.

13. Jacobs, W.R., G.V. Kalpana. J.D. Cirillo. L. Pascopella, S.B. Snapper, R.A. Udani, W. Jones, R.G. Barletta e B.R. Bloom, 1991. Genetic systems for mycobacteria. *Methods enzymol.* 204:537-555.

14. Kashiwabara, Y., H. Nakagawa, G. Matsuki e R. Sato, 1975. Effect of metal ions in the culture medium on the stearyl-Coenzyme A desaturase activity of *Mycobacterium phlei*. *J. Biochem.* 78:803-810.

15. Kashiwabara, Y. e R. Sato, 1973. Electron transfer mechanism involved in stearylcoenzyme A desaturation by particulate fraction of *Mycobacterium phlei*. *J. Biochem.* 74:405-413.

16. Keegstra, K. e L.J. Olsen, 1989. Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant MoI. Biol.* 40:471-501.

17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227:680-685.

18. Lee, B. Y., S.A. Hefta e P.J. Brennan, 1992. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 60:2066-2074.
19. Legrand, P. e A. Bensadoun, 1991. Stearyl-CoA desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1086:89-94.
20. Lim, E.M., J. Rauzier, J. Timm, G. Torrea. A Murray, B. Gicquel e D. Portnoï, 1995. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. *Journal of Bacteriology*. 177:59-65.
21. Pal, P.G. e M.A. Horwitz, 1992. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity*. 60:4781-4792.
22. Romain, F., A. Laqueyrie, P. Militzer, P. Pescher, P. Chavarot, M. Lagranderie, G. Auregan, M. Gheorghiu e G. Marchal, 1993. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47 - kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infection and immunity* 61:742-750.
23. Sakamoto, T., H. Wada, I. Nishida, M. Ohmori e N. Murata, 1994. A9 acyl lipid desaturases of cyanobacteria. *J. Biol. Chem*. 269:25576-25580.

24. Sambrook, J., E.F. Fritsch e T. Maniatis, 1989. Molecular cloning- A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
25. Sanger, F., S. Nicklen e A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467.
26. Shanklin, J. e C. Somerville, 1991. Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America. 88:2510-2514.
27. Shanklin, J., E. Whittle e B.G. Fox, 1994. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, staroyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. Biochemistry. 33: 12787-12794.
28. Snapper, S.B., B.R. Bloom e J.W.R. Jacobs, 1990. Molecular genetic approaches to mycobacterial investigation, p. 199-218. In J. McFadden (ed.), Molecular Biology of the Mycobacteria. Surrey University Press, London.
29. Sorensen, A.L., S. Nagai, G. Houen, P. Andersen e A.B. Andersen, 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immunity 63: 1710-1717.

30. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
31. Studier, W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn e J.W. Dubendorff 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods in Enzymology 185:60-89.
32. Thole, J.E.R. e R. v.d. Zee 1990. The 65 kD antigen : molecular studies on a ubiquitous antigen., p. 37-66. In J. McFadden (ed.). Molecular Biology of the mycobacteria. Surrey University Press, London.
33. Wheeler, P.R. e C. Ratledge. 1994. Metabolism of Mycobacterium tuberculosis, p. 353-385. In B.R. Bloom (ed.). Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control, ASM. Washington, DC.
34. Young, D., T. Garbe, R. Lathigra e C. Abou-Zeid. 1990. Protein antigens: structure, function and regulation, p. 1-35. In J. McFadden (ed.), Molecular biology of mycobacteria. Surrey university Press, London.
35. Young, R.A., B.R. Bloom, C.M. Grossinsky, J. Ivany, D. Thomas, and R.W. Davis, 1985. Dissection of the Mycobacterium tuberculosis antigens using recombinant DNA Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2583-2587.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> INSTITUTO PASTEUR
 JACKSON, Mary
 GICQUEL, Brigitte
 <120> ANTIGENE DESATURASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
 <130> 63753
 <140> EP 97930698.2
 <141> 1997-07-25
 <150> US 06/022,713
 <151> 1996-07-26
 <160> 34
 <170> Patente na versão 3.3
 <210> 1
 <211>34
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador JD8
 <400> 1
 cggcatatgt tcagccaagc tgaccgacct gcag 34
 <210> 2
 <211>33
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Iniciador JD9
 <400> 2
 ccgggatccc gcgctcgccg ctctgcatcg tcg 33
 <210> 3
 <211>1690
 <212> ADN
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 3

gateatcatc ggccgggtgc cgcgcagggc gccgacaccg gcgagtgcgg gcgcgaggat	60
cgccccccac cagttcggca gctgcgtgtc gatgcgtccc acaatcccgg gaaacagctc	120
gaccattacc tctcaatat gagcctcgaa aaacttgccg ctgtgcgcgg cgtcgtggtg	180
agcgcacaca acaactgtta gctgaccagc aggatcggcg ctcttaccgg tctgttcacc	240
gcatatctga acggacggct gggagccacc cgcaagcaat tcatcgacta ctgcgtcaac	300
atgttgctca gcaccgccg cacctacgca ccgcaccgcg agcggggaga atccgaacac	360
tccatcccag ccgggcccga caactgagga cgactgggggt caccaccgcg ggccaccggg	420
gccccccgat gccagcatcc tgcccgtgtc tggcagctca acatgccgcg cgaagcccaa	480
acttgatgct accgagagac acagatatat tgactgcaac cattagacac agataactgg	540
aggcgccatg tcagccaagc tgaccgacct gcagctgctg cacgaacttg aaccggtcgt	600
cgagaagtac ctgaaccggc acctgagcat gcacaagccc tggaaccgcg acgactacat	660
cccgtggtcg gacgggaaga actactacgc gctcggcggg caggattggg accccgacca	720
gagcaagctt tctgatgtcg cccaggtggc gatggtgcag aacctgggtca ccgaggacaa	780
cctgccgtcg tatcaccgcg agatcgcgat gaacatgggc atggacggcg cgtgggggca	840
gtgggtcaac cgttggaacc ccgaggagaa tcggcacggc atcgcgctgc gcgactacct	900
ggtggtgacc cgatcggtcg acctgtcga gttggagaaa cttcgccctcg aggtagtcaa	960
ccggggcttc agcccaggcc aaaaccacca gggccactat ttcgcggaga gcctcaccga	1020
ctccgtctc tatgtcagtt tccaggaact ggcaaccggg atttcgcacc gcaataccgg	1080
caaggcatgt aacgaccccg tcgccgacca gctcatggcc aagatctcgg cagacgagaa	1140
tctgcacatg atcttctacc gcgacgtcag cgaggccgcg ttcgacctcg tgcccaacca	1200
ggccatgaag tcgctgcacc tgattttgag ccacttccag atgcccggt tccaagtacc	1260
cgagttccgg cgcaaagccg tggtcacgc cgtcgggggt gtctacgacc cgcgcaccca	1320

```

cctcgacgaa gtcgtcatgc cgg tactgaa gaaatggtgt atcttcgagc gcgaggactt 1380
caccggcgag ggggctaagc tgcgcgacga gctggccctg gtgatcaagg acctcgagct 1440
ggcctgcgac aagttcgagg tgtccaagca acgccaactc gaccgggaag cccgtacggg 1500
caagaaggtc agcgcacacg agctgcataa aaccgctggc aaactggcga tgagccgtcg 1560
ttagcccggc gacgatgcag agcgcgcagc gcgatgagca ggaggcgggc aatccaaccc 1620
agcccggcga cgatgcagag cgcgcagcgc gatgagcagg aggtgggcaa tccaaccag 1680
cccggcgttg                                     1690

```

<210> 4

<211> 336

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

```

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

```

```

Val Val Glu Lys Tyr Leu Asn Arg His Leu Ser Met His Lys Pro Trp
          20           25           30

```

```

Asn Pro His Asp Tyr Ile Pro Trp Ser Asp Gly Lys Asn Tyr Tyr Ala
          35           40           45

```

```

Leu Gly Gly Gln Asp Trp Asp Pro Asp Gln Ser Lys Leu Ser Asp Val
          50           55           60

```

```

Ala Gln Val Ala Met Val Gln Asn Leu Val Thr Glu Asp Asn Leu Pro
65           70           75           80

```

```

Ser Tyr His Arg Glu Ile Ala Met Asn Met Gly Met Asp Gly Ala Trp
          85           90           95

```

Gly	Gln	Trp	Val	Asn	Arg	Trp	Thr	Ala	Glu	Glu	Asn	Arg	His	Gly	Ile			
			100					105					110					
Ala	Leu	Arg	Asp	Tyr	Leu	Val	Val	Thr	Arg	Ser	Val	Asp	Pro	Val	Glu			
			115					120				125						
Leu	Glu	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Val	Val	Asn	Arg	Gly	Phe	Ser	Pro	Gly			
	130					135					140							
Gln	Asn	His	Gln	Gly	His	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ser	Leu	Thr	Asp	Ser	Val			
145					150					155					160			
Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr	Arg	Ile	Ser	His	Arg	Asn			
				165					170					175				
Thr	Gly	Lys	Ala	Cys	Asn	Asp	Pro	Val	Ala	Asp	Gln	Leu	Met	Ala	Lys			
			180					185					190					
Ile	Ser	Ala	Asp	Glu	Asn	Leu	His	Met	Ile	Phe	Tyr	Arg	Asp	Val	Ser			
		195					200					205						
Glu	Ala	Ala	Phe	Asp	Leu	Val	Pro	Asn	Gln	Ala	Met	Lys	Ser	Leu	His			
	210					215					220							
Ile	Leu	Ser	His	Phe	Gln	Met	Pro	Gly	Phe	Gln	Val	Pro	Glu	Phe	Arg			
225					230					235					240			
Arg	Lys	Ala	Val	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Gly	Val	Tyr	Asp	Pro	Arg	Ile			
				245					250					255				
His	Leu	Asp	Glu	Val	Val	Met	Pro	Val	Leu	Lys	Lys	Trp	Cys	Ile	Phe			
			260					265					270					

Glu Arg Glu Asp Phe Thr Gly Glu Gly Ala Lys Leu Arg Asp Glu Leu
275 280 285

Ala Leu Val Ile Lys Asp Glu Leu Ala Cys Asp Lys Phe Glu Val Ser
290 295 300

Lys Gln Arg Gln Leu Asp Arg Glu Ala Arg Thr Gly Lys Lys Val Ser
305 310 315 320

Ala His Glu Leu His Lys Thr Ala Gly Lys Leu Ala Met Ser Arg Arg
325 330 335

<210> 5

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

Glu Phe Tyr Lys Phe Leu Phe Thr Phe Leu Ala Met Ala Glu Lys Leu
1 5 10 15

Val Asn Phe Asn Ile Asp Glu Leu Val Thr Ser Phe Glu Ser His Asp
20 25 30

Ile Asp His Tyr Tyr Thr Glu Gln Lys Ala Met Glu Asn Val His Gly
35 40 45

Glu Thr Tyr Ala
50

<210> 6

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 6

Ile	Phe	Ile	Ser	Asn	Leu	Lys	Tyr	Gln	Thr	Leu	Leu	Asp	Ser	Ile	Gln
1				5					10					15	

Gly	Arg	Ser	Pro	Asn	Val	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Ile	Ser	Ile	Pro	Glu
			20					25					30		

Leu	Glu	Thr	Trp	Val	Glu	Thr	Trp	Ala	Phe	Ser	Glu	Thr	Ile	His	Ser
		35					40					45			

Arg	Ser	Tyr	Thr
			50

<210> 7

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 7

Glu	Thr	Met	Lys	Val	Val	Ser	Asn	Phe	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Tyr	Asn
1				5					10					15	

Ala	Ile	Ala	Ala	Thr	Gly	Met	Leu	Trp	Asp	Ser	Ala	Gln	Ala	Ala	Glu
			20					25					30		

Gln	Lys	Asn	Gly	Tyr	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Ile	Arg	His	Thr
		35					40					45			

His	Gln	Cys	Ala
			50

<210> 8

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 8

Glu	Thr	Met	Lys	Val	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Tyr	Asn
1				5					10					15	

Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Ala	Met	Leu	Trp	Asp	Ser	Ala	Thr	Ala	Ala	Glu
			20					25					30		

Gln	Lys	Asn	Gly	Tyr	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Ile	Arg	His	Thr
		35					40					45			

His	Gln	Cys	Ala
	50		

<210> 9

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 9

Asn Ala Leu Lys Leu Phe Leu Thr Ala Val Ser Pro Leu Glu Tyr Gln
 1 5 10 15

Ala Phe Gln Gly Phe Ser Arg Val Gly Arg Gln Phe Ser Gly Ala Gly
 20 25 30

Ala Arg Val Ala Cys Gln Met Gln Ala Ile Asp Glu Leu Arg His Val
 35 40 45

Gln Thr Gln Val
 50

<210> 10

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 10

Ser Thr Leu Lys Ser His Tyr Gly Ala Ile Ala Val Gly Glu Tyr Ala
 1 5 10 15

Ala Val Thr Gly Glu Gly Arg Met Ala Arg Phe Ser Lys Ala Pro Gly
 20 25 30

Asn Arg Asn Met Ala Thr Phe Gly Met Met Asp Glu Leu Arg His Gly
 35 40 45

Gln Leu Gln Leu
 50

<210> 11

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 11

Leu	Val	Gly	Asp	Met	Ile	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Gln	Thr
1				5					10					15	

Met	Leu	Asn	Thr	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Asp	Glu	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro
			20					25					30		

Thr	Ser	Trp	Ala	Ile	Trp	Thr	Arg	Ala	Trp	Thr	Ala	Glu	Glu	Asn	Arg
		35					40					45			

His	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn
	50				

<210> 12

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 12

Leu	Val	Gly	Asp	Met	Ile	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Gln	Thr
1				5					10					15	

Met	Leu	Asn	Thr	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Asp	Glu	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro
			20					25					30		

Thr	Pro	Trp	Ala	Ile	Trp	Thr	Arg	Ala	Trp	Thr	Ala	Glu	Glu	Asn	Arg
		35					40					45			

His	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn
	50				

<210> 13

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 13

Leu	Val	Gly	Asp	Met	Ile	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Gln	Thr
1				5					10					15	

Met	Leu	Asn	Thr	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Asp	Glu	Thr	Gly	Ala	Ser	Leu
			20					25					30		

Thr	Pro	Trp	Ala	Val	Trp	Thr	Arg	Ala	Trp	Thr	Ala	Glu	Glu	Asn	Arg
		35					40					45			

His	Gly	Asp	Leu	Leu	His
	50				

<210> 14

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 14

Leu Val Gly Asp Met Ile Thr Glu Glu Ala Leu Pro Thr Tyr Gln Thr
 1 5 10 15

Met Leu Asn Thr Leu Asp Gly Ala Lys Asp Glu Thr Gly Ala Ser Pro
 20 25 30

Thr Ser Trp Ala Val Trp Thr Arg Ala Trp Thr Ala Glu Glu Asn Arg
 35 40 45

His Gly Asp Leu Leu Asn
 50

<210> 15

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 15

Leu Val Gly Asp Met Ile Thr Glu Glu Ala Leu Pro Thr Tyr Gln Thr
 1 5 10 15

Met Leu Asn Thr Leu Asp Gly Val Arg Asp Glu Thr Gly Ala Ser Pro
 20 25 30

Thr Ser Trp Ala Ile Trp Thr Arg Ala Trp Thr Ala Glu Glu Asn Arg
 35 40 45

His Gly Asp Leu Leu Asn
 50

<210> 16

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 14

Leu	Ile	Gly	Asp	Met	Ile	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Gln	Thr
1				5					10					15	

Met	Ile	Asn	Thr	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Asp	Glu	Thr	Gly	Ala	Thr	Val
			20					25					30		

Thr	Pro	Trp	Ala	Ile	Trp	Thr	Arg	Ala	Trp	Thr	Ala	Glu	Glu	Asn	Arg
		35					40					45			

His	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn
	50				

<210> 17

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 17

Leu Val Gly Asp Met Ile Thr Glu Glu Ala Leu Pro Thr Tyr Gln Thr
 1 5 10 15

Met Leu Asn Thr Leu Asp Gly Val Arg Asp Glu Thr Gly Ala Ser Leu
 20 25 30

Thr Pro Trp Ala Ile Trp Thr Arg Ala Trp Thr Ala Glu Glu Asn Arg
 35 40 45

His Gly Asp Leu Leu Asn
 50

<210> 18

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 18

Leu Val Gly Asp Met Ile Thr Glu Glu Ala Leu Pro Thr Tyr Met Ser
 1 5 10 15

Met Leu Asn Arg Cys Asp Gly Ile Lys Asp Asp Thr Gly Ala Gln Pro
 20 25 30

Thr Ser Trp Ala Thr Trp Thr Arg Ala Trp Thr Ala Glu Glu Asn Arg
 35 40 45

His Gly Asp Leu Leu Asn
 50

<210> 19

<211> 54

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 19

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

Asn Leu Pro Ser Tyr His Arg Glu Ile Ala Met Asn Met Gly Met Asp
20 25 30

Gly Ala Trp Gly Gln Trp Val Asn Arg Trp Thr Ala Glu Glu Asn Arg
35 40 45

His Gly Ile Ala Leu Arg
50

<210> 20

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 20

Glu Lys Ile Leu Val Phe Leu Leu Ile Glu Gly Ile Phe Phe Ile Ser
1 5 10 15

Ser Phe Tyr Ser Ile Ala Leu Leu Arg Val Arg Gly Leu Met Pro Gly
20 25 30

Val Cys Leu Ala Asn Asn Tyr Ile Ser Arg Asp Glu Leu Leu His Thr
35 40 45

Arg Ala Ala Ser
50

<210> 21

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 21

Leu Cys Leu Met Ser Val Asn Ala Leu Glu Ala Ile Arg Phe Tyr Val
1 5 10 15

Ser Phe Ala Cys Ser Phe Ala Phe Ala Glu Arg Lys Leu Met Glu Gly
20 25 30

Asn Ala Lys Ile Ile Arg Leu Ile Ala Arg Asp Glu Ala Leu His Leu
35 40 45

Thr Gly Thr Gln
50

<210> 22

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 22

Cys Ser Leu Asn Leu Gln Leu Val Gly Glu Ala Cys Phe Thr Asn Pro
 1 5 10 15

Leu Ile Val Ala Val Thr Glu Trp Ala Ala Ala Asn Gly Asp Glu Ile
 20 25 30

Thr Pro Thr Val Phe Leu Ser Ile Glu Thr Asp Glu Leu Arg His Met
 35 40 45

Ala Asn Gly Tyr
 50

<210> 23

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 23

Cys Ser Val Asn Leu Gln Leu Val Gly Glu Ala Cys Phe Thr Asn Pro
 1 5 10 15

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

Thr Pro Thr Val Phe Leu Ser Val Glu Thr Asp Glu Leu Arg His Met
 35 40 45

Ala Asn Gly Tyr
 50

<210> 24

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 24

Phe Leu Thr Ala Val Ser Phe Ser Phe Glu Tyr Val Leu Thr Asn Leu
1 5 10 15

Leu Phe Val Pro Phe Met Ser Gly Ala Ala Tyr Asn Gly Asp Met Ala
20 25 30

Thr Val Thr Phe Gly Phe Ser Ala Gln Ser Asp Glu Ala Arg His Met
35 40 45

Thr Leu Gly Leu
50

<210> 25

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 25

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

Gln Phe Leu Gly Leu Ala Ala Asp Ala Ala Glu Ala Gly Asp Tyr Thr
20 25 30

Phe Ala Asn Leu Ile Ser Ser Ile Gln Thr Asp Glu Ser Arg His Ala
35 40 45

Gln Gln Gly Gly
50

<210> 26
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência da figura 3
 <400> 26

Tyr Leu Gly Phe Ile Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Arg Ala Thr Phe Ile
 1 5 10 15

Ser His Gly Asn Thr Ala Arg Gln Ala Lys Glu His Gly Asp Ile Lys
 20 25 30

Leu Ala Gln Ile Cys Gly Thr Ile Ala Ala Asp Glu Lys Arg His Glu
 35 40 45

Thr Ala Tyr Thr
 50

<210> 27
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência da figura 3
 <400> 27

Tyr Leu Gly Phe Ile Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Arg Ala Thr Phe Ile
 1 5 10 15

Ser His Gly Asn Thr Ala Arg Leu Ala Lys Glu His Gly Asp Ile Lys
 20 25 30

Leu Ala Gln Ile Cys Gly Thr Ile Thr Ala Asp Glu Lys Arg His Glu
35 40 45

Thr Ala Tyr Thr
50

<210> 28

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 28

Tyr Leu Gly Phe Ile Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Arg Ala Thr Phe Val
1 5 10 15

Ser His Gly Asn Thr Ala Arg His Ala Lys Asp His Gly Asp Val Lys
20 25 30

Leu Ala Gln Ile Cys Gly Thr Ile Ala Ser Asp Glu Lys Arg His Glu
35 40 45

Thr Ala Tyr Thr
50

<210> 29

<211> 53

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 29

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

Ser His Gly Asn Ser Ala Arg Leu Ala Lys Glu His Gly Asp Leu Lys
 20 25 30

Met Ala Gln Ile Cys Gly Ile Ile Ala Ser Asp Glu Lys Arg His Glu
 35 40 45

Thr Ala Tyr Thr Lys
 50

<210> 30

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 30

Tyr Leu Gly Phe Ile Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Arg Ala Thr Phe Ile
 1 5 10 15

Ser His Gly Asn Thr Ala Arg Gln Ala Lys Glu His Gly Asp Leu Lys
 20 25 30

Leu Ala Gln Ile Cys Gly Thr Ile Ala Ala Asp Glu Lys Arg His Glu
 35 40 45

Thr Ala Tyr Thr
 50

<210> 31

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 31

Tyr Leu Gly Phe Val Tyr Thr Ser Leu Arg Lys Gly Val Thr Phe Val
1 5 10 15

Ser His Gly Asn Thr Ala Arg Leu Ala Lys Glu His Gly Asp Met Lys
20 25 30

Leu Ala Gln Ile Cys Gly Ser Ile Ala Ala Asp Glu Lys Arg His Glu
35 40 45

Thr Ala Tyr Thr
50

<210> 32

<211> 52

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência da figura 3

<400> 32

Tyr Leu Gly Phe Ile Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Arg Ala Thr Phe Ile
1 5 10 15

Ser His Gly Asn Thr Ala Arg Leu Ala Lys Asp His Gly Asp Met Lys
20 25 30

Leu Ala Gln Ile Cys Gly Ile Ile Ala Ala Asp Glu Lys Arg His Glu
35 40 45

Thr Ala Tyr Thr
50

<210> 33
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência da figura 3
 <400> 33

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

Ser His Ala Asn Thr Ala Lys Leu Ala Gln His Tyr Gly Asp Lys Asn
 20 25 30

Leu Ala Gln Val Cys Gly Asn Ile Ala Ser Asp Glu Lys Arg His Ala
 35 40 45

Thr Ala Tyr Thr
 50

<210> 34
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Sequência da figura 3
 <400> 34

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

Ser His Arg Asn Thr Gly Lys Ala Cys Asn Asp Pro Val Ala Asp Gln
 20 25 30

Leu Met Ala Lys Ile Ser Ala Asp Glu Asn Leu His Met Ile Phe Tyr
35 40 45

Arg

05-08-2008

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição farmacêutica compreendendo um polipéptido tendo a sequência:

```

M S A K L T D L Q L L H E L E P V V E K Y L N R H
L S M H K P W N P H D Y I P W S D G K N Y Y A L G G
Q D W D P D Q S K L S D V A Q V A M V Q N L V T E D
N L P S Y H R E I A M N M G M D G A W G Q W V N R W
T A E E N R H G I A L R D Y L V V T R S V D P V E L
E K L R L E V V N R G F S P G Q N H Q G H Y F A E S
L T D S V L Y V S F Q E L A T R I S H R N T G K A C
N D P V A D Q L M A K I S A D E N L H M I F Y R D V
S E A A F D L V P N Q A M K S L H I L S H F Q M P G
F Q V P E F R R K A V V I A V G G V Y D P R I H L D
E V V M P V L K K W C I F E R E D F T G E G A K L R
D E L A L V I K D E L A C D K F E V S K Q R Q L D R
E A R T G K K V S A H E L H K T A G K L A M S R R

```

2. Uma composição farmacêutica compreendendo um péptido tendo parte da sequência de aminoácido do polipéptido de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o referido péptido ser reconhecido por anticorpos presentes nos soros de pacientes infectados por bactérias da espécie *Mycobacterium*.

3. Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por o referido péptido ser reconhecido por anticorpos presentes nos soros de pacientes infectados pela *Mycobacterium tuberculosis*.

4. Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por o referido péptido ser reconhecido por anticorpos presentes nos soros de pacientes infectados pela *Mycobacterium bovis*.

5. Uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por o referido péptido ser

reconhecido por anticorpos presentes nos soros de pacientes infectados pela *Mycobacterium leprae*.

6. Um anticorpo policlonal ou monoclonal que reconhece um polipéptido ou um péptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4.

7. Um processo para a detecção de uma resposta de anticorpo a uma infecção com uma bactéria da espécie *Mycobacterium* numa amostra biológica de um paciente humano, caracterizado por compreender os passos de:

a) pôr em contacto um polipéptido purificado de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5 com a amostra biológica;

b) detectar complexos formados entre o polipéptido e os anticorpos presentes na amostra biológica.

8. O processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por a bactéria ser *Mycobacterium leprae*.

9. O processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por a bactéria ser *Mycobacterium tuberculosis*.

10. O processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por a bactéria ser *Mycobacterium bovis*.

05-08-2008

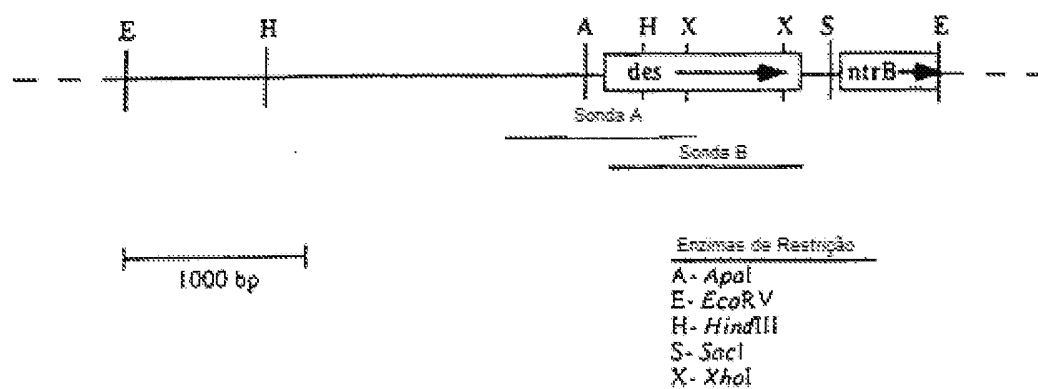


FIG. 1

2/10

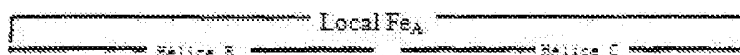
1 GATCATCATCGGCCGGCTGCCGCGCAGGGCGCCGACACCGGCGAGTGGGGCGCGAGGATCGGCCCCAC
 71 CAGTTCGGCAGCTGCGTGTGATGCGCTCCACAATCCCGGAAACAGCTCGACCATTACCTCTCAATAT
 141 GAGCCTCGAAAACTTGCCGCTGTGCGGGCGTCTGGTGAGCGCACACAACACTGTTAGCTGACCAGC
 211 AGGATCGGCGCTCTTACCGGTCTGTTACCGCATATCTGAACGGACGGCTGGGAGCCACCCGCAAGCAAT
 281 TCATCGACTACTGCGTCAACATGTTGCTCAGCACCGCCGCCACCTACGCACCGCACCGCGAGCGGGAGA
 351 ATCCGAACACTCCATCCCAGCCGGGCCGCAACTGAGGACGACTGGGGTTACCCCCACGGGCCACCGG
 421 GGCCCGCGGATGCCAGCATCCTGCCGCTGCTGGCAGCTCAACATGCCGCGGAAGCCCAAACCTTGATGC
 491 TACCGAGAGACACAGATATATTGACTGCAACCATTAGACACAGATAACTGGAGGCGCCATGTCAGCCAAG
 M S A K
 561 CTGACCGACCTGCAGCTGCTGCACGAACCTGAACCGGTGCTCGAGAAGTACCTGAACCGGCACCTGAGCA
 L T D L Q L L H E L E P V V E K Y L N R H L S M
 631 TGCACAAGCCCTGGAACCCGCAGACTACATCCCGTGGTGGGACGGGAAGAACTACTACGCGCTCGGGCG
 H K P W N P H D Y I P W S D G K N Y Y A L G G
 701 GCAGGATTGGGACCCCGACCGAGCAAGCTTTCTGATGTGCCCCAGGTGGCGATGGTGCAGAACCTGGTC
 Q D W D P D Q S K L S D V A Q V A M V Q N L V
 771 ACCGAGGACAACCTGCCGTCGTATCACCGCGAGATCGCGATGAACATGGGCATGGACGGCGCGTGGGGGC
 T E D N L P S Y H R E I A M N M G M D G A W G Q
 841 AGTGGGTCAACCGTTGGACCGCCGAGGAGAATCGGCACGGCATCGCGCTGCGCGACTACCTGGTGGTGAC
 W V N R W T A E E N R H G I A L R D Y L V V T
 911 CCGATCGGTGACCCCTGTGAGTTGGAGAACTTCGCTCGAGGTAGTCAACCGGGGCTTCAGCCCAGGC
 R S V D P V E L E K L R L E V V N R G F S P G
 981 CAAAACCACCAGGGCCACTATTTGCGGAGAGCCTCACCGACTCCGTCTCTATGTGAGTTTCCAGGAAC
 Q N H Q G H Y F A E S L T D S V L Y V S F Q E L
 1051 TGGCAACCCGGATTTCGCACCGCAATACCGGCAAGGCATGTAACGACCCCGTCCCGACCGAGCTCATGGC
 A T R I S H R N T G K A C N D P V A D Q L M A
 1121 CAAGATCTCGGCAGACGAGAATCTGCACATGATCTTCTACCGCGACGTGAGCGAGGCCGCTTCGACCTC
 K I S A D E N L H M I F Y R D V S E A A F D L
 1191 GTGCCCAACCAGGCCATGAAGTCGCTGCACCTGATTTTGAGCCACTTCAGATGCCCGGCTTCCAAGTAC
 V P N Q A M K S L H L I L S H F Q M P G F Q V P
 1261 CCGAGTTCGGCGCAAAGCCGTGGTCATCGCCGTGGGGGTGTCTACGACCCGCGCATCCACCTCGACGA
 E F R R K A V V I A V G G V Y D P R I H L D E
 1331 AGTCGTCATGCCGGTACTGAAGAAATGGTGTATCTTCGAGCGCGAGGACTTCACCGCGAGGGGGCTAAG
 V V M P V L K K W C I F E R E D F T G E G A K
 1401 CTGCGCGACGAGCTGGCCCTGGTGATCAAGGACCTCGAGCTGGCCTGCGACAAGTTTCGAGGTGTCCAAGC
 L R D E L A L V I K D L E L A C D K F E V S K Q
 1471 AACGCCAACTCGACCGGAAGCCCGTACGGGCAAGAAGGTCAGCGCACACGAGCTGCATAAAACCGCTGG
 R Q L D R E A R T G K K V S A H E L H K T A G
 1541 CAAACTGGCGATGAGCCGTGTTAGCCCGGCGACGATGCAGAGCGCGCAGCGCGATGAGCAGGAGGCGGG
 K L A M S R R *

FIG. 2A

3/10

1611 CAATCCAACCCAGCCCGGCGACGATGCAGAGCGCGCAGCGGATGAGCAGGAGGTGGGCAATCCAACCCA
1661 GCCCGGCGTTG

FIG. 2B



Redutases ribonucleótidas

v01555 448 EFYKFLFTFL AMA [E] KLVNEN IDELVTSFES HDIDHYYTEQKAM [ENRH] GETYA 567
 K02672 672 IFISNLKYQT LL [D] SIQGRSP NVALLPLIST PELETNVTWAFS [ETIH] SRSYT 120

Hidroxilases hidrocarboneto

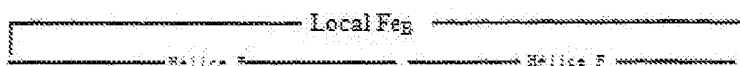
m58499 102 ETHKVVSNFL EVC [E] YNAIAA TGNLWDSQA AEQKNGYLAQVL [D] [EIRH] THQCA 152
 x55394 102 ETHKVISNFL EVC [E] YNAIAA SANLWDSATA AEQKNGYLAQVL [D] [EIRH] THQCA 152
 m60276 497 NALKLFLTAV SPL [E] YQAFQC FSRVGRPFSC AGARVACONQAI [D] [ELRH] VQTOV 147
 m65106 292 STLKSHYGAI AVQ [E] YAAVTC EGRMARFSKA PCENRMATFCNM [D] [ELRH] GQLQL 142

Desaturases de esrearoil-ACP

m59857 111 LVGDHITEEA LPTYQTHLNT LDCVRDETGA SPTSWAINTRANTA [E] [ENRH] GOLLN 184
 m59858 111 LVGDHITEEA LPTYQTHLNT LDCVRDETGA SPTSWAINTRANTA [E] [ENRH] GOLLN 184
 m61109 111 LVGDHITEEA LPTYQTHLNT LDCVRDETGA SLTPWAINTRANTA [E] [ENRH] GOLLN 184
 x62898 134 LVGDHITEEA LPTYQTHLNT LDCVRDETGA SPTSWAINTRANTA [E] [ENRH] GOLLN 184
 x60978 114 LVGDHITEEA LPTYQTHLNT LDCVRDETGA SPTSWAINTRANTA [E] [ENRH] GOLLN 184
 m91238 110 LIGDNITEEA LPTYQTHINT LDCVRDETGA TVTPWAINTRANTA [E] [ENRH] GOLLN 184
 x70962 111 LVGDHITEEA LPTYQTHLNT LDCVRDETGA SLTPWAINTRANTA [E] [ENRH] GOLLN 184
 m93115 121 LVGDHITEEA LPTYHSLNR CCGIKDDTGA QPTSWAT-TRANTA [E] [ENRH] GOLLN 182

Proteína DES de M. tuberculosis

Mtb.des 442 SDVAQVAMVO NLVTEDNLP5 YKREIAMNHC XDGAMQWVNNTA [E] [ENRH] GIALR 155



Redutases ribonucleótidas

v01555 148 EKILVFLLI [E] GTFPISSPYS IALLRVGLN PGICLADYISA [D] [ELRH] TRAAS 184
 K02672 219 LCLMSVNAH [E] AIRFYVSFAC SFAPAERELM EGNAKIIPLIAR [D] [EALH] LTOTO 304

Hidroxilases hidrocarboneto

m58499 219 CGLNLQLVC [E] ACFTNPLIVA VTEWAAAGND EITPTVFLSIET [D] [ELRH] MANDY 261
 x55394 200 CENVLQLVC [D] TCFTNPLIVA VTEWAAAGND EITPTVFLSVET [D] [ELRH] MANDY 261
 m60276 144 FLTAVSFSF [E] YVLTHLLFYF FMGGAAYNGS MATVTFCFSAQS [D] [EARN] MTLGL 212
 m65106 136 VAINLTFSP [E] TCFTNMQLC LAADAAGND YTFANLISSTQT [D] [ESRH] AQCCQ 211

Desaturases de esrearoil-ACP

m59857 118 YLGFIVTSFC [E] RATFISHGN TARQAKENGQ IKLAQICGTIAA [D] [EKRR] ETAYT 216
 m59858 118 YLGFIVTSFC [E] RATFISHGN TARLAKENGQ IKLAQICGTITA [D] [EKRR] ETAYT 216
 m61109 119 YLGFIVTSFC [E] RATFVSHGN TARKANDHGD VKLAQICGTIAS [D] [EKRR] ETAYT 216
 x62898 122 YLGFIVTSFC [E] RATFVSHGN SARLAKENGQ LNMAQICGTIAS [D] [EKRR] ETAYT 216
 x60978 121 YLGFIVTSFC [E] RATFISHGN TARQAKENGQ LKLAQICGTIAA [D] [EKRR] ETAYT 216
 m91238 116 YLGFIVTSLR [E] GVTFVSHGN TARLAKENGQ MKLAQICGTIAA [D] [EKRR] ETAYT 216
 x70962 114 YLGFIVTSFC [E] RATFISHGN TARLAKENGQ HKLAQICGTIAA [D] [EKRR] ETAYT 216
 m93115 207 YMGFIVTSFC [E] RATFISHAN TAKLAQHYGD ENLAQVCGNIAS [D] [EKRR] ATAYT 218

Proteína DES de M. tuberculosis

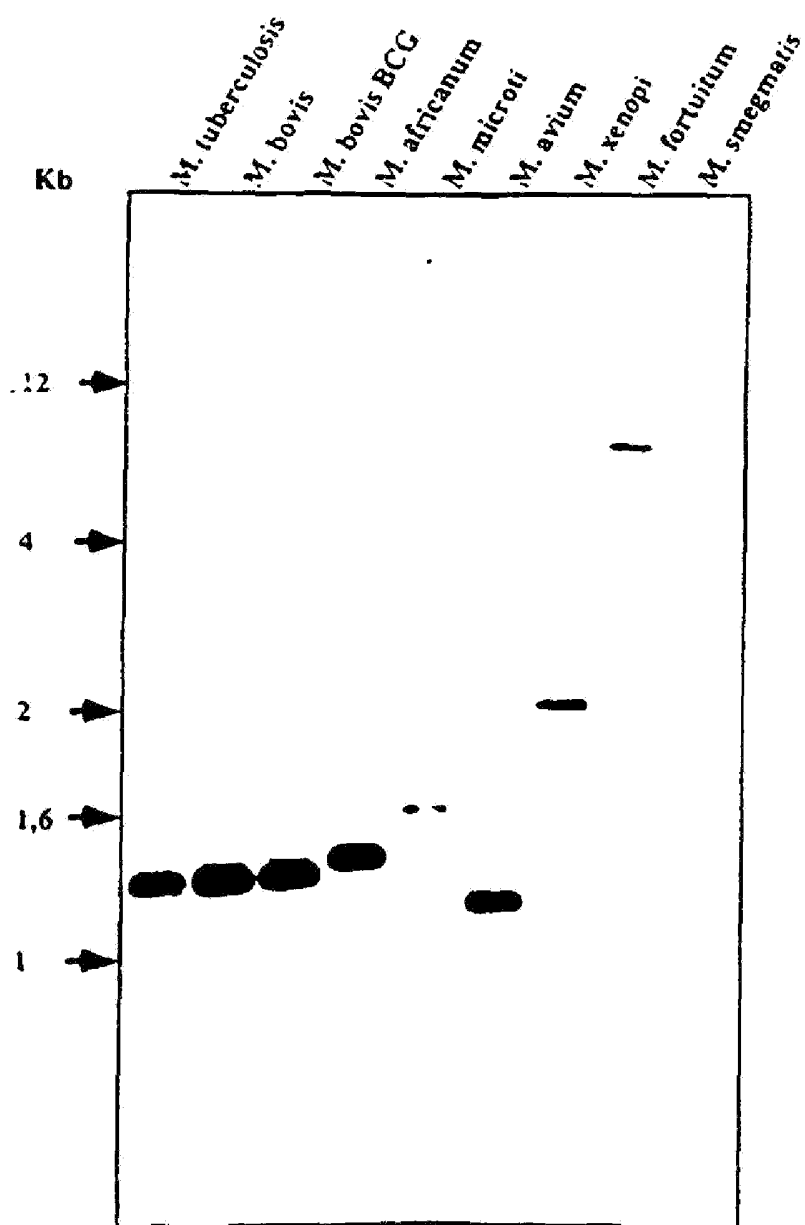
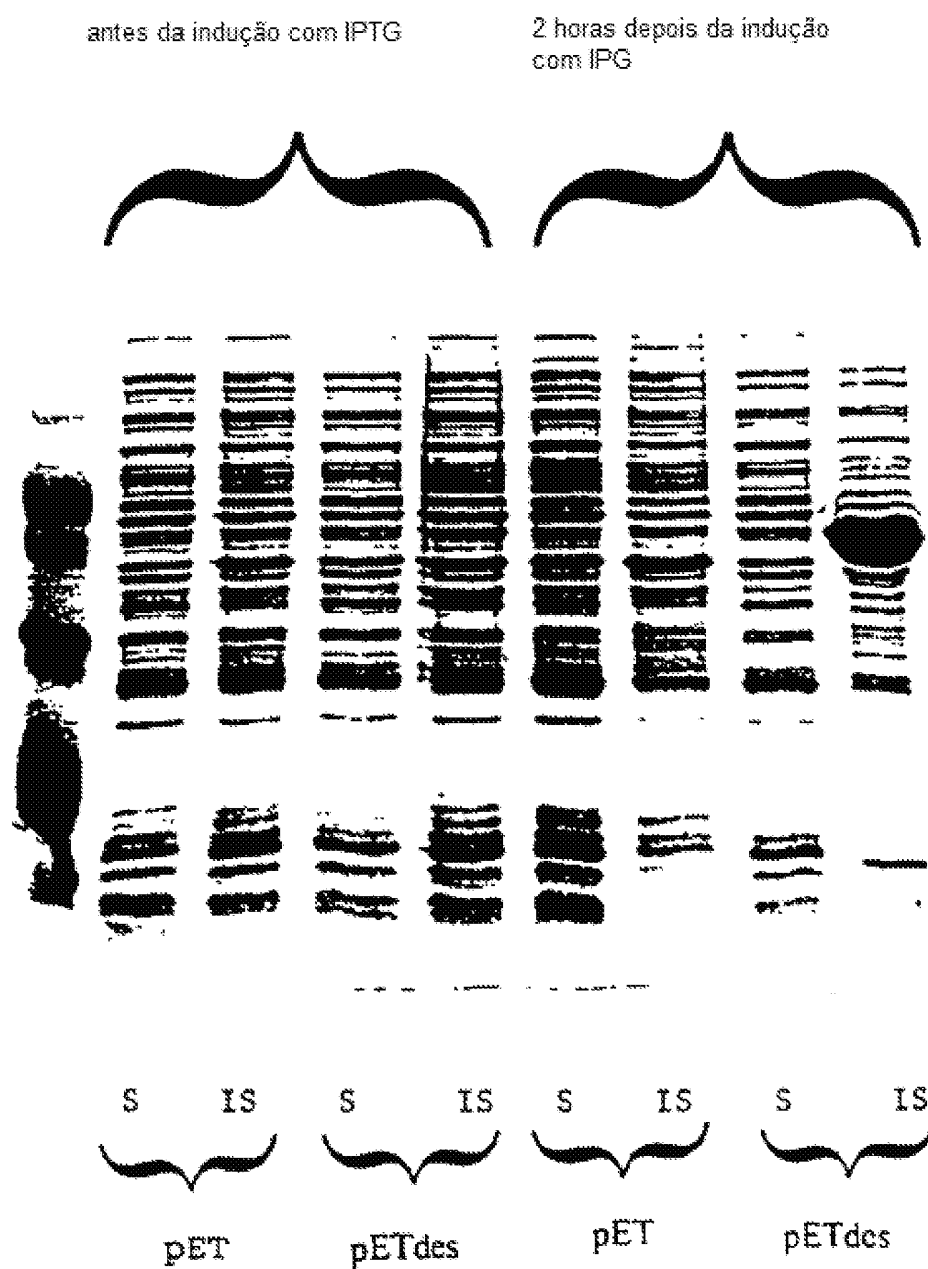


FIG. 4



S : fracção solúvel
IS : fracção proteica insolúvel

FIG. 5

ELISA do antígeno DES

Respostas médias de pacientes tuberculosos infectados por *M. tuberculosis* ou por *M. bovis* e de pacientes não tuberculosos

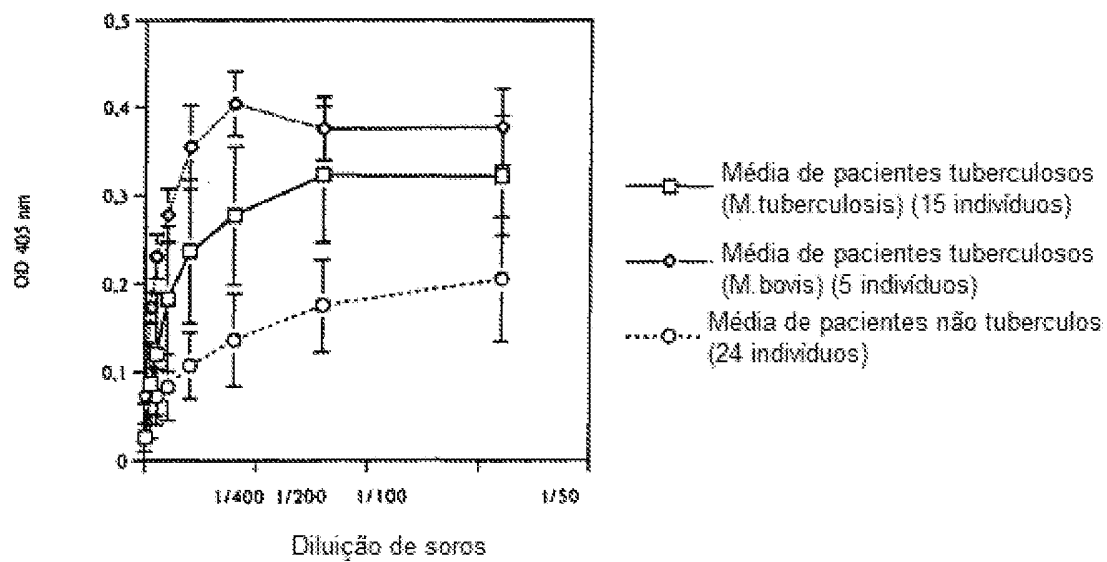


FIG. 6

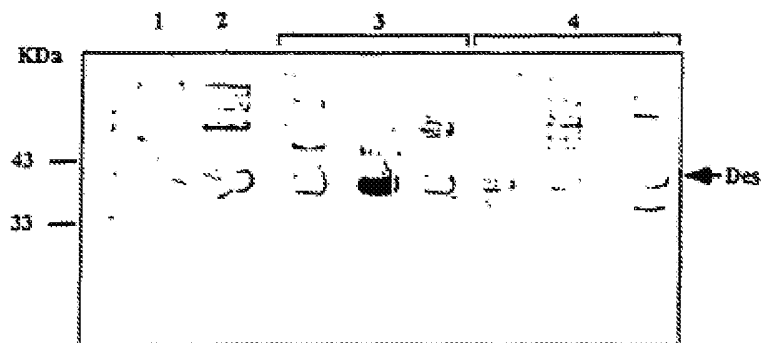
1 GATCATCATCGGCGGCTGCGCGGCAAGGCGCGGACACCGCGAGTCCGCGCGGAGGATCGGCGCGGAC
 71 CAGTTCCGACAGCTCGGTTGTCGATGCGCTCCACAATCCCGGGAACAGCTCGACCATACCTCTCAATAT
 141 GAGCCTCGAAAACTTCCGCTGTGCGCGCGTGTGCTGAGCGCACACAACACTGTTACCTGACGAGC
 211 AGGATCGCGCTCTTACCGTCTGTTACCGCATATCTGAACGGACCGCTCGGAGCCACCGGCAAGCAAT
 281 TCATCGACTACTCGCTCAACATGTTGCTCAGCACCGCGCCACCTACCGACCGACCGCGAGCGCGGAGA
 351 ATCCGAACACTCCATCCAGCGCGGCGGACAACTGAGGACGACTCGGTTCACTCCACCGCGCCACCGG
 421 GCGCGCGGATCGCGAGCATCTGCGCGCTGCTCGGAGCTCAACATCCCGCGGAAGCCCAAC TGTGATG
 -10 +1
 491 TACCGAGAGACACAGATATATTTGACTGCAACCATAGACACAGATAACT GATCGCGCATGTCAGGCAAG
 M S A K
 561 CTGACCGACCTGCGAGCTGCTGCACGAACCTGAACCGGTGCTCGAGAAGTACCTGAACCGGACCTGAGCA
 L T D L Q L L H E L E P V V E K Y L N R H L S H
 631 TCCACAAGCCCTCGAACCCTCAGCACTACATCCCGTGTGCGACGGGAAGAACTACTACCGCTCGCGCG
 H K P W N P H D Y I P W S - D G K N Y Y A L G G
 701 GCAGGATTGGGACCGCGACGAGCAAGCTTTCTGATGTCGCGCGAGTGGCGATGCTGCAGAACCTGCTC
 Q D W D P D Q S K L S D V A Q V A M V Q N L V
 771 ACCGAGGACAACCTGCGCTGATCACCGGAGATCGCATGAACATGGCGATGACCGCGCGTGGCGCGC
 T E D N L P S Y H R E I A M N H G M D G A W G Q
 841 AGTGGGTCAACCGTTGAGCGCGGAGGAGATCGCGACCGCATCGCGTGGCGGACTACCTGCTGCTGAC
 W V N R W T A E E N R H G I A L R D Y L V V T
 911 CCGATCGGTGACCGCTGTGAGTTGAGAACTTGGCTCGAGTACTCAACCGCGCTTCAGCGCAAGC
 R S V D P V E L E K L R L E V V N R G F S P G
 981 CAAAACCAACCGCGCACTATTTCGCGAGAGCCCTACCGACTCCCTCTCTATGTCAGTTTCAGGAAC
 Q N H Q G H Y F A E S L T D S V L Y V S F Q E L
 1051 TGGCAACCGGATTTCCGACCGCAATACCGGCAAGCATGTAAAGACCGCTGTCGCGACGAGCTCATGCG
 A T R I S H R N T G K A C N D P V A D Q L M A
 1121 CAAGATCTCGGACAGGAGAATCTGCACATGATCTTCTACCGGAGCTCAGCGAGCGCGCTTCGAGCTC
 K I S A D E N L H M I F Y R D V S E A A F D L
 1191 GTCCCGAACCGCGCATGAAGTCCCTGCACTGATTTGAGCCACTTCAGATGCGCGCGCTTCCAAGTAC
 V P N Q A M K S L H L I L S H F Q M P G F Q V P
 1251 CCGAGTTCCCGCGCAAGCGCTGCTCATCGCGCTGCGCGGTGCTTACGACCGCGCGCATCCAGCTGACGA
 E F R R K A V V I A V G C V Y D P R I H L D E
 1331 AGTCGTCATCGCGTACTGAAGAAATGCTGTATCTTCGAGCGCGAGGACTTCACCGCGAGCGCGCTAAG
 V V M P - V L K K W C I F E R E D F T G E G A K
 1401 CTGCGCGACGAGCTGCGCTGTCATCAAGGACCTCGAGCTGCGCTGCGACAAGTTTCAGCGTCTCGAAGC
 L R D E L A L V I K D L E L A C D K F E V S K Q
 1471 AACCGCAACTCGACCGGAAGCGCGTACCGGCAAGAGTCAAGCGCACAGGAGCTGCATAAAACCGCTCG
 R Q L D R E A R T G K K V S A H E L H K T A G
 1541 CAAACTCGCGATGAGCGCTGTTAGCGCGCGGACGATGACAGCGCGCGAGCGCGATGAGC
 K L A M S R R

FIG. 7

Estirpe ou plasmídeo	Características relevantes
<i>E. coli</i> DH5 α	F/endA1 <i>hsdR</i> 17(r _k ⁻ m _k ⁻) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA</i> 1 <i>gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA</i> 1 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (Φ 80d/ <i>lac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT</i> <i>hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻ ; uma estirpe B de <i>E. coli</i>) com profago λ transportando o gene polimerase ARN T7
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	Elevada transformação mutante de <i>M. smegmatis</i> ATCC607
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Estirpe virulenta de micobacterium isolada originalmente a partir de paciente tuberculoso
pBluescript KS ⁻	Fagomídeo derivado do vector de clonagem pUC19
pYUB18	Vector transportador (Km) ^R usado para a construção de uma biblioteca de cosmídeos de <i>M. tuberculosis</i>
pJEM11	Vector transportador <i>E. coli</i> -micobacterium transportando um gene <i>phoA</i> truncado
pET14b	Derivado pBR322 contendo um promotor T7 para expressão de ADNs alvo
pExp421	Vector pJEM11 transportando a inserção de 1,1 kb da fusão <i>des-PhoA</i>
pBS-des	Vector pBluescript KS ⁻ transportando a inserção de 4,5 kb <i>EcoRV</i> contendo o gene <i>des</i>
pET-des	Vector pET14b transportando o produto de amplificação PCR (JD8-JD9) <i>des</i>

FIG. 8

10/10



1. Pool de soros de bovino tuberculoso
2. Pool de soros de pacientes com lepra lepromatosa
3. Soros individuais de pacientes tuberculosos infectados por *M. bovis*
4. Soros individuais de pacientes tuberculosos infectados por *M. tuberculosis*

FIG. 9