

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

(21) **PI0613168-9 A2**

(22) Data de Depósito: 29/06/2006
(43) Data da Publicação: 21/12/2010
(RPI 2085)



(51) Int.Cl.:
C07K 14/35
C12Q 1/68
A61K 39/04
G01N 33/569

(54) Título: MOLÉCULA DE POLIPEPTÍDEO ISOLADA; MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA; VETOR OU PLASMÍDEO; CÉLULA HOSPEDEIRA; ANTICORPO; PROTEÍNA DE FUSÃO; MÉTODO PARA ESTIMULAR UMA RESPOSTA IMUNOGÊNICA ESPECÍFICA À TB EM UM INDIVÍDUO OU PARA PREVENIR OU REDUZIR A GRAVIDADE DE DOENÇA CAUSADA PELA TB; MÉTODO PARA MONITORAR O TRATAMENTO DA DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO DE DISTINÇÃO ENTRE A DOENÇA CAUSADA PELA TB E A IMUNIDADE À DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR M. TUBERCULOSIS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA; COMPOSIÇÃO; KIT PARA DIAGNÓSTICO DA PRESENÇA OU DA AUSÊNCIA DE INFECÇÃO POR M. TUBERCULOSIS EM UMA PESSOA; E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(57) Resumo: MOLÉCULA DE POLIPEPTÍDEO ISOLADA; MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA; VETOR OU PLASMÍDEO; CÉLULA HOSPEDEIRA; ANTICORPO; PROTEÍNA DE FUSÃO; MÉTODO PARA ESTIMULAR UMA RESPOSTA IMUNOGÊNICA ESPECÍFICA A TB EM UM INDIVÍDUO OU PARA PREVENIR OU REDUZIR A GRAVIDADE DE DOENÇA CAUSADA PELA TB; MÉTODO PARA MONITORAR O TRATAMENTO DA DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO DE DISTINÇÃO ENTRE A DOENÇA CAUSADA PELA TB E A IMUNIDADE A DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR M. TUBERCULOSIS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA; COMPOSIÇÃO; KIT PARA DIAGNÓSTICO DA PRESENÇA OU DA AUSÊNCIA DE INFECÇÃO POR M. TUBERCULOSIS EM UMA PESSOA; E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção refere-se a antígenos isolados da Tuberculose (TB), que são úteis em composições terapêuticas e vacinais para estimular uma resposta imunológica específica à TB. Os antígenos também são úteis em ensaios para diagnóstico para determinar a presença da TB ativa em um indivíduo. Consequentemente, a presente invenção inclui moléculas de polipeptídeos, moléculas de ácidos nucleicos, composições para vacina, ensaios para diagnóstico e métodos de diagnóstico e monitoramento do tratamento relacionado a estes antígenos de TB.

(30) Prioridade Unionista: 01/07/2005 US 60/696,439,
14/09/2005 US 60/717,062

(73) Titular(es): FORSYTH DENTAL INFIRMARY FOR CHILDREN

(72) Inventor(es): ANTONIO CAMPOS-NETO, SUELY S.
KASHINO

(74) Procurador(es): Vieira de Mello, Werneck Alves -
Advogados S/C

(86) Pedido Internacional: PCT US2006025620 de 29/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/005627 de 11/01/2007

MOLÉCULA DE POLIPEPTÍDEO ISOLADA; MOLÉCULA DE
ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA; VETOR OU PLASMÍDEO; CÉLULA
HOSPEDEIRA; ANTICORPO; PROTEÍNA DE FUSÃO; MÉTODO PARA
ESTIMULAR UMA RESPOSTA IMUNOGÊNICA ESPECÍFICA À TB EM UM
5 INDIVÍDUO OU PARA PREVENIR OU REDUZIR A GRAVIDADE DE DOENÇA
CAUSADA PELA TB; MÉTODO PARA MONITORAR O TRATAMENTO DA
DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO DE
DIAGNÓSTICO DE DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO;
MÉTODO DE DISTINÇÃO ENTRE A DOENÇA CAUSADA PELA TB E A
10 IMUNIDADE À DOENÇA CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO
PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR M. TUBERCULOSIS EM UMA
AMOSTRA BIOLÓGICA; COMPOSIÇÃO; KIT PARA DIAGNÓSTICO DA
PRESENÇA OU DA AUSÊNCIA DE INFECÇÃO POR M. TUBERCULOSIS EM
UMA PESSOA; E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

15 FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

Mais de um terço da população mundial está infectada com *Mycobacterium tuberculosis*, a bactéria que causa a doença Tuberculose (TB). Em cada ano, 8 milhões de pessoas são infectadas com TB e 2 milhões de pessoas morrem da
20 doença. A TB afeta significativamente os países em desenvolvimento e também está se tornando um problema crescente nas áreas desenvolvidas do mundo.

As pessoas infectadas com a TB podem ser assintomáticas durante um período de tempo considerável e podem
25 estar em um estágio latente da doença. No seu estado ativo, a doença é freqüentemente manifestada com uma inflamação aguda dos pulmões, resultando em febre e uma tosse improdutiva. Se não tratada, ocorrem complicações graves e tipicamente morte. Os ensaios de diagnóstico atuais são

freqüentemente inacurados e são incapazes de distinguir entre pessoas no estado latente da doença e aquelas no estágio ativo. Atualmente, a vacinação com bactérias vivas é um método para a imunização de pessoas contra a doença.

5 Entretanto, a vacinação da TB com certas bactérias vivas tem sido freqüentemente a fonte de controvérsia em alguns países, incluindo os Estados Unidos e conseqüentemente não tem sido mais colocada em uso amplamente espalhado nos EUA. Adicionalmente, os testes de diagnóstico atuais são
10 muitas vezes incapazes de distinguir entre pessoas que foram imunizadas e pessoas infectadas com TB.

A vacinação eficiente e o diagnóstico precoce acurado da doença são importantes para controlar a doença. Conseqüentemente, existe uma necessidade de ensaios de
15 diagnóstico eficientes que detectem a infecção ativa pelas bactérias da TB. Existe ainda uma necessidade de uma vacina que não utilize uma bactéria viva e forneça uma resposta imunogênica protetora para a doença.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

20 A presente invenção se refere a moléculas de polipeptídeos isoladas que possuem uma parte imunogênica de um antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* ou uma variação do antígeno que difere apenas em substituições e/ou modificações conservativas. O antígeno possui uma seqüência de
25 aminoácidos das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas; ou uma seqüência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucléico que possui uma seqüência das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13,

15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; a região codificadora das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma
5 combinação das mesmas; um complemento das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; ou uma sequência que se hibridiza (por exemplo, sob condições de alta estringência) com as SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
10 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas. Em uma modalidade, a molécula de polipeptídeo isolada estimula uma resposta imunogênica específica para a Tuberculose (TB) em um hospedeiro ou um animal (por exemplo, ser humano, camundongo,
15 porco, cabra, macaco). Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui uma molécula de polipeptídeo isolada de uma parte imunogênica de um antígeno de *M. tuberculosis*, em que o antígeno compreende uma sequência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucléico que possui mais que
20 ou igual a aproximadamente 70% de identidade (por exemplo, aproximadamente 80% de identidade, 90% de identidade, aproximadamente 95% de identidade) com qualquer uma das sequências citadas anteriormente. A presente invenção, em uma modalidade, inclui uma molécula de polipeptídeo isolada,
25 em que a sequência de aminoácidos possui mais que ou igual a aproximadamente 70% de similaridade (por exemplo, aproximadamente 80% de similaridade, aproximadamente 90% de similaridade, aproximadamente 95% de similaridade) às sequências citadas aqui.

A presente invenção incorpora ainda moléculas de ácidos nucleicos que codificam moléculas de polipeptídeos que possuem uma parte imunogênica de um antígeno de *M. tuberculosis* ou uma variação do antígeno que difere apenas em substituições e/ou modificações conservativas. O antígeno é codificado por uma molécula de ácido nucleico que possui uma seqüência das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; a região codificadora das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; um complemento das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; que se hibridiza (por exemplo, sob condições de alta estringência) com as SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; ou que codifica as SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas. A molécula de ácido nucleico isolada codifica uma molécula de polipeptídeo que estimula uma resposta imunogênica específica à TB. A presente invenção inclui ainda moléculas de ácidos nucleicos isoladas que codificam uma molécula de polipeptídeo que possui uma parte imunogênica de um antígeno de *M. tuberculosis*, em que o antígeno é codificado por uma molécula de ácido nucleico que possui mais que ou igual a aproximadamente 70 % de identidade (por exemplo, aproximadamente 80% de identidade,

90% de identidade, aproximadamente 95% de identidade) das seqüências citadas. A presente invenção, em uma modalidade, inclui moléculas de ácidos nucleicos isoladas que codificam moléculas de polipeptídeos cuja seqüência possui mais que
5 ou igual a aproximadamente 70% de similaridade (por exemplo, aproximadamente 80% de similaridade, aproximadamente 90% de similaridade, aproximadamente 95% de similaridade) com as seqüências citadas aqui.

Ainda uma outra modalidade da invenção inclui
10 vetores, plasmídeos e células hospedeiras que contêm as moléculas de ácidos nucleicos ou codificam as moléculas de polipeptídeos descritas aqui. A célula hospedeira pode ser qualquer célula incluindo, por exemplo, células de *E. coli*, levedura e de mamífero. A presente invenção inclui adicionalmente sondas que se hibridizam sob condições de
15 estringência (por exemplo, alta ou moderada) com as moléculas de ácidos nucleicos descritas aqui.

A presente invenção inclui anticorpos que se ligam a uma ou mais das moléculas de polipeptídeos descritas
20 aqui. O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal. A invenção se refere ainda a proteínas de fusão que compreendem uma ou mais moléculas de polipeptídeos descritas aqui (por exemplo, duas moléculas de polipeptídeos). Em adição ao fato de incluir as moléculas
25 de polipeptídeos da presente invenção, a proteína de fusão também pode incluir antígenos de *M. tuberculosis*, incluindo aqueles apresentados em uma molécula de MHC de Classe 2 (por exemplo, um antígeno de TB na via de células T CD4+).

A presente invenção inclui métodos para a estimulação de uma resposta imunogênica específica à TB em um indivíduo, prevenindo ou reduzindo a gravidade da doença TB, através da administração de uma quantidade de uma ou
5 mais das moléculas de polipeptídeos ou das moléculas de ácidos nucleicos descritas aqui (por exemplo, em um carreador). Em um outro aspecto, a presente invenção inclui composições (por exemplo, composições vacinais ou composições farmacêuticas) que possuem as moléculas de polipeptí-
10 deos ou as moléculas de ácidos nucleicos descritas aqui, em um carreador fisiologicamente aceitável. A composição também pode incluir ou pode ser co-administrada com um intensificador da resposta imunológica (por exemplo, um adjuvante, um outro antígeno de TB, uma citocina ou uma
15 quimiocina imunoestimuladora). Os exemplos de adjuvantes incluem 3D-MPL e QS21. A composição pode ser formulada em uma emulsão de óleo em água.

A presente invenção incorpora ainda métodos para o monitoramento do tratamento da doença TB em um indivíduo.
20 Os métodos incluem a detecção do nível de um ou mais polipeptídeos antigênicos de *M. tuberculosis* descritos aqui em uma amostra proveniente do indivíduo; e a comparação do nível com um padrão. Um nível de peptídeos antigênicos de TB que é maior que o padrão indica tratamento ineficiente e
25 um nível que é menor que ou igual ao padrão indica tratamento eficiente. O método de monitoramento do tratamento também pode incluir a detecção de níveis de um ou mais dos peptídeos antigênicos de TB descritos aqui em uma amostra em um ou mais pontos de tempo (por exemplo, um primeiro ou

um ponto de tempo de linha de base e um segundo ponto de tempo após o início do tratamento) e comparação dos níveis nos pontos de tempo. Os aumentos nos níveis dos peptídeos indicam tratamento ineficiente e a diminuição ou nenhuma
5 alteração nos níveis indica tratamento eficiente.

A invenção inclui um método de diagnóstico da doença TB em um indivíduo através da detecção da presença, da ausência ou dos níveis de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos descritas aqui. Os ensaios de diagnóstico da
10 presente invenção também permitem que se distinga entre um indivíduo que possui a doença TB ativa e imunidade à TB. Tal método inclui a detecção da presença, ausência ou do nível de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos descritas aqui e a medida do estímulo de uma resposta
15 imunológica específica à TB no indivíduo. A ausência das moléculas de polipeptídeos em uma amostra do indivíduo e a presença de uma resposta imunológica específica à TB no indivíduo indica que o indivíduo adquiriu alguma imunidade à doença TB e não a doença propriamente dita. A medida do
20 estímulo de uma resposta imunológica específica à TB inclui a medida da proliferação de células, da produção de interleucina-12, dos níveis de interferon- γ ou uma combinação dos mesmos, em uma amostra do indivíduo.

A presente invenção inclui, em uma modalidade
25 adicional, métodos para a detecção da infecção por *M. tuberculosis* em uma amostra biológica, através da avaliação da presença de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos descritas aqui na amostra. A presença de uma ou mais das moléculas indica a presença de infecção por *M. tuberculosis*;

e a ausência de uma ou mais das moléculas indica a ausência de infecção por *M. tuberculosis*. Em particular, os métodos incluem o contato da amostra com um anticorpo (por exemplo, um anticorpo marcado de forma detectável) que se liga com a molécula de polipeptídeo, de forma suficiente para permitir a formação de um complexo entre a amostra e o anticorpo, para formar assim um complexo antígeno-anticorpo; e a detecção do complexo antígeno-anticorpo. A presença do complexo indica a presença de infecção por *M. tuberculosis* e a ausência de um complexo indica a ausência de infecção por *M. tuberculosis*. Em um aspecto, o método inclui ainda o contato da amostra com um segundo anticorpo específico ao antígeno ou ao complexo de antígeno-anticorpo. O polipeptídeo ou o anticorpo pode estar ligado a um suporte sólido e a amostra biológica pode ser uma amostra de urina, sangue, saliva, fluido cerebrospinal ou tecido.

Os métodos para a detecção de infecção por *M. tuberculosis* em uma amostra biológica também incluem o contato da amostra com pelo menos dois iniciadores de oligonucleotídeo em uma reação em cadeia da polimerase, em que pelo menos um dos iniciadores de oligonucleotídeo (por exemplo, pelo menos aproximadamente 10 bases contíguas) é específico para uma ou mais das moléculas de ácidos nucleicos isoladas descritas aqui, suficientemente para permitir a amplificação dos iniciadores; e a detecção na amostra da sequência de ácido nucleico amplificada. A presença de qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos amplificadas indica infecção por *M. tuberculosis* e a ausência de qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos

amplificadas indica uma ausência de infecção por *M. tuberculosis*. Um outro método para a detecção da infecção por *M. tuberculosis* em uma amostra biológica inclui o contato da amostra com uma ou mais sondas de oligonucleotídeo (por exemplo, pelo menos aproximadamente 15 bases contíguas) específicas para a molécula de ácido nucléico descrita aqui sob condições de alta estringência, suficientemente para permitir a hibridização entre a amostra e a sonda; e a detecção da molécula de ácido nucléico que se hibridiza com a sonda de oligonucleotídeo na amostra. A presença de hibridização da sonda indica infecção por *M. tuberculosis* e a ausência de hibridização indica uma ausência de infecção por *M. tuberculosis*.

Além disso, a presente invenção inclui kits para diagnosticar a presença ou a ausência de infecção por *M. tuberculosis* em uma pessoa. O kit compreende um ou mais reagentes para a detecção de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos ou das moléculas de ácidos nucléicos descritas aqui. Os reagentes podem incluir aqueles que são utilizados para a realização de um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima, um ensaio imunocromatográfico rápido, uma análise de citometria de fluxo ou um ensaio radioimunológico. Tais kits podem compreender uma ou mais moléculas de ácidos nucléicos que possuem uma sequência das SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; os complementos das ditas sequências e sequências de ácidos nucléicos que se hibridizam com uma sequência citada nas SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15,

17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação; e um reagente de detecção. Os kits podem incluir ainda outros itens tais como suportes sólidos e agentes de detecção (por exemplo, um grupo repórter como
5 radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminescentes, enzimas, biotina e partículas de corante; conjugado a um agente de ligação tal como antiimunoglobulinas, Proteína G, Proteína A e lectinas).

As vantagens da presente invenção incluem novos
10 métodos para a prevenção ou a redução da gravidade da doença TB através do fornecimento de uma composição vacinal eficiente. Os ensaios da presente invenção permitem administrar de forma simples e fácil testes de urina para distinguir rapidamente e eficientemente entre pacientes que
15 possuem TB ativa e aqueles que não possuem. Novas composições vacinais e ensaios de diagnóstico mais eficientes auxiliarão na redução do presente problema de TB em todo o mundo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 As Figuras 1A-1G são representações esquemáticas que exibem as seqüências de ácidos nucleicos (em negrito) (SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 e 31) e correspondendo às seqüências polipeptídicas de *M. tuberculosis* (em negrito) (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10,
25 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32) eluídas das moléculas de MHC de classe 1 dos macrófagos de camundongos infectados com a bactéria *M. tuberculosis*. Estão também representadas as supostas seqüências de ácidos nucleicos e

de polipeptídeos de *M. tuberculosis* que possuem 100% de homologia com as seqüências isoladas.

A Figura 1H é uma tabela que mostra as seqüências peptídicas de *M. tuberculosis*, SEQ ID Nos: 2, 6, 10, 14, 18, 22 e 26, eluídas de moléculas de MHC de classe 1 dos macrófagos de camundongos infectados com a bactéria *M. tuberculosis*. A figura mostra ainda a anotação do The Institute for Genomic Research (TIGR), a denominação do Swiss-Prot e o nome da proteína.

A Figura 2 é uma representação esquemática que mostra um peptídeo, SEQ ID NO: 30, em negrito, encontrado na urina de pacientes com tuberculose pulmonar e sua seqüência de ácido nucléico correspondente, SEQ ID NO: 29. A figura mostra ainda uma seqüência de DNA (SEQ ID NO: 31) e sua seqüência de proteína correspondente (SEQ ID NO: 32) que é uma suposta proteína de biossíntese da molibdopterina que é encontrada em *M. tuberculosis* e possui 100% de homologia com a SEQ ID NO: 30.

A Figura 3 é uma representação esquemática que mostra o protocolo utilizado para purificar e seqüenciar os peptídeos associados ao MHC de Classe I isolados de macrófagos infectados por *M. tuberculosis*.

A Figura 4 é uma figura que mostra um exemplo de um ensaio imunocromatográfico para a detecção de antígenos de TB da presente invenção em uma amostra.

A Figura 5 é uma tabela que mostra as seqüências peptídicas de *M. tuberculosis*, SEQ ID Nos: 34, 38, 42 e 46, encontradas na urina de pacientes com tuberculose pulmonar e a proteína doadora de *M. tuberculosis*.

As Figuras 6A-B são representações esquemáticas que mostram a sequência de ácido nucléico (em negrito e sublinhada) (SEQ ID NO: 33) e que corresponde à sequência polipeptídica de *M. tuberculosis* (em negrito e sublinhada) (SEQ ID NO: 34) encontrada na urina de pacientes com tuberculose pulmonar. São também apresentadas as sequências de ácidos nucléicos e de polipeptídeos da Homosserina O-acetiltransferase de *M. tuberculosis* que possuem 100% de homologia com as sequências isoladas (SEQ ID NOs: 35 e 36, respectivamente), junto com uma tabela que fornece o nome do Locus do Genomic Research (TIGR), o nome do locus primário, a denominação do Swiss-Prot, a suposta identificação, o Símbolo Gênico, as funções celulares do TIGR, as coordenadas, o nome da molécula de DNA, o comprimento do gene, o comprimento da proteína, o peso molecular, o pI, a porcentagem de GC, o número de Licença da enzima, o Reino e a Família.

As Figuras 7A-C são representações esquemáticas que mostram a sequência de ácido nucléico (em negrito e sublinhada) (SEQ ID NO: 37) e que corresponde à sequência polipeptídica de *M. tuberculosis* (em negrito e sublinhada) (SEQ ID NO: 38) encontrada na urina de pacientes com tuberculose pulmonar. São também apresentadas as sequências de ácidos nucléicos e de polipeptídeos da proteína smc de partição do cromossomo de *M. tuberculosis* que possuem 100% de homologia com as sequências isoladas (SEQ ID NOs: 39 e 40, respectivamente), junto com uma tabela que fornece o nome do Locus do TIGR, o nome do locus primário, a denominação do Swiss-Prot, a suposta identificação, o Símbolo

Gênico, as funções celulares do TIGR, as coordenadas, o nome da molécula de DNA, o comprimento do gene, o comprimento da proteína, o peso molecular, o pI, a porcentagem de GC, o número de Licença da enzima, o Reino e a Família.

As Figuras 8A-B são representações esquemáticas que mostram a sequência de ácido nucléico (em negrito e sublinhada) (SEQ ID NO: 41) e que corresponde à sequência polipeptídica de *M. tuberculosis* (em negrito e sublinhada) (SEQ ID NO: 42) encontrada na urina de pacientes com tuberculose pulmonar. São também apresentadas as sequências de ácidos nucléicos e polipeptídicas da Ornitina carbamoiltransferase de *M. tuberculosis* que possuem 100% de homologia com as sequências isoladas (SEQ ID NOs: 43 e 44, respectivamente), junto com uma tabela que fornece o nome do Lócus do TIGR, o nome do lócus primário, a denominação do Swiss-Prot, a suposta identificação, o Símbolo Gênico, as funções celulares do TIGR, as coordenadas, o nome da molécula de DNA, o comprimento do gene, o comprimento da proteína, o peso molecular, o pI, a porcentagem de GC, o número de Licença da enzima, o Reino e a Família.

As Figuras 9A-B são representações esquemáticas que mostram a sequência de ácido nucléico (em negrito e sublinhada) (SEQ ID NO: 45) e correspondente à sequência polipeptídica de *M. tuberculosis* (em negrito e sublinhada) (SEQ ID NO: 46) encontrada na urina de pacientes com tuberculose pulmonar. São também apresentadas as sequências de ácidos nucléicos e polipeptídicas da fosfoadenosina fosfossulfato reductase de *M. tuberculosis* que possuem 100%

de homologia com as seqüências isoladas (SEQ ID NOs: 47 e 48, respectivamente), junto com uma tabela que fornece o nome do Locus do TIGR, o nome do locus primário, a denominação do Swiss-Prot, a suposta identificação, o Símbolo
5 Gênico, as funções celulares do TIGR, as coordenadas, o nome da molécula de DNA, o comprimento do gene, o comprimento da proteína, o peso molecular, o pI, a porcentagem de GC, o número de Licença da enzima, o Reino e a Família.

10 A Figura 10 é uma representação do Western Blot que mostra a superexpressão e a purificação dos recombinantes MT1694, MT2462 e MT2990 dos lisados de *E. coli* de culturas não induzidas (faixas 1); dos lisados de *E. coli* das culturas induzidas com isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (faixas 2); e as proteínas recombinantes purificadas (faixas 3) e os marcadores de peso
15 molecular (MWM).

A Figura 11 é uma representação do Western Blot que mostra a identificação de MTB1694 e MT2462 nativas no
20 lisado total bruto de células de *M. tuberculosis* (Faixa 1); as proteínas do filtrado da cultura (CF) (Faixa 2); o antígeno recombinante purificado (Faixa 3); e os marcadores de peso molecular (MWM), em que os antígenos foram submetidos à eletroforese e transferidos para uma membrana
25 de nitrocelulose seguido pela aplicação de sonda com anti-MTB1694 de coelho ou com o anti-soro anti-MT2462.

A Figura 12A é um gráfico de barras que mostra o reconhecimento de MT1694 e MT2452 através de respostas proliferativas expresso por contagens por minuto (COM) de

indivíduos com PPD saudável (uma resposta de teste de pele intradérmico às proteínas da tuberculose utilizando um Derivado de Proteína Purificada) negativo (doador 1) e PPD positivo (doadores 2-5) após o estímulo com antígenos recombina-
5 ntes (5 µg/mL).

A Figura 12B é um gráfico de barras que mostra o reconhecimento de MT1694 e MT2452 através da produção de IFN-γ de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos PPD negativo saudável (doador 1) e PPD
10 positivo (doadores 2-5) após o estímulo com antígenos recombina-
nantes (5 µg/mL).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A seguir há uma descrição das modalidades preferidas da invenção. A presente invenção se refere a
15 composições vacinais e ensaios de diagnóstico para a doença Tuberculose (TB). A presente invenção se baseia, em parte, na descoberta de certos peptídeo antigênicos de TB apresentados no macrófago com MHC de classe 1, quando um hospedeiro é infectado com a bactéria que causa a TB, a
20 saber, a bactéria *M. tuberculosis*. Os macrófagos com MHC de classe 1 são células que desempenham uma função na via das células T CD8+ da resposta imunológica. Uma segunda descoberta que forma a base da presente invenção é a identificação de um peptídeo de TB presente na urina de pessoas
25 infectadas com TB ativa. A identidade dos peptídeos antigênicos específicos de TB apresentados na célula com MHC de classe e a identidade do peptídeo de TB peptídeo encontrado na urina de pacientes infectados, fornecem as

seqüências polipeptídicas necessárias para criar vacinas e/ou testes de diagnóstico eficiente.

As composições vacinais para TB da presente invenção podem incluir seqüências polipeptídicas ou seqüências de ácidos nucleicos e, opcionalmente, moléculas intensificadoras do sistema imunológico adicionais. Assim, a presente invenção se refere, em parte, às seqüências polipeptídicas de TB antigênicas específicas descobertas, que são mostradas nas Figuras 1, 2 e 5-9, a saber, SEQ ID NOS 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 e combinações das mesmas. As SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22 e 26 foram isolados através da infecção de camundongos com quantidades significativas da bactéria *M. tuberculosis*. Aproximadamente duas semanas após os camundongos serem infectados, o baço foi removido e as moléculas de MHC de classe 1, moléculas que apresentam antígenos para as células T CD8+, foram separadas, de acordo com os métodos detalhados no Exemplo 1. Um número de peptídeos que foram encontrados nas moléculas de MHC de classe 1 foi identificado como tendo origem na *M. tuberculosis*. As SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 e 27, as seqüências de ácidos nucleicos que codificam estes polipeptídeos identificados, também são mostradas na Figura 1A-H.

A SEQ ID NO: 30, MVIIELMRR, é um peptídeo encontrado na urina de pessoas com TB pulmonar e esta seqüência possui 100% de homologia com uma proteína de biossíntese de *M. tuberculosis*, SEQ ID NO: 32, mostrada na Figura 2. A seqüência de ácido nucleico, SEQ ID NO: 31, que codifica

esta proteína também é mostrada. Adicionalmente, as Figuras 5-9 mostram as SEQ ID NOs: 34, 38, 42 e 46 que também são encontradas na urina de pessoas com TB pulmonar e possuem 100% de homologia com as SEQ ID NOs: 36, 40, 44 e 48, respectivamente. Os métodos utilizados para a identificação desta proteína TB na urina de pacientes infectados com TB ativa são descritos no Exemplo 2.

Conseqüentemente, a presente invenção se refere a estas seqüências, SEQ ID NO: 1-48, que foram identificadas como sendo úteis na ativação de uma resposta imunológica protetora contra TB e para ensaios de diagnóstico para a identificação de pessoas com TB ativa.

Polipeptídeos e Sua Função

A presente invenção se refere a moléculas de polipeptídeos isoladas que foram isoladas incluindo as partes antigênicas das seqüências de TB apresentadas pela molécula de MHC de classe 1 em um hospedeiro infectado e das seqüências de TB isoladas da urina de pacientes infectados. A presente invenção inclui moléculas de polipeptídeos que contêm a seqüência de qualquer uma das seqüências de aminoácidos de TB antigênicas (SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou combinações das mesmas). Ver as Figuras 1, 2 e 5-9. A presente invenção se refere ainda a moléculas de polipeptídeos que são codificadas pelas seqüências de ácidos nucleicos, SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou combinações das mesmas.

Como utilizado aqui, o termo "polipeptídeo" abrange cadeias de aminoácidos de qualquer comprimento, incluindo proteínas de comprimento completo (isto é, antígenos), em que os resíduos de aminoácidos estão ligados
5 através de ligações peptídicas covalentes. Assim, um polipeptídeo que compreende uma parte imunogênica de um antígeno de *M. tuberculosis* pode consistir inteiramente da parte imunogênica ou pode conter seqüências adicionais. As seqüências adicionais podem ser derivadas do antígeno
10 nativo de *M. tuberculosis* ou podem ser heterólogas e tais seqüências podem (mas não necessariamente) ser imunogênicas. Em geral, os polipeptídeos divulgados aqui são preparados na forma substancialmente pura. Preferencialmente, os polipeptídeos são pelo menos aproximadamente 80%
15 puros, mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 90% puros e mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 99% puros.

Os polipeptídeos antigênicos de TB da presente invenção referidos aqui como "isolados" são polipeptídeos
20 que foram separados de outras proteínas e do material celular de sua fonte de origem. Os polipeptídeos antigênicos de TB isolados, peptídeos derivados através da infecção com a bactéria *M. tuberculosis*, incluem uma proteína essencialmente pura, proteínas produzidas através
25 de síntese química, através de combinações de sínteses biológicas e químicas e através de métodos recombinantes. As proteínas da presente invenção foram isoladas e caracterizadas em relação as suas características físicas utilizando os procedimentos descritos na Exemplificação e

podem ser produzidas utilizando técnicas de laboratório para purificação de proteínas. Tais técnicas incluem, por exemplo, extração por salinificação, imunoprecipitação, cromatografia em coluna, cromatografia líquida em alta
5 pressão ou eletroforese.

As composições e os métodos da presente invenção também abrangem variações dos polipeptídeos e das moléculas de DNA anteriores. Uma "variação" de polipeptídeo, como utilizado aqui, é um polipeptídeo que difere do polipep-
10 tídeo citado apenas em relação a substituições e/ou modificações conservativas, de forma que as propriedades terapêuticas, antigênicas e/ou imunogênicas do polipeptídeo são mantidas. Uma variação de um antígeno específico a *M. tuberculosis* estimulará, portanto, a proliferação celular
15 e/ou IFN- γ em células Th1 produzidas contra tal antígeno específico. As variações de polipeptídeos exibem preferencialmente pelo menos aproximadamente 70%, mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 90% e mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 95% de homologia com os
20 polipeptídeos identificados. Para os polipeptídeos com propriedades imunorreativas, as variações podem, alternativamente, ser identificadas através da modificação da sequência de aminoácidos de um dos polipeptídeos anteriores e da avaliação da imunorreatividade do polipeptídeo
25 modificado. Tais sequências modificadas podem ser preparadas e testadas utilizando, por exemplo, os procedimentos repre-sentativos descritos aqui.

Como utilizado aqui, uma "substituição conservativa" é uma em que um aminoácido é substituído por um

outro aminoácido que possui propriedades similares, de forma que um perito na arte da química de peptídeos esperaria que a estrutura secundária e a natureza hidropática do polipeptídeo não fossem substancialmente alteradas. Em geral, os grupos de aminoácidos a seguir representam alterações conservativas: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; e (5) phe, tyr, trp, his.

10 As variações podem ainda ou alternativamente, conter outras modificações, incluindo a deleção ou a adição de aminoácidos que possuem influência mínima sobre as propriedades antigênicas, a estrutura secundária e a natureza hidropática do polipeptídeo. Por exemplo, um polipeptídeo pode ser conjugado a uma seqüência sinal (ou líder) na extremidade N-terminal da proteína que direciona de forma co-tradução ou pós-tradução a transferência da proteína. O polipeptídeo também pode ser conjugado com um ligante ou outra seqüência para facilitar a síntese, a purificação ou a identificação do polipeptídeo (por exemplo, poli-His) ou para aumentar a ligação do polipeptídeo com um suporte sólido. Por exemplo, um polipeptídeo pode ser conjugado com a região Fc de uma imunoglobulina.

25 A presente invenção abrange ainda proteínas e polipeptídeos de TB, variações dos mesmos ou aqueles que possuem seqüências de aminoácidos análogas às seqüências de aminoácidos dos polipeptídeos antigênicos de TB descritas aqui. Tais polipeptídeos são definidos aqui como análogos

antigênicos de TB (por exemplo, homólogos) ou mutantes ou derivados. Sequências de aminoácidos "análogas" ou "homólogas" se referem a seqüências de aminoácidos com identidade suficiente de qualquer uma das seqüências de aminoácidos de TB de forma a possuírem a atividade biológica (por exemplo, a capacidade de ativar uma resposta imunológica protetora contra bactérias da TB) de qualquer um dos polipeptídeos nativos de TB. Por exemplo, um polipeptídeo análogo pode ser produzido com alterações "silenciosas" na seqüência de aminoácidos em que um ou mais, resíduos de aminoácidos diferem dos resíduos de aminoácidos de qualquer uma da proteína de TB, ainda possuindo a função ou a atividade biológica da TB. Os exemplos de tais diferenças incluem adições, deleções ou substituições de resíduos da seqüência de aminoácidos de TB. São também abrangidos pela presente invenção os polipeptídeos análogos que exibem atividade biológica maior ou menor de qualquer uma das proteínas de TB da presente invenção. Tais polipeptídeos podem ser produzidos através de mutação (por exemplo, substituição, deleção ou adição) de um ou mais resíduos de aminoácidos ou ácidos nucleicos em qualquer uma das moléculas de TB isoladas descritas aqui. Tais mutações podem ser realizadas utilizando os métodos descritos aqui e aqueles conhecidos na arte. Em particular, a presente invenção se refere a moléculas de polipeptídeos homólogas que possuem pelo menos aproximadamente 70% (por exemplo, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%) de identidade ou similaridade com as SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34,

36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas. Percentual de "identidade" se refere à quantidade de nucleotídeos ou de aminoácidos idênticos entre duas seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos, respectivamente. Como utilizado aqui, "porcentagem de similaridade" se refere à quantidade de aminoácidos similares ou conservativos entre duas seqüências de aminoácidos.

Os polipeptídeos da presente invenção, que incluem uma seqüência de comprimento completo, seqüências parciais, fragmentos funcionais e homólogos, que permitem ou auxiliam na estimulação de uma resposta imunogênica específica ou imunológica protetora à TB. "Imunogênica", como utilizado aqui, se refere à capacidade de ativar uma resposta imunológica (por exemplo, celular) em um paciente, tal como um ser humano e/ou em uma amostra biológica. Em particular, os antígenos que são imunogênicos (e partes imunogênicas dos mesmos) estimulam a proliferação celular, a produção de interleucina-12 e/ou a produção de interferon- γ em amostras biológicas que compreendem uma ou mais células (por exemplo, células T, células NK, células B e macrófago). Tais células são derivadas de um indivíduo imune à *M. tuberculosis*. As partes imunogênicas dos antígenos descritos aqui podem ser preparadas e identificadas utilizando as técnicas descritas aqui. Podem ser utilizadas outras técnicas, tais como as resumidas em Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed., Raven Press, 1993, pp. 243-247 e referências citadas no mesmo. Tais técnicas incluem a seleção de partes de polipeptídeos do antígeno nativo em

relação às propriedades imunogênicas. Uma parte imunogênica de um polipeptídeo é uma parte que, dentro de tais ensaios, gera uma resposta imunológica (por exemplo, proliferação, produção de interferon- γ e/ou produção de interleucina-12) que é substancialmente similar à gerada pelo antígeno de comprimento completo. Em outras palavras, uma parte imunogênica de um antígeno pode gerar pelo menos aproximadamente 20% e preferencialmente aproximadamente 100%, da proliferação induzida pelo antígeno de comprimento completo no ensaio de proliferação modelo descrito aqui. Uma parte imunogênica pode ainda ou alternativamente, estimular a produção de pelo menos aproximadamente 20% e preferencialmente aproximadamente 100%, do interferon- γ e/ou da interleucina-12 induzida pelo antígeno de comprimento completo no ensaio modelo descrito aqui. Como utilizado aqui, "TB" ou "doença TB" se refere à doença causada pela infecção de *M. tuberculosis*. Os polipeptídeos homólogos podem ser determinados utilizando métodos conhecidos pelos peritos na arte. As buscas iniciais pela homologia podem ser realizadas no NCBI contra os bancos de dados do GenBank, EMBL e SwissProt utilizando, por exemplo, o serviço de rede BLAST. Altschuler, S. F., e outros, J. Mol. Biol., 215: 403 (1990), Altschuler, S. F., Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1998). A análise de computador das seqüências de nucleotídeos pode ser realizada utilizando o MOTIFS e as subrotinas de FindPatterns do software do Genetics Computing Group (GCG, versão 8.0). As comparações de proteínas e/ou nucleotídeos foram realizadas de acordo com Higgins e Sharp (Higgins, D. G. e Sharp, P. M., Gene,

73: 237-244 (1988), por exemplo, utilizando parâmetros pré-estabelecidos).

Adicionalmente, os polipeptídeos isolados individuais da presente invenção são biologicamente ativos ou
5 funcionais e também desempenham várias funções nas bactérias. Por exemplo, o polipeptídeo isolado, tal como a SEQ ID NO: 6 é um transportador ABC de proteína transmembrana de transporte de glutamina. Similarmente, a SEQ ID NO: 22 é uma proteína do membro integral de transporte de
10 aminoácido catiônico e a SEQ ID NO: 26 é uma ATPase do tipo P de transporte catiônico. A SEQ ID NO: 32, é uma proteína de biossíntese da molibdopterina. A presente invenção inclui fragmentos destas seqüências de aminoácidos isoladas e possui ainda a função ou a atividade biológica da
15 seqüência. Por exemplo, os fragmentos de polipeptídeos que compreendem mutantes de deleção das proteínas antigênicas de TB podem ser planejados e expressos através de métodos de laboratório bem conhecidos. Os fragmentos, os polipeptídeos homólogos ou análogos podem ser avaliados em relação
20 à atividade biológica, como descrito aqui.

A presente invenção abrange ainda derivados biologicamente ativos dos polipeptídeos antigênicos de TB descritos anteriormente, referidos aqui como imitadores de peptídeos. Os imitadores podem ser planejados e produzidos
25 através de técnicas conhecidas pelos peritos na arte. (ver, por exemplo, a Patentes U.S. N^{os} 4.612.132; 5.643.873 e 5.654.276). Estes imitadores podem ser baseados, por exemplo, em uma seqüência de aminoácidos de TB específica e manter a posição relativa no espaço da seqüência de

aminoácidos correspondente. Estes imitadores de peptídeos possuem atividade biológica similar à atividade biológica do composto peptídico correspondente, mas possuem uma "vantagem biológica" em relação à sequência de aminoácidos antigênica de TB em relação a uma ou mais, das propriedades a seguir: solubilidade, estabilidade e susceptibilidade à hidrólise e à proteólise.

Os métodos para a preparação de imitadores de peptídeos incluem a modificação do grupo amino N-terminal, do grupo carboxila C-terminal e/ou a alteração de uma ou mais das ligações amino no peptídeo para uma ligação sem ser amino. Duas ou mais tais modificações podem ser acopladas em uma molécula imitadora de peptídeo. As modificações de peptídeos para produzir imitadores de peptídeo são descritas nas Patentes U.S. Nos 5.643.873 e 5.654.276. Outras formas dos polipeptídeos antigênicos de TB, abrangidas pela presente invenção, incluem aquelas que são "funcionalmente equivalentes". Este termo, como utilizado aqui, refere-se a qualquer sequência de ácido nucléico e seu aminoácido codificado, que imita a atividade biológica dos polipeptídeos de TB e/ou domínios funcionais dos mesmos.

Sequências de Ácidos Nucléicos de TB, Plasmídeos, Vetores e

Células Hospedeiras

A presente invenção, em uma modalidade, inclui uma molécula de ácido nucléico isolada que possui uma sequência das SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou combinações das mesmas. Ver as Figuras 1, 2 e 5-9. A

presente invenção inclui as seqüências que são citadas nas Figuras 1, 2 e 5-9, assim como as regiões codificadoras das mesmas.

Como utilizado aqui, os termos "molécula de DNA" ou "molécula de ácido nucléico" incluem filamentos tanto 5 senso quanto anti-senso, cDNA, DNA genômico, DNA recombinante, RNA e moléculas de ácidos nucléicos completamente ou totalmente sintetizadas. Uma "variação" de nucleotídeo é uma seqüência que difere da seqüência de nucleotídeos citada por possuir uma ou mais deleções, substituições ou 10 adições de nucleotídeos. Tais modificações podem ser facilmente introduzidas utilizando técnicas de mutagênese padronizadas, tal como a mutagênese específica ao sítio direcionada ao oligonucleotídeo como é ensinada, por exemplo, por Adelman e outros (DNA 2: 183, 1983). As 15 variações de nucleotídeos podem ser variações alélicas que ocorrem naturalmente ou variações que não ocorrem naturalmente. As variações de seqüências de nucleotídeos exibem preferencialmente pelo menos aproximadamente 70%, 20 mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 80% e mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 90% de homologia com a seqüência citada. Tais variações de seqüências de nucleotídeos se hibridizarão geralmente com a seqüência de nucleotídeos citada sob condições estrin- 25 gentes. Em uma modalidade, "condições estringentes" se refere à pré-lavagem em uma solução de 6 x SSC, 0,2% de SDS; hibridização a 65°Celsius, 6xSSC, 0,2% de SDS durante a noite; seguida por duas lavagens de 30 minutos cada em 1xSSC, 0,1% de SDS a 65°C e duas lavagens de 30 minutos

cada em 0,2XSSC, 0,1% de SDS a 65°C. A presente invenção abrange ainda seqüências de ácidos nucléicos isoladas que codificam polipeptídeos de TB e em particular, aquelas que codificam uma molécula de polipeptídeo que possui uma
5 seqüência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou combinações das mesmas. Estas seqüências de ácidos nucléicos de TB codificam polipeptídeos que estimulam uma resposta imunogênica protetora para a
10 bactéria *M. tuberculosis* e/ou estão envolvidas com as funções descritas adicionalmente aqui.

Como utilizado aqui, um gene ou uma seqüência de nucleotídeos "isolada" que não é flanqueada pelas seqüências de nucleotídeos que normalmente (por exemplo, na
15 natureza) flanqueiam o gene ou a seqüência de nucleotídeos (por exemplo, como nas seqüências genômicas) e/ou foram completamente ou parcialmente purificadas de outras seqüências transcritas (por exemplo, como em uma biblioteca de cDNA ou de RNA). Assim, uma seqüência gênica ou de
20 nucleotídeos isolada pode incluir uma seqüência gênica ou de nucleotídeos que é sintetizada quimicamente ou através de meios recombinantes. As construções de ácidos nucléicos contidas em um vetor são incluídas na definição de "isolado" como utilizado aqui. Ainda, as seqüências de
25 nucleotídeos isoladas incluem moléculas de ácidos nucléicos recombinantes e células hospedeiras heterólogas, assim como moléculas de ácidos nucléicos parcialmente ou substancialmente ou purificadas em solução. Os produtos da transcrição de RNA *in vivo* e *in vitro* da presente invenção

também são abrangidos pelas seqüências de nucleotídeos "isoladas". Tais seqüências de nucleotídeos isoladas são úteis para a produção do polipeptídeo antigênico de TB codificado, como sondas para o isolamento de seqüências

5 homólogas (por exemplo, de outras espécies de mamíferos ou outros organismos), para o mapeamento gênico (por exemplo, através da hibridização *in situ*) ou para a detecção da presença (por exemplo, através da análise de Southern blot) ou da expressão (por exemplo, através da análise de

10 Northern blot) de genes relacionados nas células ou no tecido. As seqüências de ácidos nucléicos antigênicas de TB da presente invenção incluem seqüências de ácidos nucléicos homólogas. As seqüências de ácidos nucléicos "análogas" ou "homólogas" se referem às seqüências de ácidos nucléicos

15 com identidade suficiente com qualquer uma das seqüências de ácidos nucléicos de TB, de forma que uma vez codificadas em polipeptídeos, possuem a atividade biológica de qualquer um dos polipeptídeos antigênicos de TB descritos aqui. Por exemplo, uma molécula de ácido nucléico análoga

20 pode ser produzida com alterações "silenciosas" na seqüência em que um ou mais nucleotídeos diferem dos nucleotídeos de qualquer um dos polipeptídeos de TB descritos aqui, ainda, uma vez codificada em um polipeptídeo, ainda possui sua função ou atividade biológica. Os

25 exemplos de tais diferenças incluem adições, deleções ou substituições. São também abrangidas pela presente invenção as seqüências de ácidos nucléicos que codificam polipeptídeos análogos que exibem atividade biológica maior ou menor que as proteínas de TB da presente invenção. Em

particular, a presente invenção está direcionada a moléculas de ácidos nucleicos que possuem pelo menos aproximadamente 70% (por exemplo, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%) de identidade com as SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou combinações das mesmas.

As moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção, que incluem as seqüências de comprimento completo, as seqüências parciais, os fragmentos funcionais e homólogos, uma vez codificadas em polipeptídeos, ativam uma resposta imunogênica específica à TB ou possuem a função do polipeptídeo, como descrito adicionalmente aqui. As seqüências de ácidos nucleicos homólogas podem ser determinadas utilizando métodos conhecidos pelos peritos na arte e através de métodos descritos aqui que incluem aqueles descritos para seqüências polipeptídicas homólogas. Os antígenos imunogênicos podem ser então seqüenciados utilizando técnicas tal como a química de Edman. Ver Edman e Berg, Eur. J. Biochem. 80: 116-132, 1967.

São também abrangidas pela presente invenção as seqüências de ácidos nucleicos, DNA ou RNA, que são substancialmente complementares às seqüências de DNA que codificam os polipeptídeos antigênicos de TB da presente invenção e que se hibridizam especificamente com suas seqüências de DNA sob condições de estringência conhecidas pelos peritos na arte. Como definido aqui, substancialmente complementar significa que o ácido nucleico não precisa refletir a seqüência exata das seqüências de TB, mas tem que ser suficientemente similar em relação à seqüência para

permitir a hibridização com a sequência de ácido nucléico de TB sob condições de alta estringência. Por exemplo, bases não complementares podem estar intercaladas em uma sequência de nucleotídeos ou as sequências podem ser mais
5 longas ou mais curtas que a sequência de ácido nucléico de TB, contanto que a sequência tenha um número suficiente de bases complementares à sequência de TB para permitir a hibridização com a mesma. As condições para estringência são descritas, por exemplo, em Ausubel, F. M. e outros,
10 Current Protocols in Molecular Biology, (Current Protocol, 1994) e Brown e outros, Nature, 366: 575 (1993); e adicionalmente definidas em associação com certos ensaios.

São ainda abrangidas pela presente invenção as sequências de ácidos nucléicos, DNA genômico, cDNA, RNA ou
15 uma combinação dos mesmos, que é substancialmente complementar às sequências de DNA da presente invenção e que se hibridiza especificamente com as sequências de ácidos nucléicos antigênicas de TB sob condições de estringência suficiente (por exemplo, alta estringência) para a
20 identificação de sequências de DNA com identidade de ácido nucléico substancial.

A presente invenção inclui ainda partes ou outras variações de antígenos de *M. tuberculosis* que são geradas através de meios sintéticos ou recombinantes. Os
25 polipeptídeos sintéticos que possuem menos que aproximadamente 100 aminoácidos e geralmente menos que aproximadamente 50 aminoácidos, podem ser gerados utilizando técnicas bem conhecidas pelos peritos comuns na arte. Por exemplo, tais polipeptídeos podem ser sintetizados

utilizando qualquer uma das técnicas em fase sólida disponíveis comercialmente, tal como o método de síntese em fase sólida de Merrifield, em que os aminoácidos são sequencialmente adicionados a uma cadeia de aminoácidos crescente. Ver Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2146, 1963. O equipamento para a síntese automatizada de polipeptídeos está disponível comercialmente de fornecedores tal como a Applied BioSystems, Inc., Foster City, Calif. e pode ser operado de acordo com as instruções do fabricante. As variações de um antígeno nativo podem ser geralmente preparadas utilizando técnicas padronizadas de mutagênese, tal como a mutagênese específica ao sítio direcionada ao oligonucleotídeo. Seções da sequência de DNA também podem ser removidas utilizando técnicas padronizadas para permitir a preparação de polipeptídeos truncados. Em uma outra modalidade, a presente invenção inclui moléculas de ácidos nucleicos (por exemplo, sondas ou iniciadores) que se hibridizam com as sequências de TB, SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou combinações das mesmas sob condições de estrringência alta ou moderada. Em um aspecto, a presente invenção inclui moléculas que são ou se hibridizam com pelo menos aproximadamente 20 nucleotídeos contíguos ou mais longos em comprimento (por exemplo, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900 ou 4000). Tais moléculas se hibridizam com uma das sequências de

ácidos nucleicos de TB sob condições de alta estringência. A presente invenção inclui tais moléculas e aquelas que codificam um polipeptídeo que possui as funções ou a atividade biológica descrita aqui. Tipicamente a sonda de

5 ácido nucleico compreende a seqüência de ácido nucleico (por exemplo, as SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou combinações das mesmas) e tem comprimento e complementaridade suficientes para se hibridizar especificamente com

10 uma seqüência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo antigênico de TB. Por exemplo, uma sonda de ácido nucleico pode ter pelo menos aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% do comprimento da seqüência de ácido nucleico de TB. Os requerimentos de

15 comprimento e complementaridade suficientes podem ser facilmente determinados por um perito na arte. As condições de hibridização adequadas (por exemplo, condições de alta estringência) são também descritas aqui. Adicionalmente, a presente invenção abrange fragmentos dos polipeptídeos da

20 presente invenção ou seqüências de ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo em que o polipeptídeo possui a atividade biológica dos polipeptídeos de TB citados aqui. Tais fragmentos são úteis como sondas para os ensaios descritos aqui e como ferramentas experimentais ou no caso

25 de fragmentos de ácidos nucleicos, como iniciadores. Uma modalidade preferida inclui iniciadores e sondas que se hibridizam seletivamente com as construções de ácidos nucleicos que codificam qualquer um dos polipeptídeos de TB citados. Por exemplo, os fragmentos de ácidos nucleicos que

codificam qualquer um dos domínios descritos aqui também são implicados pela presente invenção. As condições de estringência para hibridização se referem às condições de temperatura e composição dos tampões que permitem a

5 hibridização de uma primeira seqüência de ácido nucléico com uma segunda seqüência de ácido nucléico, em que as condições determinam o grau de identidade entre estas seqüências que se hibridizam uma com a outra. Portanto, as "condições de alta estringência" são aquelas condições em

10 que apenas as seqüências de ácidos nucléicos que são muito similares uma à outra se hibridizarão. As seqüências podem ser menos similares uma à outra se estas se hibridizarem sob condições de estringência moderada. Ainda, menos similaridade é necessária para duas seqüências se

15 hibridizarem sob condições de baixa estringência. Variando as condições de hibridização partindo de um nível de estringência em que não ocorre qualquer hibridização, até um nível em que a hibridização é observada primeiro, podem ser determinadas as condições em que uma certa seqüência se

20 hibridizará com aquelas seqüências que são mais similares à mesma. As condições precisas que determinam a estringência de uma hibridização particular incluem não apenas a força iônica, a temperatura e a concentração dos agentes de desestabilização tal como a formamida, mas também fatores

25 tais como o comprimento das seqüências de ácidos nucléicos, sua composição de bases, a porcentagem de pares de bases mal pareados entre as duas seqüências e a freqüência de ocorrência de subconjuntos das seqüências (por exemplo, pequenos filamentos de repetições) dentro de outras

seqüências que não são idênticas. A lavagem é a etapa em que as condições são ajustadas de forma a determinar um nível mínimo de similaridade entre as seqüências que se hibridizam com cada outra. De forma geral, partindo da
5 temperatura mais baixa em que apenas a hibridização homóloga ocorre, um pareamento errado de 1% entre duas seqüências resulta em um decréscimo de 1°C na temperatura de fusão (T_m) para qualquer concentração de SSC escolhida. Geralmente, o dobro da concentração de SSC resulta em um
10 aumento na T_m de aproximadamente 17°C. Utilizando estas linhas de guia, a temperatura da lavagem pode ser determinada empiricamente, dependendo do nível de pareamento errado buscado. As condições de hibridização e de lavagem são explicadas em Current Protocols in Molecular
15 Biology (Ausubel, F. M. e outros, eds., John Wiley & Sons, Inc., 1995, com atualizações suplementares) nas páginas 2.10.1 até 2.10.16 e 6.3.1 até 6.3.6.

As condições de alta estringência podem empregar a hibridização em (1) 1XSSC (10XSSC = 3 M de NaCl, 0,3 M de
20 $\text{Na}_3\text{-citrato.2H}_2\text{O}$ (88 g/litro), pH a 7,0 com 1 M de HCl), 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio), 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 65°C, (2) 1XSSC, 50% de formamida, 1% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 42°C, (3) 1% de albumina de soro bovino
25 (fração V), 1 mM de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0,5 M de NaHPO_4 (pH 7,2) (1 M de NaHPO_4 = 134 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-7H}_2\text{O}$, 4 mL de 85% de H_3PO_4 por litro), 7% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 65°C, (4) 50% de formamida, 5XSSC, 0,02 M de Tris-HCl (pH 7,6), 1X solução de Denhardt (100X = 10 g de

Ficoll 400, 10 g de polivinilpirrolidona, 10 g de albumina de soro bovino (fração V), água até 500 mL), 10% de sulfato de dextran, 1% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 42°C, (5) 5XSSC, 5X solução de Denhardt, 1% de SDS, 100 µg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 65°C ou (6) 5XSSC, 5X solução de Denhardt, 50% de formamida, 1% de SDS, 100 µg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 42°C, com lavagens com alta estringência de (1) 0,3-0,1XSSC, 0,1% de SDS a 65°C ou (2) 1 mM de Na₂EDTA, 40 mM de NaHPO₄ (pH 7,2), 1% de SDS a 65°C. É pretendido que as condições acima sejam utilizadas para híbridos de DNA-DNA de 50 pares de bases ou mais longos. Quando se acredita que o híbrido tenha menos que 18 pares de bases de comprimento, as temperaturas de hibridização e de lavagem devem ser 5-10°C abaixo da T_m calculada do híbrido, em que a T_m em °C = (2X o número de bases A e T) + (4X o número de bases G e C). Para os híbridos acreditados como possuindo de aproximadamente 18 até aproximadamente 49 pares de bases de comprimento, a T_m em °C = (81,5°C + 16,6(log₁₀M) + 0,41(% de G+C) - 0,61 (% de formamida) - 500/L), em que "M" é a molaridade de cátions monovalentes (por exemplo, Na⁺) e "L" é o comprimento do híbrido em pares de bases.

As condições moderadas de estringência podem empregar a hibridização a (1) 4XSSC, (10XSSC = 3 M de NaCl, 0,3 M de Na₃-citrato.2H₂O (88 g/litro), pH a 7,0 com 1 M de HCl), 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio), 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 65°C, (2) 4XSSC, 50% de formamida, 1% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de

bezerro desnaturado a 42°C, (3) 1% de albumina de soro bovino (fração V), 1 mM de Na₂.EDTA, 0,5 M de NaHPO₄ (pH 7,2) (1 M de NaHPO₄ = 134 g de Na₂HPO₄-7H₂O, 4 mL de 85% de H₃PO₄ por litro), 7% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 65°C, (4) 50% de formamida, 5XSSC, 0,02 M de Tris-HCl (pH 7,6), 1X solução de Denhardt (100X = 10 g de Ficoll 400, 10 g de polivinilpirrolidona, 10 g de albumina de soro bovino (fração V), água até 500 mL), 10% de sulfato de dextran, 1% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 42°C, (5) 5XSSC, 5X solução de Denhardt, 1% de SDS, 100 µg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 65°C ou (6) 5XSSC, 5X solução de Denhardt, 50% de formamida, 1% de SDS, 100 µg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 42°C, com lavagem com estringência moderada de 1XSSC, 0,1% de SDS a 65°C. É pretendido que as condições acima sejam utilizadas para híbridos de DNA-DNA com 50 pares de bases ou mais longos. Quando se acredita que o híbrido possui menos que 18 pares de bases de comprimento, as temperaturas de hibridização e de lavagem devem ser 5-10°C abaixo da T_m calculada do híbrido, em que T_m em °C = (2X o número de bases A e T) + (4X o número de bases G e C). Para os híbridos acreditados que tenham aproximadamente 18 até aproximadamente 49 pares de bases de comprimento, a T_m em °C = (81,5°C + 16,6(log₁₀M) + 0,41(% de G+C) - 0,61 (% de formamida) - 500/L), em que "M" é a molaridade de cátions monovalentes (por exemplo, Na⁺) e "L" é o comprimento do híbrido em pares de bases.

As condições de baixa estringência podem empregar a hibridização a (1) 4XSSC, (10XSSC = 3 M de NaCl, 0,3 M de

$\text{Na}_3\text{-citrato.2H}_2\text{O}$ (88 g/litro), pH a 7,0 com 1 M de HCl), 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio), 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 50°C, (2) 6XSSC, 50% de formamida, 1% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro
 5 desnaturado a 40°C, (3) 1% de albumina de soro bovino (fração V), 1 mM de $\text{Na}_2\text{.EDTA}$, 0,5 M de NaHPO_4 (pH 7,2) (1 M de NaHPO_4 = 134 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mL de 85% de H_3PO_4 por litro), 7% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 50°C, (4) 50% de formamida, 5XSSC, 0,02 M de
 10 Tris-HCl (pH 7,6), 1X solução de Denhardt (100X = 10 g de Ficoll 400, 10 g de polivinilpirrolidona, 10 g de albumina de soro bovino (fração V), água até 500 mL), 10% de sulfato de dextran, 1% de SDS, 0,1-2 mg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 40°C, (5) 5XSSC, 5X solução de
 15 Denhardt, 1% de SDS, 100 µg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 50°C ou (6) 5XSSC, 5X solução de Denhardt, 50% de formamida, 1% de SDS, 100 µg/mL de DNA de timo de bezerro desnaturado a 40°C, com lavagens de baixa
 20 estringência de 2XSSC, 0,1% de SDS a 50°C ou (2) 0,5% de albumina de soro bovino (fração V), 1 mM de Na_2EDTA , 40 mM de NaHPO_4 (pH 7,2), 5% de SDS. É pretendido que as condições acima sejam utilizadas para híbridos de DNA-DNA com 50 pares de bases ou mais longos. Quando se acredita
 25 que o híbrido tenha menos que 18 pares de bases de comprimento, as temperaturas de hibridização e lavagem devem ser 5-10°C abaixo da T_m calculada do híbrido, em que a T_m em °C = (2X o número de bases A e T) + (4X o número de bases G e C). Para os híbridos acreditados que possuam aproximadamente 18 até aproximadamente 49 pares de bases de

comprimento, a T_m em $^{\circ}\text{C} = (81,5^{\circ}\text{C} + 16.6(\log_{10}M) + 0,41(\% \text{ de } G + C - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 500/L))$, em que "M" é a molaridade de cátions monovalentes (por exemplo, Na^+) e "L" é o comprimento do híbrido em pares de bases.

5 As seqüências de ácidos nucléicos de TB da presente invenção ou um fragmento das mesmas, também podem ser utilizadas para isolar homólogos adicionais. Por exemplo, uma biblioteca de cDNA ou de DNA genômico proveniente do organismo apropriado pode ser verificada com a
10 seqüência de ácido nucléico de TB marcada para a identificação de genes homólogos como descrito, por exemplo, em Ausubel e outros, Eds., Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nova York (1997).

Os antígenos imunogênicos podem ser produzidos de
15 forma recombinante utilizando uma seqüência de DNA que codifica o antígeno, que foi inserida em um vetor de expressão e expressa em uma célula hospedeira apropriada. As seqüências de DNA que codificam os antígenos de *M. tuberculosis* podem, por exemplo, ser identificadas através
20 da verificação de uma biblioteca de expressão genômica ou de cDNA apropriada de *M. tuberculosis* com o soro obtido de pacientes infectados com *M. tuberculosis*. Tais verificações podem ser geralmente realizadas utilizando técnicas bem conhecidas pelos peritos comuns na arte, tais como as
25 descritas em Sambrook e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989. As seqüências de oligonucleotídeos degeneradas para uso em tal verificação podem ser planejadas e sintetizadas e a verificação pode ser

realizada. Também pode ser empregada a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos anteriores em métodos bem conhecidos na arte, para isolar uma sonda de ácido nucléico de uma biblioteca de cDNA ou genômica. A verificação da biblioteca pode ser então realizada utilizando a sonda isolada. O presente método pode incluir opcionalmente uma sonda antigênica de TB marcada.

Alternativamente, as bibliotecas genômicas ou de cDNA derivadas de *M. tuberculosis* podem ser verificadas diretamente utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) ou linhagens de células T ou clones derivados de um ou mais indivíduos imunes à *M. tuberculosis*. Em geral, as PBMCs e/ou as células T para uso em tais verificações podem ser preparadas como descrito abaixo. As verificações diretas das bibliotecas podem ser geralmente realizadas através da análise de conjuntos de proteínas recombinantes expressas em relação à capacidade de induzir a proliferação e/ou a produção de interferon- γ em células T derivadas de um indivíduo imune à *M. tuberculosis*.

A invenção fornece ainda vetores, plasmídeos ou vírus contendo uma ou mais das moléculas de ácidos nucléicos de TB (por exemplo, possuindo a sequência das SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou combinações das mesmas). Os vetores adequados para uso em células eucarióticas e procarióticas são conhecidos na arte e estão disponíveis comercialmente ou são facilmente preparados por

um perito na arte. Vetores adicionais também podem ser encontrados, por exemplo, in Ausubel, F. M. e outros, Current Protocols in Molecular Biology, (Current Protocol, 1994) e Sambrook e outros, "Molecular Cloning: A Laboratory
5 Manual", 2ª ED. (1989).

Os polipeptídeos recombinantes que contêm partes e/ou variações de um antígeno nativo podem ser facilmente preparados partindo de uma sequência de DNA que codifica o polipeptídeo utilizando uma variedade de
10 técnicas bem conhecidas pelos peritos comuns na arte. Por exemplo, os sobrenadantes provenientes de sistemas de hospedeiro/vetor adequados que secretam a proteína recombinante dentro do meio de cultura podem ser primeiramente concentrados utilizando um filtro disponível comer-
15 cialmente. Após a concentração, o concentrado pode ser aplicado em uma matriz de purificação adequada tal como uma matriz de afinidade ou uma resina de troca iônica. Finalmente, uma ou mais etapas de HPLC em fase inversa podem ser empregadas para purificar adicionalmente uma
20 proteína recombinante.

Qualquer um de uma variedade de vetores de expressão conhecidos pelos peritos comuns na arte pode ser empregado para expressar os polipeptídeos recombinantes desta invenção. A expressão pode ser conseguida em qualquer
25 célula hospedeira adequada que tenha sido transformada ou transfectada com um vetor de expressão contendo uma molécula de DNA que codifica um polipeptídeo recombinante. As células hospedeiras adequadas incluem células procarióticas, leveduras e eucarióticas superiores. Prefe-

rencialmente, as células hospedeiras empregadas são *E. coli*, levedura ou uma linhagem de células de mamífero tal como COS ou CHO. As seqüências de DNA expressas dessa maneira podem codificar antígenos que ocorrem naturalmente,
5 partes de antígenos que ocorrem naturalmente ou outras variações dos mesmos.

Os usos de plasmídeos, vetores ou vírus contendo os receptores ou os fragmentos de receptores de TB clonados incluem um ou mais dos seguintes; (1) produção de sondas
10 para hibridização para a detecção e a medida do nível de TB no tecido ou isolamento de homólogos de TB; (2) produção de mRNA ou de proteína de TB *in vitro* ou *in vivo*; e (3) produção de animais não humanos transgênicos ou de células hospedeiras recombinantes.

15 Em uma modalidade, a presente invenção abrange células hospedeiras transformadas com os plasmídeos, os vetores ou os vírus descritos anteriormente. As moléculas de ácidos nucleicos podem ser inseridas em uma construção que pode, opcionalmente, se replicar e/ou se integrar em
20 uma célula hospedeira recombinante, através de métodos conhecidos. A célula hospedeira pode ser uma eucariótica ou uma procariótica e inclui, por exemplo, levedura (tal como *Pichia pastorius* ou *Saccharomyces cerevisiae*), bactérias (tal como *E. coli*, *M. tuberculosis* ou *Bacillus subtilis*),
25 células ou tecidos animais, células Sf9 de insetos (tais como células Sf9 infectadas por baculovírus) ou células de mamíferos (células somáticas ou embrionárias, células de Rim Embrionário Humano (HEK), células de ovário de hamster chinês, células HeLa, células 293 humanas e célula COS-7 de

macaco). As células hospedeiras adequadas na presente invenção incluem ainda uma célula de mamífero, uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de inseto e uma célula vegetal.

5 A molécula de ácido nucléico pode ser incorporada ou inserida na célula hospedeira através de métodos conhecidos. Os exemplos de métodos adequados de transfecção ou de transformação das células incluem a precipitação com fosfato de cálcio, a eletroporação, a microinjeção, a
10 infecção, a lipofecção e a captação direta. "Transformação" ou "transfecção" como utilizado aqui se refere à aquisição de características genéticas novas ou alteradas através da incorporação de ácidos nucléicos adicionais, por exemplo, DNA. A "expressão" da informação genética de uma célula
15 hospedeira é um termo da arte que se refere à transcrição direcionada do DNA para gerar RNA que é traduzido em um polipeptídeo. Os métodos para a preparação de tais células hospedeiras recombinantes e para a incorporação dos ácidos nucléicos estão descritos em maiores detalhes em Sambrook e
20 outros, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edição (1989) e Ausubel e outros "Current Protocols in Molecular Biology", (1992), por exemplo.

 A célula hospedeira é então mantida sob condições adequadas para a expressão e para a recuperação do polipeptídeo antigênico de TB da presente invenção. Geralmente, as
25 células são mantidas em um tampão e/ou meio de crescimento adequado ou fonte de nutrientes para o crescimento das células e a expressão do(s) produto(s) gênico(s). Os meios de crescimento não são críticos para a invenção, são

geralmente conhecidos na arte e incluem fontes de carbono, nitrogênio e enxofre. Os exemplos incluem Luria broth, Superbroth, Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), RPMI-1640, M199 e meios para inseto de Grace. Os meios de
5 cultura podem ter um tampão, cuja seleção não é crítica para a invenção. O pH dos meios tamponados pode ser selecionado e é geralmente um tolerado pelo ou ótimo para o crescimento da célula hospedeira.

A célula hospedeira é mantida sob uma temperatura
10 e uma atmosfera adequadas. Alternativamente, a célula hospedeira é aeróbica e a célula hospedeira é mantida sob condições atmosféricas ou outras condições adequadas para o crescimento. A temperatura também deve ser selecionada de forma que a célula hospedeira tolere o processo e pode
15 estar, por exemplo, entre aproximadamente 13-40 graus Celsius.

Anticorpos e Métodos de Avaliação

O método para a avaliação da presença ou da ausência dos polipeptídeos antigênicos de TB descritos
20 aqui, em uma amostra, é abrangido pela presente invenção. Os ensaios adequados incluem métodos imunológicos, tal como radioimunoensaio, ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISA), ensaios quimioluminescentes e ensaios imunocromatográficos rápidos. Qualquer método conhecido agora ou
25 desenvolvido posteriormente pode ser utilizado para medir os polipeptídeos antigênicos de TB.

Podem ser utilizados os anticorpos reativos com qualquer um dos polipeptídeos antigênicos de TB, a saber, SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26,

28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas ou porções das mesmas. Em uma modalidade preferida, os anticorpos se ligam especificamente aos polipeptídeos antigênicos de TB ou a uma parte dos mesmos. Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais e é pretendido que o termo anticorpo abranja anticorpos policlonais e monoclonais e fragmentos funcionais dos mesmos. Os termos policlonal e monoclonal se referem ao grau de homogeneidade de uma preparação de anticorpos e não é pretendido que sejam limitados a métodos particulares de produção.

Em várias das modalidades preferidas, técnicas imunológicas detectam a presença, a ausência de níveis de polipeptídeos antigênicos de TB descritos aqui através de um anticorpo anti-TB (isto é, um ou mais anticorpos). O termo "anticorpo anti-TB" inclui anticorpos monoclonais e/ou policlonais e misturas ou coquetéis dos mesmos e se refere a anticorpos específicos aos polipeptídeos que possuem uma sequência apresentada nas SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas ou partes das mesmas. Os anticorpos anti-TB podem ser produzidos contra agentes imunogênicos apropriados, tais como os polipeptídeos antigênicos de TB isolados e/ou recombinantes descritos aqui, análogos ou parte dos mesmos (incluindo moléculas sintéticas, tais como peptídeos sintéticos). Em uma modalidade, os anticorpos são produzidos contra polipeptídeos antigênicos de TB isolados e/ou recombinantes descritos aqui ou uma parte dos mesmos (por

exemplo, um peptídeo) ou contra uma célula hospedeira que expressa os polipeptídeos recombinantes antigênicos de TB. Em adição, as células que expressam os polipeptídeos recombinantes antigênicos de TB descritos aqui, tais como
5 células transfectadas, podem ser utilizadas como agentes imunogênicos ou em uma seleção em relação a um anticorpo que se liga ao receptor.

Qualquer técnica adequada pode preparar o antígeno imunizante e produzir anticorpos policlonais ou
10 monoclonais. A arte contém uma variedade destes métodos (ver, por exemplo, Kohler e outros, Nature, 256: 495-497 (1975) e Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein e outros, Nature 266: 550-552 (1977); Koprowski e outros, Patente U.S. Nº 4.172.124; Harlow, E. e D. Lane, 1988,
15 Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N. Y.); Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Suplemento 27, Verão de 94), Ausubel, F. M. e outros, Eds., (John Wiley & Sons: Nova York, N. Y.), Capítulo 11, (1991)). Geralmente, a fusão de
20 uma linhagem imortal ou mieloma adequado, tal como SP2/0, com células produtoras de anticorpo pode produzir um hibridoma. Os animais imunizados com o antígeno de interesse fornecem a célula produtora de anticorpo, preferencialmente células do baço ou dos nodos linfáticos. Condições
25 seletivas de cultura isolam as células de hibridoma produtoras de anticorpo enquanto as técnicas de diluição limitante produzem as mesmas. Os pesquisadores podem utilizar ensaios adequados tal como ELISA para selecionar

as células produtoras de anticorpo com a especificidade desejada.

Outros métodos adequados podem produzir ou isolar anticorpos da especificidade necessária. Os exemplos de
5 outros métodos incluem a seleção do anticorpo recombinante de uma biblioteca ou se baseiam na imunização de animais transgênicos tais como camundongos.

A presente invenção inclui ensaios para determinar se uma pessoa está infectada com TB ativa, quando comparada
10 com uma pessoa que não possui TB ativa (por exemplo, possui TB latente, não há infecção com TB ou foi imunizada contra a infecção por TB). A TB latente ocorre quando uma pessoa foi infectada com *M. tuberculosis*, mas a bactéria está dormente ou inativa. A infecção com TB inativa se refere a
15 uma pessoa infectada com *M. tuberculosis* e a bactéria está afetando acuradamente partes do corpo, incluindo os pulmões e outros tecidos. A presente invenção, baseada na descoberta de que certos antígenos de TB são encontrados na urina de pacientes com TB ativa, inclui ensaios para a
20 determinação da ausência ou da presença de infecção com TB ativa.

De acordo com o método, um ensaio pode determinar a presença, a ausência ou o nível de polipeptídeos antigênicos de TB em uma amostra biológica. Tal ensaio
25 inclui a combinação da amostra que será testada com um anticorpo que possui especificidade pelos polipeptídeos antigênicos de TB descritos aqui, sob condições adequadas para a formação de um complexo entre o anticorpo e os polipeptídeos antigênicos de TB e a detecção ou a medida

(diretamente ou indiretamente) da formação de um complexo. A amostra pode ser obtida diretamente ou indiretamente (por exemplo, fornecida por um profissional da saúde) e pode ser preparada através de um método adequado para a amostra particular (por exemplo, urina, saliva, fluido espinhal cerebral, sangue total, plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas, soro) e de um formato de ensaio selecionado. Os métodos de combinação da amostra e do anticorpo e os métodos de detecção da formação de complexo são também selecionados para serem compatíveis com o formato de ensaio.

Marcações adequadas podem ser detectadas diretamente, como marcações radioativas, fluorescentes ou quimioluminescentes. Estas também podem ser indiretamente detectadas utilizando marcações tais como marcações enzimáticas e outros padrões antigênicos ou de ligação específica como a biotina. Os exemplos de tais marcações incluem marcações fluorescentes tais como fluoresceína, rodamina, marcações quimioluminescentes tal como luciferase, marcações com radioisótopos tais como ^{32}P , ^{125}I , ^{131}I , marcações enzimáticas tais como peroxidase de raiz forte e fosfatase alcalina, galactosidase, biotina, avidina, marcadores "spin" e similares. A detecção de anticorpos em um complexo também pode ser feita imunologicamente com um segundo anticorpo, que é então detectado (por exemplo, através de uma marcação). Os métodos convencionais ou outros métodos adequados podem marcar diretamente ou indiretamente um anticorpo. Os anticorpos primários e secundários marcados podem ser obtidos comerci-

almente ou preparados utilizando métodos conhecidos por um perito na arte (ver Harlow, E. e D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N. Y.)).

- 5 Em uma modalidade preferida, a presença, a ausência ou o nível de polipeptídeos antigênicos de TB em uma amostra é determinado utilizando um ensaio de ELISA, um ensaio de ELISA em sanduíche ou um ensaio imunocromatográfico. Para a detecção de polipeptídeos antigênicos
- 10 de TB em uma amostra adequada, é coletada uma amostra (por exemplo, urina). As amostras podem ser processadas como é conhecido na arte. O ensaio inclui ainda a combinação de uma amostra adequada com uma composição que possui um anticorpo para o polipeptídeo anti-TB como detector (por
- 15 exemplo, MAb de polipeptídeos anti-TB biotinilados e MAb de polipeptídeos anti-TB conjugados com HRP-estreptavidina ou com HRP) e um suporte sólido, tal como uma placa para microtitulação ou um "dipstick", que possui um anticorpo de captura do polipeptídeo anti-TB ligado (diretamente ou
- 20 indiretamente) ao mesmo. O anticorpo detector se liga a um polipeptídeo antigênico diferente do epítipo de TB daquele reconhecido pelo anticorpo de captura, sob condições adequadas para a formação do complexo. O ensaio envolve então a determinação da formação do complexo nas amostras.
- 25 A presença de um ou mais dos polipeptídeos antigênicos de TB em uma amostra de um indivíduo indica a presença de infecção por TB ativa, enquanto que a ausência de um polipeptídeo de TB indica que o paciente não possui infecção por TB ativa.

O suporte sólido, tal como uma placa para microtitulação, "dipstick", esfera, bloco, tira ou outro suporte adequado, pode ser revestido diretamente ou indiretamente com um anticorpo de polipeptídeo anti-TB ou um antígeno específico à TB. Por exemplo, um anticorpo de polipeptídeo anti-TB pode revestir um poço de microtitulação ou um MAb de polipeptídeo anti-TB biotinilado pode ser adicionado a um suporte revestido com estreptavidina. Em relação a um ensaio imunocromatográfico, um bloco ou uma tira pode ser revestida com um anticorpo específico para o antígeno e quando uma amostra que possui um ou mais dos antígenos descritos aqui entra em contato com o anticorpo, o complexo pode apresentar uma coloração com o auxílio de um detector, como descrito adicionalmente aqui. Ver a Figura 4. Uma variedade de métodos de imobilização ou de revestimento bem como um número de suportes sólidos pode ser utilizada e pode ser selecionada de acordo com o formato desejado.

Em um ensaio imunocromatográfico, uma amostra que possui os antígenos de TB da presente invenção pode ser adicionada ao bloco como é mostrado na Figura 4. A amostra se difunde através de um anticorpo marcado com ouro (mAb#1) que é específico a uma parte do antígeno e é formado um complexo entre o antígeno na amostra e o anticorpo. À medida que o complexo se difunde adicionalmente através do bloco que possui um segundo anticorpo (mAb #2), o anticorpo se liga a uma parte diferente do antígeno. Quando atinge a linha marcada "linha 1", o complexo marcado apresenta uma coloração e a linha de controle ("linha 2") também mudará de cor. Se a amostra não contiver os antígenos de TB da

presente invenção, então a linha 1 não apresentará coloração porque o anticorpo marcado com ouro não se ligará com a amostra e, portanto, não entrará em contato com a linha 1.

5 Em uma outra modalidade, a amostra (ou um padrão de polipeptídeo antigênico de TB) é combinada com o suporte sólido simultaneamente com o anticorpo detector e opcionalmente com um ou mais reagentes através dos quais a detecção é monitorada. Por exemplo, a amostra pode ser combinada com
10 o suporte sólido simultaneamente com (a) Mab de polipeptídeo anti-TB conjugado com HRP ou (b) um Mab de polipeptídeo anti-TB biotinilado e HRP-estreptavidina.

 Uma quantidade conhecida de um padrão de polipeptídeo antigênico de TB pode ser preparada e
15 processada como descrito anteriormente para uma amostra adequada. Este padrão de polipeptídeo antigênico de TB auxilia na quantificação da quantidade de polipeptídeos antigênicos de TB detectados através da comparação do nível de polipeptídeos antigênicos de TB na amostra em relação ao
20 do padrão.

 Um médico, um técnico, um aparato ou uma pessoa qualificada pode comparar a quantidade de complexo detectado com um controle adequado para determinar se os níveis estão elevados. Por exemplo, o nível de polipeptídeos
25 antigênicos de TB após o tratamento pode ser comparado com um nível de linha de base antes do tratamento ou com os níveis em indivíduos normais ou controles adequados. Um decréscimo ou a manutenção dos níveis de um ou mais polipeptídeos de TB na urina, quando comparados aos níveis

de linha de base, indica que o tratamento está funcionando, enquanto que aumentos nos níveis indicam que este não é eficiente.

Os ensaios típicos para os polipeptídeos antigê-
5 nicos de TB são ensaios seqüenciais em que uma placa é
revestida com o primeiro anticorpo, a amostra é adicionada,
a placa é lavada, o segundo anticorpo marcado é adicionado
e a placa é lavada e o segundo anticorpo ligado é
quantificado. Em uma outra modalidade, um formato no qual
10 os anticorpos e a amostra são adicionados simultaneamente,
em um formato de ELISA competitivo, pode atingir maior
sensibilidade.

Uma variedade de métodos pode determinar a quan-
tidade de polipeptídeos antigênicos de TB nos complexos.
15 Por exemplo, quando a HRP é utilizada como uma marcação, um
substrato adequado tal como OPD pode ser adicionado para
produzir uma intensidade de cor diretamente proporcional ao
Mab de polipeptídeos anti-TB ligado (avaliada, por exemplo,
através da densidade óptica) e, portanto aos polipeptídeos
20 antigênicos de TB na amostra.

Um técnico, um médico, uma pessoa qualificada ou
um aparato pode comparar os resultados com um controle
adequado tal como um padrão ou níveis de linha de base de
polipeptídeos antigênicos de TB em uma amostra do mesmo
25 doador. Por exemplo, o ensaio pode ser realizado utilizando
uma quantidade conhecida de padrão de polipeptídeos anti-
gênicos de TB no lugar de uma amostra e uma curva padrão
pode ser estabelecida. Pode-se comparar de forma relativa
as quantidades conhecidas do padrão de polipeptídeos

antigênicos de TB com a quantidade de complexo formado ou detectado.

O ácido nucléico que codifica os polipeptídeos antigênicos de TB também pode ser analisado através de hibridização, por exemplo, através da hibridização de uma das seqüências de TB fornecidas aqui (por exemplo, SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou combinações das mesmas) ou um oligonucleotídeo derivado de uma das seqüências, com uma amostra de tecido contendo DNA ou RNA de uma pessoa. Tal seqüência de hibridização pode ter um marcador detectável, por exemplo, radioativo, fluorescente etc., ligado para permitir a detecção do produto de hibridização. Tais métodos incluem o contato da amostra com uma ou mais sondas de oligonucleotídeo (por exemplo, pelo menos aproximadamente 15 bases contíguas) específicas para a molécula de ácido nucléico descrita aqui sob condições de alta estringência, suficientemente para permitir a hibridização entre a amostra e a sonda; e a detecção da molécula de ácido nucléico que se hibridiza com a sonda de oligonucleotídeo na amostra. A presença de hibridização da sonda indica infecção por *M. tuberculosis* e a ausência de hibridização indica uma ausência de infecção por *M. tuberculosis*. Os métodos para hibridização são bem conhecidos e tais métodos são fornecidos na Patente U.S. Nº 5.837.490, por Jacobs e outros, cujos ensinamentos inteiros são incorporados aqui como referência em sua totalidade. O planejamento da sonda de oligonucleotídeo deve preferencialmente seguir estes parâmetros: (a) deve

ser planejada para uma área da sequência que possui a menor quantidade de bases ambíguas ("N's"), se alguma e (b) deve ser planejada para ter uma T_m de aproximadamente 80° Celsius (assumindo 2° Celsius para cada A ou T e 4°C para
5 cada G ou C).

A presente invenção abrange a detecção dos polipeptídeos de TB da presente invenção em uma amostra utilizando métodos de PCR que utilizam iniciadores divulgados ou derivados das sequências descritas aqui. Por
10 exemplo, as sequências descritas aqui podem ser detectadas através da PCR utilizando as SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou combinações das mesmas. A PCR é a amplificação seletiva de uma sequência alvo através de
15 rodadas repetidas de replicação do ácido nucléico utilizando iniciadores específicos à sequência e uma polimerase termostável. A PCR permite a recuperação de sequências inteiras entre duas extremidades de sequência conhecida. Especificamente, o contato da amostra com pelo menos dois
20 iniciadores de oligonucleotídeo em uma PCR, em que pelo menos um dos iniciadores de oligonucleotídeo (por exemplo, pelo menos aproximadamente 10 bases contíguas) é específico para uma ou mais das moléculas de ácidos nucléicos isoladas descritas aqui. Os dois ficam em contato suficientemente
25 para permitir a amplificação dos iniciadores. A sequência de ácido nucléico amplificada na amostra é detectada. A presença de qualquer uma das sequências de ácidos nucléicos amplificadas indica infecção por *M. tuberculosis* e a ausência de qualquer uma das sequências de ácidos nucléicos

amplificadas indica uma ausência de infecção por *M. tuberculosis*. Os métodos de PCR são descritos aqui e são conhecidos na arte.

Assim, a presente invenção inclui kits para a
5 detecção das SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou combinações das mesmas ou para a quantificação destas seqüências, possuindo anticorpos específicos para as mesmas ou uma parte dos mesmos ou uma seqüência de ácido nucléico
10 que pode se hibridizar ao ácido nucléico que codifica estas seqüências.

As análises imunológicas ou de ácidos nucléicos adicionais podem ser realizadas utilizando métodos conhecidos na arte. Os ensaios, conhecidos na arte ou
15 aqueles desenvolvidos posteriormente, podem ser utilizados para avaliar os polipeptídeos antigênicos de TB em uma amostra. Em adição à medida da presença de polipeptídeos antigênicos de TB em uma amostra, há ensaios para a determinação da eficiência de uma vacina para TB (por
20 exemplo, a extensão até onde a resposta imunológica é estimulada). Estes tipos de ensaios podem ser utilizados juntos para avaliar completamente a condição de TB de uma pessoa. Por exemplo, um indivíduo que possui uma resposta imunogênica específica para TB, mas que tem teste negativo
25 em relação à presença de um ou mais dos polipeptídeos antigênicos de TB em uma amostra, é um que possui um nível de imunidade para a doença. Entretanto, uma pessoa que possui uma resposta imunogênica específica para TB e tem teste positivo em relação à presença dos polipeptídeos

antigênicos de TB da presente invenção é alguém que provavelmente possui TB.

A eficiência de uma vacina para TB pode ser medida através da determinação da resposta imunogênica da
5 pessoa que recebeu a vacina. Os antígenos de TB da presente invenção (e partes imunogênicas dos mesmos) descritos aqui possuem a capacidade de induzir uma resposta imunogênica. Mais especificamente, os antígenos possuem a capacidade de induzir a proliferação e/ou a produção de citocinas (isto
10 é, produção de interferon- γ e/ou de interleucina-12) em células T, células NK, células B e/ou macrófagos derivados de um indivíduo imune à *M. tuberculosis*. Ver o Exemplo 3.

A seleção do tipo celular para uso na avaliação de uma resposta imunogênica a um antígeno dependerá,
15 evidentemente, da resposta desejada. Por exemplo, a produção da interleucina-12 é mais facilmente avaliada utilizando preparações contendo células B e/ou macrófagos. Um indivíduo imune à *M. tuberculosis* é um que é considerado como sendo resistente ao desenvolvimento da tuberculose em
20 virtude de ter montado uma resposta de células T eficiente para *M. tuberculosis* (isto é, substancialmente isento de sintomas da doença). Tais indivíduos podem ser identificados com base em um teste de pele intradérmico fortemente positivo (isto é, endurecimento maior em cerca de 10 mm de
25 diâmetro) para as proteínas da tuberculose utilizando um Derivado de Proteína Purificado (PPD) e a ausência de quaisquer sinais ou sintomas da doença tuberculose. As células T, as células NK, as células B e os macrófagos derivados de indivíduos imunes à *M. tuberculosis* podem ser

preparadas utilizando métodos conhecidos pelos peritos comuns na arte. Por exemplo, uma preparação de PBMCs (isto é, células mononucleares do sangue periférico) pode ser empregada sem a separação adicional de células do
5 componente. As PBMCs podem ser geralmente preparadas, por exemplo, utilizando uma centrifugação por densidade através de Ficoll (Winthrop Laboratories, NY). As células T para uso nos ensaios descritos aqui podem ser purificadas diretamente partindo das PBMCs. Alternativamente, uma
10 linhagem de células T enriquecidas reativa contra proteínas micobacterianas ou clones de células T reativos a proteínas micobacterianas individuais, podem ser empregados. Tais clones de células T podem ser gerados, por exemplo, através do cultivo de PBMCs de indivíduos imunes à
15 *M. tuberculosis* com proteínas micobacterianas durante um período de 2-4 semanas. Isto permite a expansão apenas das células T específicas às proteínas micobacterianas, resultando em uma linhagem composta exclusivamente de tais células. Estas células podem então ser clonadas e testadas
20 com proteínas indivi-duais, utilizando métodos conhecidos pelos peritos comuns na arte, para definir de forma mais acurada a especi-ficidade das células T individuais. Em geral, os antígenos que têm teste positivo nos ensaios em relação à proliferação e/ou à produção de citocinas (isto
25 é, produção de interferon- γ e/ou de interleucina-12) realizados utilizando células T, células NK, células B e/ou macrófagos derivadas de um indivíduo imune à *M. tuberculosis* são considerados imunogênicos. Tais ensaios podem ser realizados, por exemplo, utilizando os procedimentos repre-

sentativos descritos abaixo. As partes imunogênicas de tais antígenos podem ser identificadas utilizando ensaios similares e podem estar presentes dentro dos polipeptídeos descritos aqui.

5 A capacidade de um polipeptídeo (por exemplo, um antígeno imunogênico ou uma parte ou outra variação do mesmo) induzir a proliferação celular pode ser avaliada através do contato das células (por exemplo, células T e/ou células NK) com o polipeptídeo e da medida da proliferação
10 das células. Em geral, a quantidade de polipeptídeo que é suficiente para a avaliação de aproximadamente 10^5 células varia de aproximadamente 10 ng/mL até aproximadamente 100 µg/mL e preferencialmente é de aproximadamente 10 µg/mL. A incubação do polipeptídeo com as células é tipicamente
15 realizada a 37°C durante aproximadamente seis dias. Após a incubação com o polipeptídeo, as células são avaliadas em relação a uma resposta proliferativa, que pode ser avaliada através de métodos conhecidos pelos peritos comuns na arte, tal como a exposição das células a um pulso de timidina
20 marcada radioativamente e a medida da incorporação da marcação dentro do DNA celular. Em geral, um polipeptídeo que resulta em um aumento de pelo menos três vezes na proliferação acima do fundo (isto é, a proliferação observada para as células cultivadas sem o polipeptídeo) é
25 considerado como sendo capaz de induzir a proliferação.

A capacidade de um polipeptídeo estimular a produção de interferon-γ e/ou interleucina-12 nas células pode ser avaliada através do contato das células com o polipeptídeo e da medida do nível de interferon-γ ou de

interleucina-12 produzido pelas células, como demonstrado no Exemplo 3. Em geral, a quantidade de polipeptídeo que é suficiente para a avaliação de aproximadamente 10^5 células varia de aproximadamente 10 ng/mL até aproximadamente 100 μ g/mL e preferencialmente é de aproximadamente 10 μ g/mL. O polipeptídeo pode, mas não necessariamente, ser imobilizado em um suporte sólido, tal como uma esfera ou uma micro-esfera biodegradável, tal como as descritas nas Patentes U.S. N^{os} 4.897.268 e 5.075.109. A incubação do polipeptídeo com as células é tipicamente realizada a 37°C durante aproximadamente seis dias. Após a incubação com o polipeptídeo, as células são avaliadas em relação ao interferon- γ e/ou à interleucina-12 (ou uma ou mais subunidades dos mesmos), que pode ser avaliada através de métodos conhecidos pelos peritos comuns na arte, tal como um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) ou, no caso da subunidade P70 da IL-12, um ensaio biológico tal como um ensaio que mede a proliferação de células T. Em geral, um polipeptídeo que resulta na produção de pelo menos 50 pg de interferon- γ por mL de sobrenadante cultivado (contendo 10^4 - 10^5 células T por mL) é considerado capaz de estimular a produção de interferon- γ . Um polipeptídeo que estimula a produção de pelo menos 10 pg/mL da subunidade P70 da IL-12 e/ou pelo menos 100 pg/mL da subunidade P40 da IL-12, por 10^5 macrófagos ou células B (ou por 3×10^5 PBMC) é considerado capaz de estimular a produção de IL-12.

Em geral, os antígenos imunogênicos são aqueles que estimulam a proliferação e/ou a produção de citocinas

(isto é, produção de interferon- γ e/ou de interleucina-12) em células T, células NK, células B e/ou macrófagos derivados de pelo menos aproximadamente 25% dos indivíduos imunes à *M. tuberculosis*. Entre estes antígenos imunogê-
5 nicos, os polipeptídeos que possuem propriedades terapêuticas superiores podem ser distinguidos com base na magnitude das respostas nos ensaios anteriores e com base na porcentagem de indivíduos para os quais é observada uma resposta. Em adição, os antígenos que possuem propriedades
10 terapêuticas superiores não estimularão a proliferação e/ou a produção de citocinas *in vitro* nas células derivadas de mais que aproximadamente 25% dos indivíduos que não são imunes à *M. tuberculosis*, eliminando assim as respostas que não são especificamente causadas por células que respondem
15 à *M. tuberculosis*. Tais antígenos que induzem uma resposta em uma alta porcentagem de preparações de células T, células NK, células B e/ou macrófagos de indivíduos imunes à *M. tuberculosis* (com uma baixa incidência de respostas nas preparações celulares de outros indivíduos) possuem
20 propriedades terapêuticas superiores.

Proteínas de Fusão, Composições Vacinais, Modo e Maneira de
Administração

Os polipeptídeos de TB da presente invenção podem estar na forma de um conjugado ou de uma proteína de fusão,
25 que pode ser produzida através de métodos conhecidos. Em particular, 2 ou mais das seqüências, SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 ou 48 podem ser fundidas uma com uma outra ou com outras proteínas, para fornecer uma composição

vacinal mais eficiente e estimular uma resposta imunogênica melhorada. Outras proteínas que podem ser utilizadas para produzir tal proteína de fusão incluem antígenos de TB que estimulam a via de células T CD4+ da resposta imunológica.

5 Os exemplos de tais antígenos incluem o Antígeno 85b, ESAT-6, MtB41, Mtb39. Os polipeptídeos de TB da presente invenção foram isolados de moléculas de MHC de classe I, moléculas conhecidas por apresentarem antígenos para as células T CD8+. Embora seja possível que estes polipeptídeos também sejam apresentados na via de CD4+, a fusão de

10 um antígeno da via de células T CD4+ com dos polipeptídeos da presente invenção pode servir para aumentar a eficiência da vacina para TB. As proteínas de fusão podem ser produzidas de acordo com métodos conhecidos da tecnologia do DNA. Por exemplo, as proteínas de fusão podem ser

15 expressas partindo de uma molécula de ácido nucléico que compreende seqüências que codificam uma parte biologicamente ativa dos polipeptídeos de TB ou os polipeptídeos de TB inteiros apresentados nas SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10,

20 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou combinações das mesmas e seu parceiro de fusão, por exemplo, uma outra seqüência da presente invenção, uma parte de uma molécula de imunoglobulina ou um outro antígeno de TB da via das células T CD4+. Por

25 exemplo, algumas modalidades podem ser produzidas através da interseção de um ácido nucléico que compreende seqüências de imunoglobulina em um vetor de expressão adequado, vetor de fato ou outros vetores disponíveis comercialmente. A construção resultante pode ser

introduzida em uma célula hospedeira adequada para expressão. Após a expressão, as proteínas de fusão podem ser isoladas ou purificadas de uma célula através de uma matriz de afinidade. Medindo as alterações nas funções das
5 células transfectadas que ocorrem como um resultado da expressão de proteínas de TB recombinantes, as células por si mesmas ou as proteínas de TB produzidas partindo das células podem ser utilizadas em uma variedade de ensaios de seleção.

10 Como citado anteriormente, em certos aspectos as composições da invenção compreende proteínas de fusão ou moléculas de fusão com DNA. Cada proteína de fusão compreende um primeiro e um segundo polipeptídeos da invenção ou, alternativamente, um polipeptídeo da presente
15 invenção e um antígeno conhecido de *M. tuberculosis*, junto com variações de tais proteínas de fusão. As proteínas de fusão da presente invenção também podem incluir um peptídeo ligante entre o primeiro e o segundo polipeptídeos. As moléculas de fusão com DNA da presente invenção compreendem
20 uma primeira e uma segunda moléculas de DNA isoladas, cada molécula de DNA isolada codificando um antígeno de *M. tuberculosis* da invenção ou um antígeno conhecido de *M. tuberculosis*.

25 Uma sequência de DNA que codifica uma proteína de fusão da presente invenção é construída utilizando técnicas conhecidas do DNA recombinante para montar seqüências de DNA separadas que codificam o primeiro e o segundo polipeptídeos em um vetor de expressão apropriado, como descrito em detalhes abaixo. A extremidade a 3' de uma

seqüência de DNA que codifica o primeiro polipeptídeo é ligada, com ou sem um ligante peptídico, à extremidade a 5' de uma seqüência de DNA que codifica o segundo polipeptídeo de forma que os quadros abertos das seqüências estão em
5 fase para permitir a tradução do mRNA das duas seqüências de DNA em uma única proteína de fusão que mantém a atividade biológica tanto do primeiro quanto do segundo polipeptídeos.

Uma seqüência ligante peptídica pode ser
10 empregada para separar o primeiro e o segundo polipeptídeos em uma distância suficiente para garantir que cada polipeptídeo se dobre em suas estruturas secundárias e terciárias. Tal seqüência ligante peptídica é incorporada na proteína de fusão utilizando técnicas padronizadas bem
15 conhecidas na arte. As seqüências ligantes peptídicas adequadas podem ser escolhidas com base nos fatores a seguir: (1) sua capacidade de adotar uma conformação estendida flexível; (2) sua capacidade de adotar uma estrutura secundária que poderia interagir com epítomos
20 funcionais no primeiro e no segundo polipeptídeos; e (3) a falta de resíduos hidrofóbicos ou carregados que poderiam reagir com os epítomos funcionais dos polipeptídeos. As seqüências ligantes peptídicas preferidas contêm resíduos de Gly, Asn e Ser. Outros aminoácidos quase neutros, tais
25 como Thr e Ala também podem ser utilizados na seqüência ligante. As seqüências de aminoácidos que podem ser empregadas de forma útil como ligantes incluem as divulgadas em Maratea e outros, Gene 40: 39-46, 1985; Murphy e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8258-8262,

1986; Patente U.S. Nº 4.935.233 e Patente U.S. Nº 4.751.180. A sequência ligante pode ter de 1 até aproximadamente 50 aminoácidos de comprimento. As sequências peptídicas não são necessárias quando o primeiro e o
5 segundo polipeptídeos possuem regiões de aminoácidos N-terminais não essenciais que podem ser utilizadas para separar os domínios funcionais e prevenir a interferência estérica.

As sequências de DNA ligadas são ligadas de forma
10 operacional a elementos reguladores da transcrição ou da tradução adequados. Os elementos reguladores responsáveis pela expressão do DNA ficam localizados apenas a 5' da sequência de DNA que codifica os primeiros polipeptídeos. Similarmente, os códons de término precisam terminar a
15 tradução e os sinais de término da transcrição estão presentes apenas a 3' da sequência de DNA que codifica o segundo polipeptídeo.

A eficiência de uma vacina que inclui as sequências isoladas da presente invenção pode ser deter-
20 minada com base na capacidade do antígeno de fornecer pelo menos aproximadamente uma redução de 50% (por exemplo, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 100%) nos números de bactérias e/ou pelo menos aproximadamente um
25 decréscimo de 40% (por exemplo, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 100%) na mortalidade após a infecção experimental em um experimento

de desafio. Os animais experimentais adequados incluem camundongos, porquinhos-da-Índia e primatas.

As composições da presente invenção são preferencialmente formuladas na forma de composições farmacêuticas ou na forma de vacinas para a indução da imunidade protetora contra a tuberculose em um paciente. Um paciente pode estar sofrendo de uma doença ou pode estar isento de doença e/ou infecção detectável. Em outras palavras, a imunidade protetora pode ser induzida para prevenir, 10 reduzir a gravidade ou tratar a tuberculose.

Em uma modalidade, as composições farmacêuticas da presente invenção compreendem um ou mais dos polipeptídeos anteriores, presentes na forma de uma mistura ou na forma de uma proteína de fusão e um carreador fisiologicamente aceitável. Similarmente, as vacinas compreendem 15 um ou mais dos polipeptídeos anteriores e um intensificador da resposta imunológica não específica, tal como um adjuvante ou um lipossomo (dentro do qual o polipeptídeo é incorporado).

20 Em uma outra modalidade, uma composição farmacêutica e/ou uma vacina da presente invenção pode conter uma ou mais das moléculas de DNA da presente invenção, presentes na forma de uma mistura ou na forma de uma molécula de fusão com DNA, cada molécula de DNA codificando 25 um polipeptídeo como descrito anteriormente, de forma que o polipeptídeo seja produzido *in situ*. Em tais vacinas, o DNA pode estar presente dentro de qualquer uma de uma variedade de sistemas de fornecimento conhecidos pelos peritos comuns na arte, incluindo os sistemas de expressão de ácidos

nucléicos, sistemas de expressão bacteriana e viral. Os sistemas de expressão de ácidos nucléicos apropriados contêm as seqüências de DNA necessárias para a expressão no paciente (tal como um promotor adequado e um sinal de 5 término). Os sistemas de fornecimento bacterianos envolvem a administração de uma bactéria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que expressa uma parte imunogênica do polipeptídeo em sua superfície celular. Em uma modalidade preferida, o DNA pode ser introduzido utilizando um sistema 10 de expressão viral (por exemplo, vaccinia ou outro pox vírus, retrovírus ou adenovírus), que pode envolver o uso de um vírus competente em relação à replicação não patogênico (defeituoso). As técnicas para a incorporação do DNA dentro de tais sistemas de expressão são bem conhecidas 15 pelos peritos comuns na arte. O DNA também pode estar "nu", como descrito, por exemplo, em Ulmer e outros, *Science* 259: 1745-1749, 1993 e revisado por Cohen, *Science* 259: 1691-1692, 1993. A captação do DNA nu pode ser aumentada através do revestimento do DNA sobre esferas biodegradáveis, que 20 são eficientemente transportadas para dentro das células.

As moléculas antigênicas de TB da presente invenção podem ser administradas com ou sem um carreador. Os termos "carreador farmacêuticamente aceitável" ou um "carreador" se referem a qualquer excipiente geralmente 25 aceitável ou composição de fornecimento de fármacos que é relativamente inerte e não tóxica. Os exemplos de carreadores incluem água esterilizada, soluções salinas (tal como a solução de Ringer), álcoois, gelatina, talco, parafina viscosa, ésteres de ácidos graxos, hidróxi-

metilcelulose, polivinil pirrolidona, carbonato de cálcio, carboidratos (tais como lactose, sacarose, dextrose, manose, albumina, amido, celulose, sílica gel, polietileno glicol (PEG), leite desnatado em pó, farinha de arroz, 5 estearato de magnésio e similares. As formulações adequadas e os carreadores adicionais são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences, (17ª Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA). Tais preparações podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, 10 lubrificantes, preservantes, estabilizantes, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, corantes, preservantes e/ou substâncias aromáticas e similares que não reagem de forma deletéria com os compostos ativos. Os preservantes típicos podem 15 incluir, sorbato de potássio, metabissulfito de sódio, metil parabeno, propil parabeno, timerosal etc. As composições também podem ser combinadas, quando desejado, com outras substâncias ativas, por exemplo, inibidores de enzimas, para reduzir a degradação metabólica. Um carreador 20 (por exemplo, um carreador farmacologicamente aceitável) é preferido, mas não necessário, para a administração do composto. A composição pode ser uma solução líquida, uma suspensão, uma emulsão, um tablete, uma pílula, uma cápsula, uma formulação de liberação controlada ou um pó. O 25 método de administração pode determinar como a composição será formulada. Por exemplo, a composição pode ser formulada na forma de um supositório, com agentes aglutinantes tradicionais e carreadores tais como triglicerídeos. A formulação oral pode incluir carreadores

padronizados tais como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio etc.

As moléculas antigênicas de TB utilizadas na
5 invenção podem ser administradas de forma intravenosa, parenteral, intramuscular, subcutânea, oral, nasal, tópica, por inalação, por implante, por injeção ou por supositório. A composição pode ser administrada em uma dose única ou em mais de uma dose ao longo de um período de tempo para
10 conferir o efeito desejado. As quantidades eficientes reais do composto ou do fármaco podem variar de acordo com a composição específica que será utilizada, o modo de administração e a idade, o peso e a condição do paciente. Por exemplo, como utilizado aqui, uma quantidade eficiente
15 do fármaco é uma quantidade que reduz o número de bactérias. As dosagens para um paciente individual particular podem ser determinadas por um perito comum na arte utilizando considerações convencionais (por exemplo, através de um protocolo farmacológico convencional
20 apropriado).

Para a aplicação entérica ou em mucosa (incluindo a via oral e a mucosa nasal), são particularmente adequados os tabletes, os líquidos, as gotas, os supositórios ou as cápsulas. Pode ser utilizado um xarope, um elixir ou
25 similar em que é empregado um veículo adoçado. Os lipossomos, as microesferas e as microcápsulas estão disponíveis e podem ser utilizados. A administração pulmonar pode ser realizada, por exemplo, utilizando qualquer um dos vários dispositivos de fornecimento

conhecidos na arte tal como um inalador. Ver, por exemplo, S.P. Newman (1984) em *Aerosols and the Lung*, Clarke e Davis (eds.), Butterworths, Londres, Inglaterra, pp. 197-224; Publicação PCT Nº WO 92/16192; Publicação PCT Nº WO
5 91/08760.

Para a aplicação parenteral, são particularmente adequadas as soluções esterilizadas injetáveis, preferencialmente soluções oleosas ou aquosas, assim como suspensões, emulsões ou implantes, incluindo supositórios.
10 Em particular, os carreadores para a administração parenteral incluem soluções aquosas de dextrose, solução salina, água pura, etanol, glicerol, propileno glicol, óleo de amendoim, óleo de gergelim, polímeros em blocos de polioxietileno-polioxipropileno e similares. As ampolas são
15 unidades de dosagem convenientes. As microesferas biodegradáveis (por exemplo, galactídeo poliláctico) também podem ser empregadas como carreadores para as composições farmacêuticas desta invenção. As microesferas biodegradáveis adequadas são divulgadas, por exemplo, nas Patentes
20 U.S. Nºs 4.897.268 e 5.075.109.

Qualquer um de uma variedade de adjuvantes pode ser empregado nas vacinas desta invenção para aumentar a resposta imunológica. A maior parte dos adjuvantes contém uma substância planejada para proteger o antígeno do
25 catabolismo rápido, tal como hidróxido de alumínio ou óleo mineral e um estimulador não específico de respostas imunológicas, tal como o lipídeo A, *Bordetella pertussis* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Os adjuvantes adequados estão disponíveis comercialmente e incluem, por exemplo, O

Adjuvante Incompleto de Freund e o Adjuvante Completo de Freund (Difco Laboratories) e o Adjuvante 65 da Merck (Merck e Company, Inc., Rahway, NJ.). Outros adjuvantes adequados incluem alúmen, microesferas biodegradáveis, 5 monofosforil lipídeo A e quil A.

Nas vacinas da invenção, é preferido que o adjuvante induza uma resposta imunológica compreendendo aspectos de Th1. Os sistemas de adjuvantes adequados incluem, por exemplo, uma combinação de monofosforil 10 lipídeo A, preferencialmente monofosforil lipídeo A 3-de-O-acilado (3D-MLP) junto com um sal de alumínio. Um sistema melhorado envolve a combinação de um monofosforil lipídeo A e um derivado da saponina, particularmente a combinação de 3D-MLP e a saponina QS21 como divulgado na WO 94/00153 ou 15 uma composição menos capaz de reagir em que a QS21 é envolta em colesterol como divulgado na WO 96/33739. Experimentos anteriores demonstraram um efeito sinérgico evidente de combinações de 3D-MLP e QS21 na indução tanto de resposta humoral quanto imunológica celular do tipo Th1. 20 Uma formação de adjuvantes particularmente mais potente envolvendo QS21, 3D-MLP e tocoferol em uma emulsão de óleo-em-água é descrita na WO 95/17210 e é uma formulação preferida.

A administração das moléculas de polipeptídeos 25 antigênicas de TB da presente invenção e outros compostos pode ocorrer simultaneamente ou sequencialmente no momento. Uma vacina de DNA e/ou uma composição farmacêutica como descrito anteriormente pode ser administrada simultaneamente com ou sequencialmente a um polipeptídeo adicional

da presente invenção, um antígeno conhecido de *M. tuberculosis*, um intensificador imunológico ou outro composto conhecido na arte que seria administrado com tal vacina. O composto pode ser administrado antes, depois ou
5 ao mesmo tempo em que as moléculas antigênicas de TB. Assim, o termo "co-administração" é utilizado aqui para significar que as moléculas antigênicas de TB e o composto adicional (por exemplo, composto estimulador imunológico) serão administrados em momentos para atingir uma resposta
10 imunológica específica para TB, como descrito aqui. Os métodos da presente invenção não são limitados à sequência em que os compostos são administrados, contanto que o composto seja administrado próximo o suficiente em tempo para produzir o efeito desejado.

15 As rotas e a frequência de administração das composições farmacêuticas e das vacinas da invenção, assim como a dosagem, variarão de indivíduo para indivíduo e podem ser paralelas às que estão sendo atualmente utilizadas na imunização utilizando BCG. Em geral, as
20 composições farmacêuticas e as vacinas podem ser administradas através de injeção (por exemplo, intracutânea, intramuscular, intravenosa ou subcutânea), de forma intranasal (por exemplo, por aspiração), intrapulmonar ou oral. Entre 1 e 3 doses podem ser
25 administradas durante um período de 1-36 semanas. Preferencialmente, são administradas 3 doses, em intervalos de 3-4 meses e vacinações de reforço podem ser fornecidas periodicamente depois disso. Os protocolos alternativos podem ser apropriados para pacientes individuais. Uma dose

adequada é uma quantidade de polipeptídeo ou de DNA que, quando administrada como descrito anteriormente, é capaz de produzir uma resposta imunológica em um paciente imunizado suficiente para proteger o paciente da infecção por *M. tuberculosis* pelo menos 1-2 anos. Em geral, a quantidade de polipeptídeo presente em uma dose (ou produzida *in situ* pelo DNA em uma dose) varia de aproximadamente 1 pg até aproximadamente 100 mg por kg de hospedeiro, tipicamente de aproximadamente 10 pg até aproximadamente 1 mg e preferencialmente de aproximadamente 100 pg até aproximadamente 1 µg. Os tamanhos de doses adequados variarão com o tamanho do paciente, mas variarão tipicamente de aproximadamente 0,1 mL até aproximadamente 5 mL.

15

EXEMPLIFICAÇÃO

Exemplo 1: Peptídeos de *M. tuberculosis* Associados com Moléculas de MHC de Classe I

Uma estratégia para detectar os peptídeos de *M. tuberculosis* associados com as moléculas de MHC de Classe I de macrófagos de camundongos infectados *in vivo* foi aplicada para a identificação dos antígenos microbianos.

O fundamento lógico para pesquisar antígenos ou peptídeos de *M. tuberculosis* associados com as moléculas de MHC de classe I de células infectadas se baseia no fato de que estas moléculas da célula hospedeira são cruciais para apresentar os antígenos para as células T CD8+, um subconjunto de células T envolvido na resistência e contra a tuberculose. Portanto, esta abordagem de descoberta dos

25

antígenos possui implicação direta nas estratégias de desenvolvimento de vacinas contra esta doença.

Os peptídeos de *M. tuberculosis* associados com o MHC de classe I foram isolados partindo de células de baço aderentes de camundongos C57BL/6 infectados com 107 UFC de *M. tuberculosis*. Os camundongos C57BL/6 são considerados como sendo relativamente resistentes à infecção por *M. tuberculosis*, portanto, ideais para este estudo. A infecção com um inóculo alto é importante para atingir um alto grau de infecção intracelular nas células do baço dos animais. Entre os dias 10 e 14 de infecção os baços dos camundongos contêm aproximadamente cinco vezes mais células que os controles não infectados. Uma grande porcentagem das células do baço é constituída por macrófagos infectados com *M. tuberculosis*. Os camundongos foram sacrificados e suas células de baço aderentes foram obtidas, lisadas com o detergente CHAPS (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) e as moléculas de MHC de classe I foram isoladas por purificação por afinidade em uma coluna de proteína G sepharose ligada ao anticorpo monoclonal anti-H-2 K/D^b (ATCC HB-11). O procedimento é resumido na Figura 3.

Os peptídeos eluídos compreendendo uma mistura de moléculas abaixo de 5 kDa foram ultra filtrados em um limite de 5 kDa no Millipore Ultrafree-CL e foram então fracionados por HPLC em fase inversa "microbore" (Delta-Pak C1 coluna 8, tamanho de poro 300 Å, partícula de 5µ). Os perfis da HPLC produziram vários picos, que foram individualmente analisados por cromatografia líquida em microcapilar acoplada com espectrometria de massa com

ionização por eletrospray (LC-MS) para determinar o peso molecular e a abundância de todas as espécies de peptídeos. A massa dos peptídeos candidatos foi obtida através do espectro de massa em tandem (MS/MS) com dissociação ativada por colisão (CAD).

As seqüências peptídicas foram pesquisadas em relação à identidade com proteínas conhecidas em bancos de dados tanto do genoma de *M. tuberculosis* quanto de camundongo (The Institute for Genomic Research). Vários peptídeos tinham homologia forte com a proteína de camundongo. Entretanto, sete seqüências peptídicas e de ácidos nucleicos foram identificadas como tendo origem na *M. tuberculosis* (Figura 1). Os genes correspondentes que codificam o doador da proteína destes peptídeos estão sendo clonados e serão expressos utilizando procedimentos padronizados. Em adição, será também preparado o DNA plasmideal bacteriano contendo estes genes de *M. tuberculosis*. Ambos, proteína recombinante e DNA plasmideal, serão utilizados nos protocolos de imunização visando investigar o potencial de proteção destas moléculas para proteger os camundongos contra o desafio com *M. tuberculosis* virulento. A formulação de proteína será utilizada para testar a resposta de CD4+ e a imunização com DNA terá como alvo a resposta de células T CD8+.

Exemplo 2: Um Antígeno de *M. tuberculosis* Encontrado na Urina de Camundongos Infectados

Uma estratégia para detectar os antígenos de *M. tuberculosis* na urina de camundongos infectados foi

aplicada para a identificação de antígenos microbianos na urina de pacientes com tuberculose ativa.

Os ensaios de detecção de antígenos, em contraste com a sorologia convencional, detectam a condição da doença e não a resposta de anticorpos do hospedeiro ao agente etiológico da doença. Podem, portanto, ser utilizados tanto para o diagnóstico quanto para o acompanhamento do tratamento. No presente projeto foi utilizada uma abordagem para a descoberta de um antígeno para identificar os antígenos de *M. tuberculosis* na urina de pacientes humanos. Adicionalmente, proteínas recombinantes serão produzidas e validadas como marcadores da doença ativa.

As urinas dos indivíduos (15 mL) foram carregadas em um Vivaspín 5K MWCO com capacidade de 15 mL filtradas e centrifugadas a 3000G a 4°C até que o volume do material retido fosse < 2mL. O concentrado foi removido da membrana através da lavagem com uréia a 6 M e bicarbonato de amônio a 100 mM. Os concentrados finais foram levados até 4 mL com uréia a 6 M e bicarbonato de amônio a 100 mM pH 8,5. A cada amostra de concentrado de proteína foram adicionados 20 mL de DTT a 2 M. As amostras foram misturadas com vortex e incubadas a 37°C durante 1 hora. As cisteínas reduzidas foram alquiladas através da adição de 200 µL de 0,5 M de iodoacetamida em cada amostra. As amostras foram misturadas com vortex e permitidas que reagissem durante 1 hora à temperatura ambiente na escuridão. A iodoacetamida residual foi extinguida com 15 µL de 2 M de DTT. Partindo da amostra estoque de 4 mL, 300 µL foram removidos para análise em gel.

Foram obtidas imagens dos géis com uma Câmera Digital Kodak DC280 ajustada com lentes Macro +10. As imagens foram processadas utilizando Adobe Photoshop e impressas. Os géis foram cortados com uma lâmina de barbear

5 limpa em 33 pedaços de gel cada enquanto as posições dos cortes eram marcadas para cada pedaço. Os pedaços foram então colocados em tubos de centrífuga de 2 mL. Todo o processamento adicional das amostras foi realizado em uma BioSafety Cabinet de isolamento dual. Os tubos com os

10 pedaços de gel foram preenchidos até 2 mL com metanol a 50%, ácido acético 5% e lavados três vezes com alíquotas adicionais de metanol a 50%, ácido acético a 5%. A solução de descoloração foi removida e os tubos foram preenchidos com 2 mL de acetonitrila. Após 30 minutos com agitação, a

15 acetonitrila foi removida e substituída por bicarbonato de amônio a 100 mM. Após 30 minutos a solução de bicarbonato de amônio foi removida e os tubos foram preenchidos com acetonitrila. Esta etapa de lavagem com acetonitrila, bicarbonato de amônio foi repetida uma vez. A lavagem final

20 com acetonitrila foi removida logo antes da digestão e os pedaços de gel foram secos durante 30 minutos em um speedvac. Os tubos contendo os pedaços de gel secos foram colocados em gelo e foi permitido que resfriassem. A tripsina com grau de seqüenciamento da Promega foi

25 dissolvida em bicarbonato de amônio a 50 mM gelado até uma concentração de 13,3 mg/mL. Utilizando um pipetador de repetição, 125 µL da solução de tripsina foram adicionados no fundo de cada tubo. Foi permitido que os pedaços de gel intumescessem durante 15 minutos em gelo, após os quais 125

mL adicionais de bicarbonato de amônio a 50 mM foram adicionados em cada tubo. Os tubos foram então tampados e incubados durante 16 horas a 37°C. Após a digestão 650 mL de bicarbonato de amônio a 50 mM foram adicionados em cada

5 tubo. As amostras foram então incubadas durante hora a 37°C. O primeiro conjunto de extratos foi removido e colocado em tubos Axygen de 1,5 mL rotulados, uma segunda extração de 650 mL de bicarbonato de amônio foi realizada e agrupada com a primeira. Estes extratos foram então

10 liofilizados enquanto duas extrações ácidas de 650 mL de acetonitrila a 50% ácido fórmico a 0,1% foram realizadas. Todos os extratos foram congelados a -80°C e liofilizados até a secura em um ThermoSavant SC280 speedvac < 10 mTorr. O produto da liofilização foi redissolvido em 200 mL de

15 acetonitrila a 5% ácido fórmico a 0,1%. Volumes apropriados de cada extrato (1-6, 10 mL) (7-12, 20 mL) (13-18, 35 mL) (19-33, 50 mL) foram adicionados em uma placa de 96 poços até a carga de molaridade da proteína aproximada e a proteína de cada região de MW do gel, a placa foi congelada

20 a -80°C e liofilizada novamente. Todas as amostras foram redissolvidas em 12 mL de acetonitrila a 5% ácido fórmico a 0,1%. As amostras foram então avaliadas por Espectrometria de Massa em uma estação de trabalho LCQ DECA XP plus Proteome X da Thermofinnigan. Para cada corrida 10 mL de

25 cada amostra reconstituída foram injetados com um Famos Autosampler enquanto a separação foi feita em uma coluna de 75 mm i.d. x 18 cm empacotada com meio C18 correndo a uma vazão de 235 nL por minuto fornecida partindo de uma bomba Surveyor MS com um separador de fluxo com um gradiente de

5-60% de água e ácido fórmico a 0,1%, acetonitrila ácido fórmico a 0,1% ao longo do curso de 90 min (corrida de 2,5 horas), 180 minutos (corrida de 4 horas) ou 400 minutos (corrida de 8 horas). Entre cada conjunto de amostras foram

5 corridos dois padrões de um 5 Angio mix peptides (Michrom BioResources) para determinar o desempenho da coluna e observar qualquer transporte potencial que poderia ter ocorrido. O LCQ foi corrido em uma configuração com cinco principais com uma verificação por MS e cinco verificações

10 com MS/MS. A exclusão dinâmica foi ajustada em 1 com um limite de 30 segundos. As IDs dos peptídeos foram feitas utilizando Sequest através do Bioworks Browser 3.1. As buscas nos bancos de dados de seqüências foram feitas utilizando o NCBI RefSeqHuman Database utilizando cisteínas

15 diferenciais modificadas com carbamidometila e metioninas oxidadas, seguidas por buscas adicionais utilizando modificações diferenciais. Foram realizadas buscas secundárias utilizando Sequest utilizando o banco de dados de proteínas previstas RefSeqHuman Gnomon. Desta maneira

20 acertos de proteínas conhecidas e teóricas podem ser encontrados sem comprometer a relevância estatística de todos os dados. Os valores de limite de escores dos peptídeos foram escolhidos em Xcorr de 1,8 para íons mono carregados, 2,5 para íons duplamente carregados e 3,0 para

25 íons triplamente carregados, junto com valores de deltaCN de 0,1 e valores de RSP de 1. Os valores de correlação cruzada escolhidos para cada peptídeo garante uma combinação de alta confiança para os estados de carga diferentes, enquanto que o limite de deltaCN garante a

imparidade do acerto do peptídeo. O valor de RSP de 1 garantia que o peptídeo se combinava com o acerto principal no escore preliminar e que o arquivo do fragmento peptídico se combinava apenas a um acerto de proteína. Utilizando
5 esta abordagem do estado da arte vários peptídeos humanos foram identificados, mas de forma mais importante foi possível assim em alto grau identificar pelo menos cinco peptídeos de *M. tuberculosis* na urina de três das seis amostras de urina estudadas. Uma das seqüências do peptídeo
10 identificado (MVIIELMRR - SEQ ID NO: 30) possui homologia idêntica à da seqüência deduzida de uma proteína de *M. tuberculosis* (Figura 2) [The Institute for Genomic Research (TIGR) e SWISS-PROT/TrEMBL AC # 033183]. Quatro outras seqüências foram identificadas, SEQ ID NOs: 34, 38, 42, 46,
15 mostradas nas Figuras 5-9, respectivamente. Esta seqüência peptídica foi observada em três de seis amostras de urina de pacientes com tuberculose. Os iniciadores da PCR foram planejados e sintetizados e utilizados para amplificar o gene de comprimento completo que codifica esta proteína
20 partindo do DNA genômico de *M. tuberculosis*. Um fragmento de DNA (~1 kb) contendo na extremidade a 5' um sítio de Nde I e na extremidade a 3' um sítio de Bam HI, foi obtido e está sendo atualmente utilizado para clonar e expressar o gene.

25 Exemplo 3: Produção, Purificação e Caracterização de
 proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*

Foram feitos esforços concentrados para produzir, purificar e caracterizar as proteínas recombinantes que são réplicas de cinco proteínas de *M. tuberculosis*

encontradas na urina de pacientes com tuberculose pulmonar, como descrito aqui. Três destas (MTP1694 (SEQ ID NO: 42), MTP2462 (SEQ ID NO: 46)) e (MT2990 (SEQ ID NO: 38)) foram obtidas e suas propriedades bioquímicas e biológicas foram

5 caracterizadas. As três proteínas foram purificadas partindo de corpos de inclusão com rendimentos variando de 10 até 15 mg de proteína purificada por litro de cultura induzida. A Figura 10 ilustra a superexpressão das moléculas recombinantes, MT1694, MT2462 e MT2990, em *E.*

10 *coli* e mostra que migraram para posições no gel que correspondem ao Peso Molecular esperado (MW). As proteínas recombinantes foram expressas em células hospedeiras de *E. coli* BL-21(DE3)/pLysS com seis resíduos amino terminais com marcação de His. As proteínas foram purificadas através

15 de cromatografia por afinidade utilizando matriz de agarose Ni-NTA. A pureza foi avaliada por SDS-PAGE (4-20% de gradiente de gel de poliacrilamida) seguida pela coloração com azul de Coomassie. Devido ao fato de que o gene MT2990 codifica uma proteína de 130,6 kDa de MW, que é um tamanho

20 de molécula que é difícil de expressar como proteína recombinante, formas sobrepostas/truncadas desta molécula foram clonadas e expressas. A proteína clonada e expressa ilustrada na Figura 10 representa um fragmento do gene de comprimento completo que abrange 100 aminoácidos, tanto a

25 montante quanto a jusante da sequência de aminoácidos da proteína de *M. tuberculosis* (MT2990) que possui homologia idêntica com o peptídeo encontrado na urina de pacientes com tuberculose. Este fragmento da molécula foi escolhido porque essa parte da proteína é estável e resistente à

maquinaria enzimática proteolítica do hospedeiro, portanto, um alvo para vacina.

Foram produzidos anti-soros de coelho para as proteínas recombinantes MTP1694 e MTP2462 e um anti-soro para MT2990 está sendo e pode ser gerado. Os anti-soros para MTP1694 e MTP2462 foram utilizados para a validação das proteínas identificadas como moléculas genuínas de *M. tuberculosis*, que foi realizada através de análises de Western blot utilizando preparações antigênicas brutas do antígeno de *M. tuberculosis* (extrato celular bacteriano total) assim como o filtrado de cultura (CF) ou os antígenos de CF (fornecidos pelo Dept. Microbiol. Immunol. Pathol., Colorado State University, Fort Collins CO). Os antígenos foram submetidos à eletroforese sob condições redutoras em um gel em gradiente a 4-20% e transferidos para uma membrana de nitrocelulose seguido pela verificação com sondas com anti-soros de coelho anti-MTB1694 ou anti-MT2462. A reatividade foi detectada com imunoglobulina anti-coelho de cabra marcada com peroxidase e desenvolvida utilizando um reagente quimioluminescente (ECL). A Figura 11 indica que o anti-soro anti-MTP1694 reconhece uma banda de ~37 KDa nas preparações tanto de lisado microbacteriano quanto de filtrado de cultura (faixas 1 e 2) assim como, como esperado, a proteína recombinante (faixa 3). Em contraste, o anti-soro anti-MTP2462 reconhece uma banda de ~27 kDa somente no lisado bacteriano e não no filtrado de cultura. As bandas de MW de ambos os antígenos se combinam com seu MW previsto. Em adição, o MW das moléculas recombinantes é ligeiramente maior que o das moléculas

nativas, o que é esperado porque as moléculas recombinantes possuem, em adição às seqüências das moléculas nativas, um filamento de 16 aminoácidos derivado do vetor de clonagem (uma marcação de seis histidinas para facilitar a purificação e um sítio de trombina composto de 10 aminoácidos para permitir a clivagem da marcação com his). Estes resultados confirmam, portanto, que tanto MTP1694 quanto MTP2462 são proteínas genuínas de *M. tuberculosis* que são ativamente produzidas durante o crescimento bacteriano. Em adição, devido ao fato de que o antígeno MTP1694 está presente na preparação de filtrado de cultura ("*M. tuberculosis* secreta a proteína") estes resultados demonstram que esta molécula é útil como uma vacina.

Para avaliar o uso dos antígenos identificados com alvos para vacina para seres humanos, foi analisada a resposta de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtida de doadores positivos para PPD saudáveis (uma resposta do teste de pele intradérmico às proteínas da tuberculose utilizando um Derivado de Proteína Purificado) para estes antígenos. Assim, quatro doadores positivos para PPD saudáveis e um negativo para PPD foram testados com os antígenos MTP1694 e MTP2462. A proteína recombinante (MT299) mencionada anteriormente, não estava disponível no momento em que estes ensaios foram realizados. Para testar em relação ao reconhecimento do antígeno, tanto a resposta proliferativa induzida pelo antígeno quanto a produção de IFN- γ foram utilizadas, seguidas pelo estímulo com antígenos recombinantes (5 μ g/mL). A proliferação foi medida através da incorporação de [3H]TdR e os resultados

são expressos na forma de contagens por minuto (CPM). O IFN- γ foi medido através de ELISA em sanduíche nos sobrenadantes de cultura. Os resultados são expressos nas Figuras 12A e B e indicam que ambos os antígenos são facilmente reconhecidos pelas PBMCs de três dos quatro doadores positivos para PPD. Não foi observada qualquer resposta com as PBMCs obtidas do doador negativo para PPD. Estes resultados sugerem que estes antígenos serão reconhecidos por uma alta porcentagem de indivíduos positivos para PPD saudáveis (presumidamente resistentes). Em adição, devido ao fato de que a resposta proliferativa foi acompanhada pela produção de IFN- γ , MT1649 e MT2462 estão associadas com a proteção contra a tuberculose, portanto, estas moléculas são alvos para vacina.

Os ensinamentos relevantes de todas as referências, patentes e/ou pedidos de patentes citados aqui são incorporados aqui como referência em sua totalidade.

Os ensinamentos das patentes a seguir são incorporados aqui como referência em sua totalidade:

Patente U.S. Nº: 6.627.198, intitulada, "Fusion proteins of Mycobacterium tuberculosis antigens and their uses"; Patente U.S. Nº: 6.613.881, intitulada, "Compounds for immunotherapy and diagnosis of tuberculosis and methods of their use"; Patente U.S. Nº: 6.592.877, intitulada, "Compounds and methods for immunotherapy and diagnosis of tuberculosis"; Patente U.S. Nº: 6.555.653, intitulada, "Compounds for diagnosis of tuberculosis and methods of their uses"; Patente U.S. Nº: 6.544.522, intitulada, "Fusion proteins of Mycobacterium tuberculosis antigens and

their uses"; Patente U.S. Nº: 6.458.366, intitulada, "Compounds and methods for diagnosis of tuberculosis"; Patente U.S. Nº: 6.338.852 intitulada, "Compounds and methods for diagnosis of tuberculosis"; e Patente U.S. Nº: 5 6.290.969, intitulada, "Compounds and methods for immunotherapy and diagnosis of tuberculosis".

Embora esta invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com referências às modalidades preferidas da mesma, será entendido pelos peritos na arte 10 que várias alterações na forma e nos detalhes podem ser feitas na mesma sem sair do âmbito da invenção abrangido pelas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de polipeptídeo isolada, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma parte imunogênica de um antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* ou
5 uma variação do dito antígeno que difere apenas em substituições e/ou modificações conservativas, em que o dito antígeno compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de:

a) uma seqüência de aminoácidos codificada por
10 uma molécula de ácido nucléico que possui uma seqüência da ID de SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

b) uma seqüência de aminoácidos codificada por
15 uma molécula de ácido nucléico que possui a região codificadora da ID de SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

c) uma seqüência de aminoácidos codificada por um
20 complemento da ID de SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

d) uma seqüência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucléico que se hibridiza com a ID de
25 SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; e

e) uma seqüência de aminoácidos apresentada na ID de SEQ Nº: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26,

28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas.

2. Molécula de polipeptídeo isolada, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a
5 molécula de polipeptídeo isolada estimula uma resposta imunogênica específica à Bactéria da Tuberculose (TB) em um hospedeiro.

3. Molécula de polipeptídeo isolada, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma parte
10 imunogênica de um antígeno de *M. tuberculosis*, em que o dito antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste de:

a) uma sequência de aminoácidos codificada por um ácido nucléico que possui mais que ou igual a
15 aproximadamente 70% de identidade com a ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

b) uma sequência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucléico que possui mais que ou igual
20 a aproximadamente 70% de identidade com a região codificadora da ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

c) a uma sequência de aminoácidos codificada por
25 um complemento que possui mais que ou igual a aproximadamente 70% de identidade com a ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

d) uma seqüência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucléico que possui mais que ou igual a aproximadamente 70% de identidade com uma molécula que se hibridiza com a ID de SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 5 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; e

e) uma seqüência de aminoácidos que possui mais que ou igual a aproximadamente 70% de similaridade com uma seqüência apresentada na ID de SEQ Nº: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 10 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas.

4. Molécula de polipeptídeo isolada, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de polipeptídeo isolada estimula uma resposta 15 imunogênica específica à TB em um hospedeiro.

5. Molécula de polipeptídeo isolada, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucléico possui mais que ou igual a aproximadamente 80% de identidade ou similaridade, 20 respectivamente, com as ditas seqüências.

6. Molécula de polipeptídeo isolada, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucléico possui mais que ou igual a aproximadamente 90% de identidade ou similaridade, 25 respectivamente, com as ditas seqüências.

7. Molécula de ácido nucléico isolada, **caracterizada** pelo fato de que codifica uma molécula de polipeptídeo que compreende uma parte imunogênica de um antígeno M da tuberculose ou uma variação do dito antígeno

que difere apenas em substituições e/ou modificações conservativas, em que o dito antígeno é codificado por uma molécula de ácido nucléico que possui uma sequência selecionada do grupo que consiste de:

5 a) ID de SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

 b) a região codificadora da ID de SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 10 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

 c) um complemento da ID de SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

 d) que se hibridiza à ID de SEQ Nº: 1, 3, 5, 7, 15 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; e

 e) que codifica a ID de SEQ Nº: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas.

20 8. Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucléico isolada codifica uma molécula de polipeptídeo que estimula uma resposta imunogênica específica à TB em um hospedeiro.

25 9. Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucléico é uma molécula de RNA.

 10. Molécula de ácido nucléico isolada que codifica uma molécula de polipeptídeo, **caracterizada** pelo

fato de que compreende uma parte imunogênica de um antígeno de *M. tuberculosis*, em que o dito antígeno é codificado por uma molécula de ácido nucléico que possui mais que ou igual a aproximadamente 70 % de identidade com uma seqüência
5 selecionada do grupo que consiste de:

a) ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

b) a região codificadora da ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;
10

c) um complemento da ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas;

d) que se hibridiza à ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; e
15

e) que codifica a ID de SEQ N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 ou uma combinação das mesmas.
20

11. Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucléico possui mais que ou igual a aproximadamente 80% de identidade com as ditas seqüências.

12. Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucléico possui mais que ou igual a aproximadamente 90% de identidade com as ditas seqüências.
25

13. Vetor ou plasmídeo, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucléico, conforme descrito na reivindicação 7.

14. Célula hospedeira, **caracterizada** pelo fato de ser transformada com a seqüência de ácido nucléico conforme descrita na reivindicação 7.

15. Anticorpo, **caracterizado** pelo fato de ligar-se a um polipeptídeo conforme descrito na reivindicação 1.

16. Proteína de fusão, **caracterizada** pelo fato de que compreende um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de:

a) pelo menos um dos polipeptídeos, de acordo com a reivindicação 1;

b) pelo menos dois dos polipeptídeos, de acordo com a reivindicação 1;

c) pelo menos um polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1 e um antígeno conhecido de *M. tuberculosis*; e

d) pelo menos um polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1 e um antígeno de *M. tuberculosis* apresentado em uma molécula de MHC de Classe 2.

17. Método para estimular uma resposta imunogênica específica à TB em um indivíduo ou para prevenir ou reduzir a gravidade de doença causada pela TB, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender a administração de uma quantidade de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos, de acordo com a reivindicação 1.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de polipeptídeo ou uma molécula de ácido nucléico é administrada em um carreador.

5 19. Método para estimular uma resposta imunogênica específica à TB em um indivíduo ou para prevenir ou reduzir a gravidade da doença causada pela TB, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender a administração de uma quantidade de uma ou mais das
10 moléculas de ácidos nucléicos, de acordo com a reivindicação 7.

20. Método para monitorar o tratamento da doença causada pela TB em um indivíduo, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender:

15 a) a detecção do nível de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos, de acordo com a reivindicação 1 de uma amostra do indivíduo; e

 b) a comparação do nível de uma ou mais das moléculas com um padrão; em que um nível de moléculas que
20 seja maior que o padrão indica que o tratamento é ineficiente e um nível que é menor que ou igual ao nível indica tratamento eficiente.

21. Método para monitorar o tratamento da doença causada pela TB em um indivíduo, o método sendo
25 **caracterizado** pelo fato de compreender:

 a) a detecção do nível de uma ou mais moléculas de polipeptídeos, de acordo com a reivindicação 1 em uma amostra do indivíduo em mais de um ponto de tempo; e

b) a comparação do nível da uma ou mais moléculas de polipeptídeos no um ou mais pontos de tempo; em que um aumento no nível das moléculas indica que o tratamento é ineficiente e uma diminuição ou nenhuma alteração no nível indica tratamento eficiente.

22. Método de diagnóstico de doença causada pela TB em um indivíduo, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender a detecção da presença ou da ausência de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos, conforme descrito na reivindicação 1.

23. Método de distinção entre a doença causada pela TB e a imunidade à doença causada pela TB em um indivíduo, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender:

a) a detecção da presença ou da ausência de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos, de acordo com a reivindicação; e

b) a medida do estímulo de uma resposta imunológica específica à TB no indivíduo.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a medida do estímulo de uma resposta imunológica específica à TB inclui a medida da proliferação celular, da produção de interleucina-12, dos níveis de interferon- γ ou de uma combinação dos mesmos, em uma amostra do indivíduo.

25. Método para detecção da infecção por *M. tuberculosis* em uma amostra biológica, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender avaliar a presença de uma ou mais das moléculas de polipeptídeos, de acordo

com a reivindicação 1 na amostra, em que a presença da molécula indica a presença de infecção por *M. tuberculosis*; e a ausência da molécula indica a ausência de infecção por *M. tuberculosis*.

5 26. Método para detecção de infecção por *M. tuberculosis* em uma amostra biológica, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender:

10 a) o contato da amostra com um anticorpo que se liga com uma molécula de polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, suficientemente para permitir a formação de um complexo entre a amostra e o anticorpo, para formar assim um complexo antígeno-anticorpo; e

15 b) a detecção do complexo antígeno-anticorpo; em que a presença do complexo indica a presença de infecção por *M. tuberculosis*; e a ausência de um complexo indica a ausência de infecção por *M. tuberculosis*.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que o dito anticorpo é marcado de forma detectável.

20 28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende ainda o contato da amostra com um segundo anticorpo específico ao dito antígeno ou ao dito complexo antígeno-anticorpo.

25 29. Método, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo ou o anticorpo está ligado a um suporte sólido.

30. Método, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que a amostra biológica é urina.

31. Método para detecção de infecção por *M. tuberculosis* em uma amostra biológica, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender:

a) o contato da amostra com pelo menos dois
5 iniciadores de oligonucleotídeo em uma reação em cadeia da polimerase, em que pelo menos um dos iniciadores de oligonucleotídeo é específico para uma ou mais da molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 7, suficientemente para permitir a amplificação dos
10 iniciadores; e

b) detecção na amostra da sequência de ácido nucléico amplificada; em que a presença da sequência de ácido nucléico amplificada indica infecção por *M. tuberculosis* e a ausência da sequência de ácido nucléico
15 amplificada indica uma ausência de infecção por *M. tuberculosis*.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos iniciadores de oligonucleotídeo compreende pelo menos
20 aproximadamente 10 bases contíguas.

33. Método para detecção de infecção por *M. tuberculosis* em uma amostra biológica, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de compreender:

a) o contato da amostra com uma ou mais sondas de
25 oligonucleotídeo específicas para a molécula de ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 7 sob condições de alto rigor, suficientemente para permitir a hibridização entre a amostra e a sonda; e

b) a detecção da molécula de ácido nucléico que se hibridiza com a sonda de oligonucleotídeo na amostra; em que a presença de hibridização da sonda indica infecção por *M. tuberculosis* e a ausência de hibridização indica uma
5 ausência de infecção por *M. tuberculosis*.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de que a sonda compreende pelo menos aproximadamente 15 bases contíguas.

35. Composição, **caracterizada** pelo fato de que
10 compreende a sequência de polipeptídeo da reivindicação 1 e um carreador fisiologicamente aceitável.

36. Composição, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que inclui ainda um intensificador de resposta imunológica.

15 37. Composição, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que o intensificador de resposta imunológica é um adjuvante ou um outro antígeno da TB.

38. Composição, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que a composição é uma
20 composição para vacina.

39. Composição, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que o adjuvante inclui pelo menos um componente selecionado do grupo que consiste de 3D-MPL e QS21.

25 40. Composição, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que a composição é formulada em uma emulsão de óleo-em-água.

41. Composição, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que o intensificador de resposta

imunológica é uma citocina ou uma quimiocina imunoestimuladora.

42. Kit para diagnóstico da presença ou da ausência de infecção por *M. tuberculosis* em uma pessoa, sendo que o kit é **caracterizado** pelo fato de compreender um ou mais reagentes para a detecção da molécula de polipeptídeo, conforme descrito na reivindicação 1.

43. Kit **caracterizado** pelo fato de que compreende:

10 a) uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos que possuem uma sequência da ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação das mesmas; os complementos das ditas sequências e sequências de ácidos nucleicos que se hibridizam com uma sequência citada na ID de SEQ N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 ou uma combinação; e

b) um reagente de detecção.

44. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende o polipeptídeo da reivindicação 1 e um carreador.

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 2 - DGYVGAPAH

>MT0401

MIDGWTEBQHEPTVRHERPAAPQDVRRVMLLGSAPSRRLAIALQGLGAEVIAV
DGYVGAPAHRIADQSVVVTMTDAEELTAVIRRLQPDFLVTVTAASVDALDAVEQADGECTELV
 PNARAVRCTADREGLRRLAADQLGLPTAPFWFVGSGLGELQAVAVHAGFPLLSPVAGVAGQG
 SSVVAGPNEVEPAWQRAAGHQVQPQTGGVSPRVCAESVVEIEFLVTMIVVCSQGPNGPLI
 EFCAPIGHRDADAGELESWQPQKLSTAALDAAKSIAARIVKALGGRGVFGVELMINGDEV
 YFADVTVCAGSAWVTVRSQRLSVFELQARAILGLAVDTLMISPGAARVINPDHTAGRAA
 VGAAPPADALTGALGVPESDVVIIFGROLGVALATAPEVAIARERAREVASRLNVPDSRE

(Identidade da Seqüência No.: 4)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 1 - GACGGCTATGTCGGCGCGCCTGCCCCAC

>MT0401

GTGATCGACGGCTGGACGGAAGAACAGCACGAACCCACCGTTAGGCATGAGCGCCCAGCA
 GCTCCCCAAGACGTTTCGGCGGGTGATGTTGCTGGGTTTCGGCCGAACCCAGCCGGGAGCTG
 GCGATCGCGTTGCAGGGCTTGGGCGCGGAGGTGATCGCCGTC **GACGGCTATGTCGGCGCGC**
CCTGCCCCACCGGATAGCCGACCAAGTCGGTGGTGGTCACCATGACCGATGCTGAAGAGCTG
 ACGGCGGTGATCCGGCGGCTGCAACCGGATTTCTTGGTGACGGTCACCGCCGCGGTGTCT
 GTGGATGCTCTCGATGCCGTCGAGCAAGCCGACGGCGAGTGCACTGAGCTGGTGCCGAAC
 GCCCGTGCCGTCCGGTGACGGCCGACCGGGAGGGCCTGCGCCGGCTGGCCGCCGATCAG
 CTCGGCCTGCCACAGCCCCGTTCTGGTTCGTCGGATCCCTTGGCGAACTTCAAGCGGTG
 GCCGTCCATGCTGGGTTTCCGTTGCTGGTGAGCCCGGTGGCAGGGGTGGCTGGCCAGGGT
 AGCTCGGTGGTCCCGGGGCCAACGAGGTGAGCCCGCTGGCAGCGCGCGGCAGGCCAT
 CAAGTACAGCCGACACTGGGGGAGTGAGCCCTCGGGTGTGCGCCGAGTCGGTGGTCGAG
 ATCGAGTTTTTGGTCACCATGATCGTTGTGTGTCAGTCAGGGCCCGAACGGGCGGCTCATC
 GAGTTCTGTGCACCTATCGGTCATCGCGACGCGGATGCCGGTGAAGTTGGAATCCTGGCAA
 CCGCAGAAAGCTGAGCACGGCGCGCTGGACGCGGCCAAGTCGATCGCCGCGCGCATCGTC
 AAGGCGCTCGGGGACGCGGGTTTTCGGCGTCGAATTGATGATCAACGGCGATGAGGTG
 TATTTCCCGATGTCACCGTGTGTCTGCGGGAGTGCTGGGTACCGTGCGCAGCCAG
 CGGCTTTTCGGTGTTCGAACTGCAGGCCCGGGCGATCCTGGGTCTGGCGGTGGACACCCCTG
 ATGATCTCGCCGGGTGCCGCGCGGGTGATCAACCCGGACACACGGCAGGCCGGGCGAGCG
 GTCGGCGCCGACCACTGCCGATGCGCTGACCGGTGCGCTCGGTGTGCCGAAAGCGAC
 GTCGTGATATTCCGGCCGCGGGCTTGGGGTGGCGCTGGCCACCGCACCCGAGGTGGCAATC
 GCCCGCGAACCGCCCGCGAAGTTGCATCTCGGCTAAATGTGCCAGACTCACGCGAGTGA

(Identidade da Seqüência No.: 3)

Fig. 1A

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 6 - LAAVVGVLAAVL

>Mb0073

MLFAALRDMQWRKRLVTIISTGLIFGMTLVLTLGLANGFRVEARHTVDSMGVDVFFVRS
GAAGPFLGSIPFPDVLARVAAEPGVMAAAPLGSVGTIMKEGTSTRNVTVFGAPEHGP
PRVSEGRSPSKPDEVAASSTMGRHLGDTVEVGARRLRVVGIVPNSTALAKIPNVFLTTEG
LQKLAYNGQPNITSIGHGMPRLPEGYQTFDRVGAVNDLVRPLKVAVNSISIVAVLLWI
VAVLIVGSVVYLSALERLRDFAVFKAIGTPTRSIMAGLALQALVIALLAAVVGVLAAVL
APLFPMIVAVPVGAYLALPVAAIVIGLFASVAGLKRVTVDPAQAFGGP

(Identidade da Seqüência No.: 8)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 5 - CTTGCGGCGGTGGTGGGCGTCGTCCTGGCGCAGGTGTTG

>Mb0073

ATGCTCTTCGCGGCCCTGCGTGACATGCAATGGAGAAAGCGCCGCTGGTCATCAGGATC
ATCAGCAACCGGCTGATCTTCGGGATGACGCTTGTTTGACCGGACTCGCGAACGGCTTC
CGGCTGGAGGCCCGGCACACCGTCGATTCATGGGTGTCGATGTATTCTGCTCAGATCC
GGCGCTGCTGGACCTTTTCTGGGTCAATACCGTTTCCCGATGTTGACCTGGCCCGAGTG
GCCGCTGAACCGGCTGTCATGGCCGCGGCCCGTTGGGCAGCGTGGGGACGATCATGAAA
GAAGGCACGTCGACGCGAAACGTCACGGTCTTCGGCGCGCCCGAGCACGGACCTGGCATG
CCACGGGTCTCAGAGGGTCGGTCACCGTCGAAACCGGACGAAGTCGCGGCATCGAGCACG
ATGGGCGGACACCTCGGTGACACTGTCGAGGTCGGCGCGCGCAGATTGCGGGTCGTTGGC
ATTGTGCCGAATTCCACCGCGCTGGCCAAGATCCCAATGTCTTCCTCACGACCGAGGGC
TTACAGAAAATTGGCGTACAACGGGCAGCCGAATATCACGTCCATCGGGATCATAGGTATG
CCCCGACAGCTGCCGGAGGGTTACCAGACTTTCGATCGGGTGGGCGCTGTCAATGATTTG
GTGCGCCCAATTGAAGGTCGCAGTGAATTCGATCTCGATCGTGGCTGTTTGTCTGTGGATT
GTGGCGGTGCTGATCGTCGGCTCGGTGGTGTACCTTTCGGCTCTTGAGCGGCTACGTGAC
TTCGCGGTGTTCAAGGCGATTGGCACGCCAACGCGCTCGATTATGGCCGGGCTCGCATT
CAGGCGCTGGTCATTGCGTTGCTTGGCGCGGTGGTGGGCGTCGTCCTGGCGCAGGTGTTG
GCACCACTGTTTCCGATGATTGTGCGCGTACCGGTCGGTGCTTACCTGGCGCTACCGGTG
GCCGCGATCGTCATCGGTCTGTTCGCTAGTGTGCGCGATTGAAGCGCGTGGTGACGGTC
GATCCCGCGCAGGCGTTCGGAGGTCCCTAG (Identidade da Seqüência No.: 7)

Fig. 1B

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 10 - RSGAATPVR

>MT2160.1

MPAAPSTREKDCMLVLHGFWSNSGGMRLWAEDSDLLVKSPSQALRSGAATPVRGAR

(Identidade da Seqüência No.: 12)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 9 - CGCTCCGGCGCGGCCACACCCGTTCGC

>MT2160.1

GTGCCGGCCGCTCCGTCGACAAGAGAGAAGGACTGCATGCTGGTTTTGCACGGCTTCTGG
TCCAACTCCCGCGCGGATGCGGCTGTGGGCGGAGGACTCCGATCTGCTGCTGAAGAGCCCG
AGTCAGGCGCTGCGCTCCGGCGCGGCCACACCCGTTCGCGGCGCCCGCTGA

(Identidade da Seqüência No.: 11)

Fig. 1C

Sequência da Proteína

Identidade da Sequência No.: 14 - TCLPFAL

>MT0910.2

MSAPPAQAPVCGALAARPTAPGNASCTRPKRDCRYGSRCETCLPFALAKDCRQASSRLQ
AATEPDETTTTSVISMRSPLQYQPAT (Identidade da Sequência No.: 16)

Sequência de DNA

Identidade da Sequência No.: 13 - ACCTGCCTCCCATTCGCACTA

>MT0910.2

ATGTCCGCGCCACCCGCTCAAGCGCCGGTATGTGGCGCCTTGGCGGCTAGGCCAACCGOC
CCCGGCAACGCCAGCTGCACACGCCAGCGAAGCGCGATTGTCGGTACGGGTGCGCTGC
GAAACCTGCCTCCCATTCGCACTAGCAAAAGACTGTCGACAAGCGAGCAGTCGACTTCAG
GCCGGAACCGAACCGACGAGACGACAACAACATCTGTCATCTCAATGCGCTCACCAGGA
TCGCTACAATATCAGCCAGCTACATGA (Identidade da Sequência No.: 15)

Fig. 1D

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 18 - TTMLPFAD

>Mb1654c

MPEVTREEPAIDGWFTTDKAGNPHLLGGKCPQCGTYVFPFRADNCPNPACGSDTLESVGL
STRGKLWSYTENRYAPPPYPAPDPFEPFAVA AVELADEGLIVLGKVVDGTLAADLKVGM
EMELTTMLPFADDDGVQRIVYAWRIPSRAGDDAERSDAEERRR

(Identidade da Seqüência No.: 20)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 17 - ACGACCATGCCGCTGTTGCGCGAC

>Mb1654c

GTGCCAGAGGTCACCCGTGAAGAACCGGCAATCGATGGATGGTTCACCACCGATAAGGCC
GGCAACCCGCATCTGCTCGGCGCAAGTGTCCCCAGTGCGGCACGTACGTCTTCCCACCC
CGGGCGGACAATTGTCCGAATCCGGCTTGCGGCAGCGACACACTAGAGTCGGTCGGACTG
TCGACCCGCGGAAAAGCTTTGGAGCTACACCGAAAAACCGGTACGCCCCGCCACCGCGTAC
CCGGCACCCGACCCCTTTGAGCCGTTTGCCGTTGGCCGCGGTGGAAGTGGCCGACGAGGGA
CTGATCGTGTGGGCAAAGTGGTCGATGGCACGCTGGCCGCCGATCTGAAGGTCGGCATG
GAGATGGAGCTGACGACCATGCCGCTGTTGCGCGACGACGACGGTGTGCAAGCGCATCGTC
TACGCGTGCGCGATCCCATCGCGCGCCGGCGACGATGCAGAGCGCAGCGATGCTGAGGAG
CGGCGCCGATGA (Identidade da Seqüência No.: 19)

Fig. 1E

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 22 - VLVALAALGTQPWQDFAEQETAGLAAILDNDVTHGEWASTILAAGAVV

>Mb2347c

MPPTSMSLRELMRLRRRPVSGAPVASGASGNLKRSGTFQLTMFGVGATIGTGIFVLAQA
VPEAGPGVIVSFIIAGIAAGLAAICYAELASAVPISGSAYSAYTTLGBAVAMVVAACLL
LEYGVATAA VAVGWSGYVNKLLSNLFGFQMPHVLSAAPWDTHPGWVNLPAVILIGLCALL
LIRGASESARVNAIMVLIKLGVLGFMFIIAFSAYSADHLKDFVPPFGVAGIGSAAGTIFFS
YIGLDAVSTAGDEVKDPQKTMPRALIAALVVVTGVVYVLVALAALGTQWQDFAEQETAGLAI
LDNVTHGEWASTILAAGAVVSIFTVTLVTMYGQTRILFAMGRDGLLPARFAKVNPRMTMPVHNT
VIVAIFASTLAAFIPLDSLADMVSIGTLTAFSVVAVGVIVLRVREPDLPRGFK
VPGYPVTPVLSVLACGYILASLHWYTWLAFSGWVAVAVIFYLMWGRHHSALNEBVP
(Identidade da Seqüência No.: 24)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 21 -

GTGCTGGTCGCACTGGCCGCGCTGGGCACCCAACCGTGGCAGGACTTCGCAGAGCAGG
AAACCGCCGGCTGGCCATCATCTTGGACAACGTCACGCATGGCGAATGGGCCAGCAC
GATTCTGGCCGCGGTGCGGTGGTC

>Mb2347c

TTGCCGACAACGTCGATGAGCCTTCGAGAACTGATGCTGCGGCGCGCCCGGTGAGCGGC
GCCCGGTGCGCATCCGGGGCATCGGGGAACCTCAAGCGGAGTTTCGGCACCTTCAGCTG
ACCATGTTTCGGGGTTGGCGCGACGATAGGTACCGGCATCTTTTCGTGCTTGCCAGGCA
GTTCCAGAGGCCCGGCCCGGGCGTGATTGTTTCGTTTCATCATCGCCGGCATCGCCGCTGGG
CTCGCGGCTATCTGCTACCGGGAACCTGGCTTCGCGCGTGCCGATTTCCGGGTGCGCGTAC
TCCTACCGGTACACGACGCTGGGCGAGGCGGTGCGCATGGTGGTGGCGGCCCTGCCTACTG
CTGGAATACGGGGTAGCCACCGCAGCGGTGCGCGTGGGCTGGAGTGGCTACGTGAACAAG
CTGCTGAGTAATCTGTTTCGGATTTCAGATGCGCGCACGTATTGTCGGCGGCGCGGTGGGAC
ACCATCCCGGTGGGTGAACCTGCCCGCGGTTCATCCGATCGGGCTATGCGCGCTGCTG
TTGATTTCGAGGGGCCAGCGAGTGGCGAGGGTCAACGCGATCATGGTGTGATCAAGCTC
GGCGTGCTGGGCATGTTTCATGATCATCGCGTTCAGCGCGTACAGCGCCGACCACTCAAG
GATTTCGTCCCATTCGGCGTGGCCGGCATCGGCTCCGCGGCGGGCACGATCTTCTTCTCA
TACATCGGCTTGACGCGGTGTGACCGCGCGGCGACGAGGTGAAGGACCCGAGAAAGACC
ATGCCGCGTGCGCTGATCGCAGCGCTGGTGGTCTGTCACCGGTGTCTACGTGCTGGTGGCA
CTGGCCGCGCTGGGCACCCAACCGTGGCAGGACTTCGCAGAGCAGGAAACCGCGGGC
TGGCCATCATCTTGGACAACGTCACGCATGGCGAATGGGCCAGCACGATTCTGGCCGGC
GGTGGCGTGGTCTCGATTTTCACCGTCACGCTGGTCACCATGTACGGCCAGACCCGGATCCT
GTTTCGGATGGGGCGCGACGGGCTGCTGCGGCGCGGTTTCGCGAAGGTGAATCCGCGCAC
ATGACGCGCGTGACAAACACGCTGATCGTCGCGATCTTCGCATCGACGCTGGCCGCTTC
ATACCGCTGGATAGCTTGGCGGACATGGTGTCCATCGGCACGCTACCGCGTTACGCGTG
GTGGCTGTGGGTGTGATCGTTCTACGGGTGCGCGAGCCCGACTTACCCCGAGGGTTCAAG
GTACCCCGTTACCTGTGACGCGCTGTTCTTTCGGTGTGCGCTGCGCGTATATCTGGCC
AGCTTGCACTGGTACACCTGGCTGGCGTTCAGCGGATGGGTGGCGGTGGCAGTGATCTTT
TAOCTGATGTGGGGTCGGCACCAAGTGCCTCAACGAGGAAGTGCCGTGA

(Identidade da Seqüência No.: 23)

Fig. 1F

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 26 - CAVVLATMPPLLSAIANA

>MT1515

MTLTACEVTAABAPFDRVSKTIPHPLSWGAALWSVSVRWATVALLLFLAGLVAQLNGAP
EAMWWTLYLACYLAGGWGSAWAGAALRNKALDVDLLMIAAVGAVAIGQIFDGALLIVI
FATSGALDDIATRHTAESVKGLLDLAPDQAVVQGDGSESVVAASELVGDRVVVRPGDR
IPADGAVLSGASDVQDSITGESMPVAKARGDEVFAGTVNGSGVLHLVVTRDPSQTVVAR
IVELVADASATKAKTQLFIEKIEQRYSLGMVAATLALIVIPLMFGADLRPVLLRAMTFMI
VASP**CAVVLATMPPLLSAIANA**GRHGVLVKSAVVVERLADTSIVALDKTGTLTRGIPRLA
SVAPLDPNVVDARRLLQLAAAAEQSSEHPLGRAIVAEARRRGIAIPPAKDFRAVPGCGVH
ALVGNDFVEIASPQSYRGAPLAELAPLLSAGATAAIVLLDGVAIGVLGLTDQLRPDAVES
VAAMAALTAAPPVLLTGDNGRAAWRVARNAGITDVRAALLPEQKVEVVRNLQAGGHQVLL
VGDGVNDAPAMAAARAAMGAGADLTQTADGVTIRDELHTIPTIIGLARQARRVVTVN
LAIAATFIAVLVLWDLFGQLPLPLGVVGHEGSTVLVALNGMRLLTNRSWRAAASAAR
(Identidade da Seqüência No.: 28)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 25 -

TGCGCGGTGGTGTCTGGCCACCATGCCGCCGCTGCTTTCGGCGATCGCCAACGCA

>MT1515

ATGACCTTGACCGCTTGTGAAGTAACTGCCCGGAGGCTCCTTTCGACCGCGTTTCAAAG
ACCATTCCCCACCCATTGAGCTGGGGAGCCGCGCTGTGGTCGGTAGTCTCCGTGCGCTGG
GCCACCGTGGCGCTGTCTGTCTTCTCGCGGACTAGTGGCGCAACTGAACGGTGCTCCC
GAGGCCATGTGGTGGACGCTTTACCTGGCCTGTTATCTGGCCGGCGGCTGGGGCTCGGCA
TGGGCGGGCGCACAAAGCGTTGCGGAACAAGGCACCTTGATGTGGATCTGCTGATGATTGCC
GCGGCGGTGCGGAGCGGTGCGGATTGGGCAGATCTTCGACGGCGCGCTGCTGATCGTGATC
TTGCCACGTCCGGTGGCTGGATGACATTGCCACCAGACACACCGCGGAATCGGTCAAAA
GGCCTGCTGGACCTCGCGCCGGATCAGGCGGTGGTGGTCCAGGCGACGGCAGCGAACCGG
GTGGTGGCGGCCAGCGAGCTGGTGGTGGGGGACCGGTGGTGGTGGCGCCGGGGGACCGG
ATACCCGACAGACGGTGGGTGCTGTGGGGGCTAGCGACGTGACCAACGCTCGATCAACC
GGTGAATCGATGCGGGTGGCCAAGGCCGCGGTGACGAGGTGTTCCGCGGCACCGTGAAC
GGATCGGGTGTATTGCATCTGGTGGTCAACCGTGACCCGAGCCAGACCGTGGTAGCCCCG
ATCGTCGAACCTGGTGGCGACGCTTCGGCGACGAAGGCCAAAACCCAACTGTTCAATTGAG
AAAATCGAGCAACGCTACTCCCTGGGCATGGTGGCGGCCACCTTGCCCTCATCGTTATT
CCGCTGATGTTCCGGCGCGACCTGCGGCGGTGCTGCTGCGCGCCATGACCTTCATGATC
GTGGCATCGCCAT**TGCGCGGTGGTGTCTGGCCACCATGCCCGCGCTGCTTTCGGCGATCGC**
CAACCGCAGGCGGTCATGGGGTGTGCTCAAATCCGCGGTGGTGGTGGTGAACCGCTGGCCGAT
ACCAGCATCGTCGCTTTGGACAAGACCGGTACGCTGACCCGTGGCATCCCCGCGACTGGCT
TCCGTGCGACCCGTGGACCCCAACGTGGTGGATGCCCGCGGATTGTTGCAATTGGCAGCT
GCCGCAGAACAAATCCAGCGAGCACCCGCTTGGCCGGGCGATCGTCGCGGAAGCTCGTCGG
CGTGGTATCGCCATACCGCCCGCCAAGGACTTCCGCGCGGTCCCGGGCTGCGGGGTCCAC
GCCCTGGTGGGCAACGATTTGCTCGAGATCGCCAGCCCGCAAAGCTACCGCGGTGCACCG
CTAGCAGAGCTGGCGCGCTCCTTTCTGCCGGCGCCACTGCCGCCATCGTCTTGTGGAT
GGAGTTGCCATCGGTGTGCTCGGGCTACCGATCAGCTTCGTCCGGATGCCGTGGAGTCC
GTCCGGCGGATGGCTGCATTGACCGCCGACACCGGTGCTGCTCACGGGTGACAACGGG
CGAGCGGCTTGGCGGGTGGCTCGGAACGCGGGATCACCGATGTGCGAGCCGCTTGTGCTG
CCCGAGCAGAAGGTTGAAGTCGTGCGCAACCTGCAGGCGGTGGTACCAGGTGCTGCTC
GTCCGGCAGCGGCTCAACGACGCTCCCGCCATGGCCGCCCGCCGCGCGCTGTGCCCATG
GGCGCCGGCGCGGATCTGACCTACAGACCGCAGACGGGTGACCATAACGGGACGAACCTG
CACACCATCCCGACGATCATCGGGTTGGCAGGCGAGGCGCGCGGGTGGTACCGTCAAC
CTGGCCATCGCGGCCACCTTCATCGCGCTCCTGGTGGTGTGGGACCTTTTGGCGAGCTG
CCGCTGCCACTGGGTGTGGTGGGTACGAAGGGTCCACTGTGCTGGTGGCGCTCAACGGC
ATGCGGCTATTGACCAACCGGTGCTGGCGGGCGCGGCTTCGGCTGCGCGTTAG
(Identidade da Seqüência No.: 27)

Fig. 1G

Identidade da Sequência No.	Sequência	Anotação do TIGR Swiss-Prot	Número da Proteína
2	DGYVGAPAH (9mer)	MT0401	~~P85197~~ 5'-Fosforribosilglicinamida transformilase 2
6	LAADVVOVLAQVL (13mer)	Mb0073	~~Q7U2X1~~ Provável transportador ABC de proteína transmembrana de transporte de glutamina
10	RSGAATPVR (9mer)	MT2160.i	~~Q8V1Q5~~ Proteína hipotética
14	TCLPFAL (7mer)	MT0910.2	~~Q8VKG1~~ Proteína hipotética
18	TYMPLFAD (8mer)	Mb1654c	~~Q7TZV3~~ Proteína hipotética
22	VLVALAAIGTQPWQDPAEQRTAGLAHLDNV THGBWASTILAAGAVV (47mer)	Mb2347c	~~Q8TYU0~~ Provável proteína ROCE de membrana integral de transporte de aminoácidos catiônicos
26	CAVVLATMPPLLSAANA (8mer)	Mb1504	~~Q52180~~ Provável ATPase D do tipo de transporte de cátions

Fig. 1H

Seqüências de proteína e de DNA do peptídeo de TB encontrado na urina de paciente com TB:

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 30 - MVIIELMRR

>MT1721

MVIIELMRRVVGLAQGATAEVAVYGDRDRDLAERWCANTGNTLVRADVDQTGVGTLVVR
GHPPDPASVLGPDRLPGVRLWLYTNFHCNLCCDYCCVSSSPSTPHRELGAERIGRIVGEA
ARWGVRELFITGGEPFLLPDIDTIIATCVKQLPTTVLTNGMVFKGRGRRALESLEPRGLAL
QISLDSATPELHDAHRGAGTWKAVAGIRLALS LGFRVRVAATVASPAGELTAFHDFLD
GLGIAPGDQLVRPIALEGAASQGVALTRESLVPEVTVTADGVYWHPPVAATDERALVTRTV
EPLTPALDMVSRLFAEQWTRAEEALFPCA (Identidade da Seqüência No.: 32)

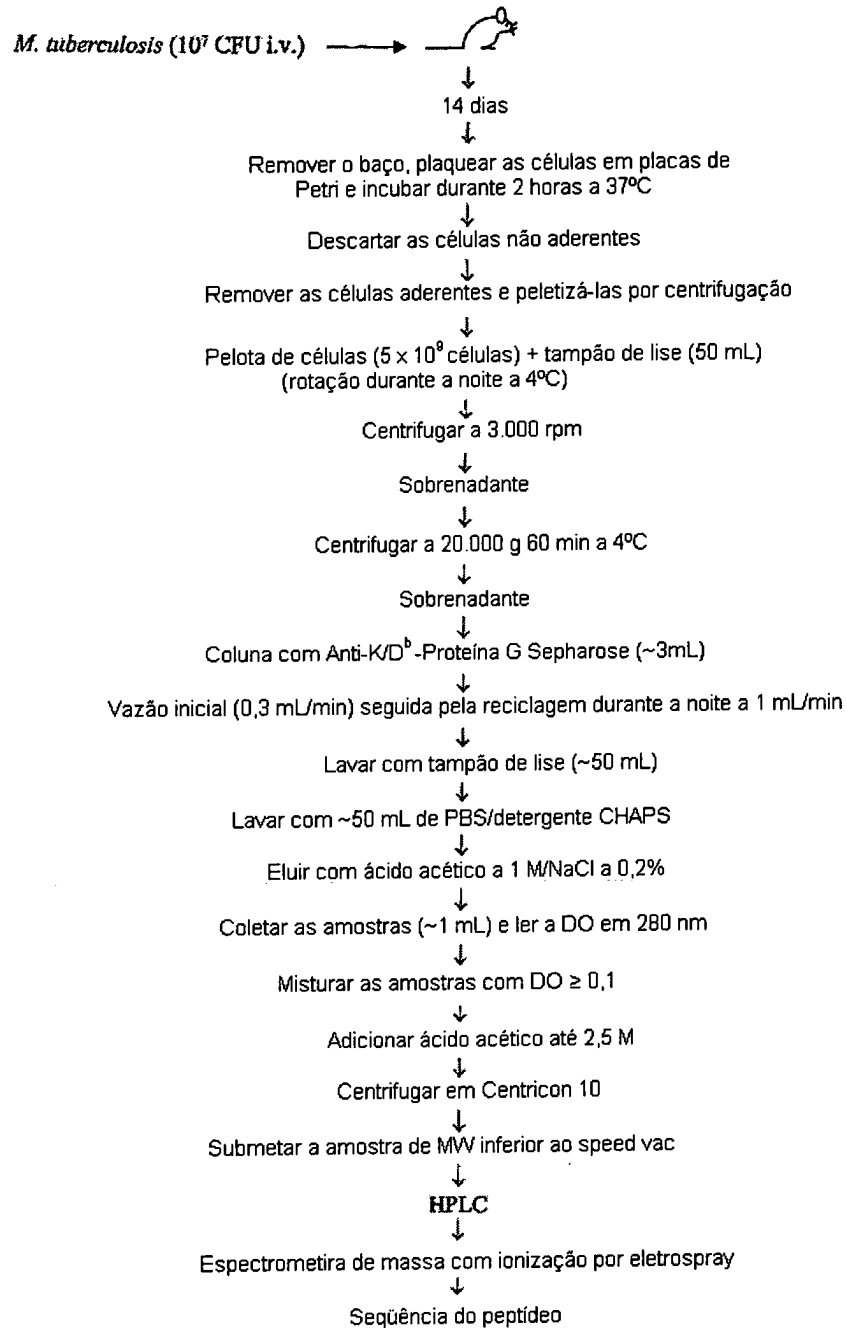
Seqüência do DNA

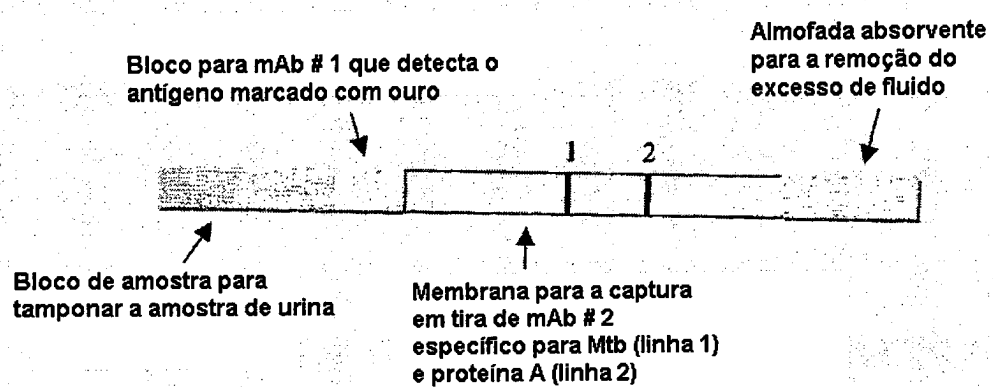
Identidade da Seqüência No.: 29 - ATGGTGATCATAGAGCTGATGCGCCCGG

>MT1721

ATGGTGATCATAGAGCTGATGCGCCCGGTGGTAGGTCTCGCACAGGGAGCTACCGCCGAG
GTCCGCCGTCTATGGCGACCGAGATCGTGATCTCGCGGAGCGATGGTGCGCGAACACCGGA
AACACCCCTGGTGCGCGCCGACGTGGACAGACCGCGCTCGGCACCCCTGGTGGTGCGCCG
GGCCATCCGCCGTGACCCGGCAAGCGTGTGGGCCCCGACCGGCTACCCGGGGTCCGGTTG
TGGCTGTACACCAACTTCCACTGCAACCTGTGCTGCGACTACTGCTGCGTCTCGTCTCA
CCAAGCACCCCGCATCGCGAACTGGGGGCGGAGCGGATCGGCCGAATCGTGGTGAAGCG
GCGCGTGGGGAGTGGCGCACTGTTCTCACCGCGGTGAGCCGTTCCTGCTGCCCGAC
ATCGACACGATCATCGCGACCTGTGTGAAGCAGTTGCCACCACCGTCTCTACCAACGGC
ATGGTGTTCAAAGGGCGGGGTGGCGCGCGCTGGAATCCCTACCTAGAGGGCTCGCCTTG
CAGATCAGCCTGGACTCGGCCAOCCTGGCGAGCTGCACGATGCGCACCGCGCGCGGGGACG
TGGGTCAAGGCAGTAGCTGGTATCCGGTTGGCGCTCTCACTTGGCTTCCGGGTGCGGGTG
GCCGCGACGGTTGCCAGOCCTGCACTGGCGAGCTGACGGCGTTTCACGACTTCCTCGAC
GGGCTTGGCATCGCACCCGGGATCAGCTGGTCCGCGCGATCGCGCTGGAGGGGCGCCG
TCGCAAGGGGTGGCGCTCACCGCGAATCGCTGGTCCCGAGGTGACCGTCACCGCGAC
GGCGTGTACTGGCACCCAGTGGCGGCCACCGACGAGCGCGCCCTGGTCACCCGTACCGTC
GAACCCCTTGACCCGGCGCTGCACATGGTAAGCCGGCTATTCGCCGAACAGTGGACACGA
GCCGCCGAAGAGGCGCGTGTTCCTCGTGTGCTAG (Identidade da Seqüência No.: 31)

Fig. 2

**Fig. 3**

**Fig. 4**

Peptídeos de *Mycobacterium tuberculosis* encontrado na urina de pacientes com tuberculose pulmonar

Identidade da Sequência No.	Peptídeo	Proteína doadora de <i>M. tuberculosis</i>
34	R.ATADQIGTQTTQIAAIK.A	Homoserina O-acetiltransferase
38	R.TAEERANAVRGRADSLR.R	Proteína smc de partição de cromatografia
42	R.LHAQKALLVLLER.S	Ornitina carbamoiltransferase
46	R.WTDETFGDIGGAGGGVSGHR.G	Fosfoadenosina fosfossulfato redutase

Fig. 5

Proteína: Homosserina O-acetiltransferase

Peptídeo: R.ATADQIGTQTTQIAAIK.A (Identidade da Sequência No.: 34)

Anotação do TIGR para MT3444	
Nome do locus de TIGR:	MT3444
Nome do locus primário:	nenhum
SWISS-PROT/TrEMBL AC:	<u>O53391</u>
Suposta identificação:	homosserina O-acetiltransferase
Símbolo gênico:	metA
Função(ões) Celular(es) do TIGR:	biossíntese de aminoácidos; família do aspartato
Coordenadas:	3725096 até 3726235
Nome da molécula de DNA:	CDC1551 de M. tuberculosis cromossômica
Comprimento do gene:	1140
Comprimento da proteína:	379
Peso molecular:	39798,68
pI:	5,3912
Porcentagem de GC:	69,31%
# de Licença da Enzima:	<u>2.3.1.31</u>
Reino:	Bacteria
Família:	Actinobacteria

Fig. 6A

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 34 - RATADQIGTQTTQIAAIKA

>MT3444

MTISDVPTQTLPAEGEIGLIDVGSLLQLESGAVIDDVCIQVQRWGKLSFARDNVVVVLHAL
TGDSHITGPAGPGHPTPGWWDGVAGPSAPIDTTRWCAVATNVLGCRGSTGPSSSLARDGK
PWGSRFPLISIRDQVQADVAALAALGITEVAVVGSMGGARALEWVVGYPDRVRAGLL
AVGARATADQIGTQTTQIAAIKADPDWQSGDYRETGRAPDAGLRRLARRFAHLYRGEIEL
DTRFANHNGNEDPTAGGRYAVQSYLEHQGDKLLSRFDAGSYVILTEALNSHDVGRGRGG
VSAALRACFPVPPVVGITSDRLYPLRLQOELADLLPGCAGLRVSVYGHGDFIVETEAV
GELIRQTLGLADREGACRR (Identidade da Seqüência No.: 36)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 33 -

CGTGCCACCGCAGACCAGATCGGCACGCAGACAACGCAAATCGCGGCC
ATCAAAGCC

>MT3444

ATGACGATCTCCGATGTACCCACCCAGACGCTGCCCGCCGAAGGCCAAATCGGCCTGATA
GACGTCGGCTCGCTGCAACTGGAAAGCGGGCGGTGATCGACGATGTCTGTATCGCCGTG
CAACGCTGGGGCAAATTGTGCGCCGCAACGGGACAACGTGGTGGTGGTCTTGCACGCGCTC
ACCGGGCGACTCGCACATCACTGGACCGCGCCGACCCCGGCCACCCACCCCGGCTGGTGG
GACGGGGTGGCGGGCCGAGTGCGCCGATTGACACCCACCCGCTGGTGCGCCGTAGCTACC
AATGTGCTCGGGGGCTGCCGGGCTCCACCGGGCCAGCTCGCTTGCCTCGACGGAAG
CCTTGGGGCTCAAGATTTCCGCTGATCTCGATACGTGACCAAGGTGCAGGCGGACGTCGCG
GCGCTGGCGCGCTGGGCATCACCGAGGTGCGCGCGCTCGTGGCGGGCTCCATGGCGGG
GCCCGGGCCCTGGAATGGGTGGTTCGGCTACCGGATCGGGTCCGAGCCGATTGCTGCTG
GCGGTGCGGTGCGCGTGCCACCGCAGACCAGATCGGCACGCAGACAACGCAAATCGCGGCC
ATCAAAGCCGACCCGGAAGTGGCAGAGCGCGACTACCACGACAGGGGAGGGGACACAGAC
GCCGGGCTGCGACTCGCCCGCGCTTCGCGCACCTCACCTACCGCGGCGAGATCGAGCTC
GACACCCGGTTCGCCAACCACAACAGGGCAACGAGGATCCGACGGCCGGCGGGCGCTAC
GCGGTGCAAAGTTATCTGGAACACCAAGGAGACAACTGTTATCCCGGTTCCGACGCCGGC
AGCTACGTGATTCTCACCGAGGCGCTCAACAGCCACGACGTCCGCCCGCGCGCGGGG
GTCTCCGCGGCTCTGCGCGCTGCCCCGTGCCGTGGTGGTGGGCGGCATCACCTCCGAC
CGGCTTACCCGCTGCGCCTGCAGCAGGAGCTGGCCGACCTGCTGCCGGGTGCGCGGG
CTGCGAGTCTGAGTCCGTCTACGGACACGACGGCTTCCTGGTGGAAACCGAGGCCGTG
GGCGAATTGATCCGCCAGACACTGGGATTGGCTGATCGTGAAGGCGCGGTGTCGGCGGTGA
(Identidade da Seqüência No.: 35)

Fig. 6B

Proteína: Proteína smc de partição de cromossomo

Peptídeo: R.TAEERANAVRGRADSLR.R (Identidade de Sequência No.: 38)

Anotação do TIGR para MT2990	
Nome do locus de TIGR:	MT2990
Nome do locus primário:	nenhum
SWISS-PROT/TrEMBL AC:	Q10970
Suposta identificação:	suposta proteína SMC de segregação cromossômica
Função(ões) Celular(es) do TIGR:	Processos celulares; Divisão celular
Coordenadas:	3232127 até 3228510
Nome da molécula de DNA:	CDC1551 de M. tuberculosis cromossômica
Comprimento do gene:	3618
Comprimento da proteína:	1205
Peso molecular:	130637,03
pl:	4,9064
Porcentagem de GC:	67,28%
Reino:	Bacteria
Família:	Actinobacteria

FIG. 7A

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 38 - RTAEERANABRGRADSLRR

>MT2990

MYLKSLLTKGFKSFAAPTTLRFEPGITAVVGPNGSGKSNVVDALAWVMGEQGAKTLRGGK
MEDVIFAGTSSRAPLGRAEVTVSIDNSDNALPIEYTEVSITRRMFRDGASEYEINGSSCR
LMDVQELLSDSGIGREMHVIVGQKLEILLQSRPEDRRAFIEEAAGVLKHKRKEKALRK
LDTMAANLARLTDLTTELRRQLKPLGRQAEAAQRAAAIQADLRDARLRLAADDLVSRRAE
REAVFQAEAAAMRREHDEAAARLAVASEELAHAHESAVAEELSTRAESIQTWFGLSALAERV
DATVRIASERAHHLDIEPVAVSDTDPRKPEELEAEAQVAVAEQQLLAELDAARARLDAA
RAELADRERRAAEADRAHLAAVREEADRREGLARLAGQVETMRARVESIDESVARLSERI
EDAMRAQQTRAFFETVQGRIGELDQGEVGLDEHHERTVAALRLADERVAELQSAERAAE
RQVASLRARIDALAVGLQRKDGAAWLAHNRSAGLFGSIAQLVKVRSGYEALAAALGPA
ADALAVDGLTAAGSAVSALKQADGGRAVLVLSDWPAQAPQASAGEMPLPSGAQWALDLVE
SPPQLVGAMIAMLSGVAVVNDLTEAMGLVEIRPELRVTVGDVVGAGWVSGGSDRKLST
LEVTSIDKARSELAAAEALAAQLNAALAGALTEQSARQDAEEQALAAALNESDTAISAMY
EQLGRLGQEARAAEEEWNRLLQORTEQEAVRTQTLDDVIQLETQLRKAQETQRVQVAQPI
DRQATSAADRARGVEEARLAVRTAEERANAVRGRADSLRRAAAEREARVRAQQARAA
RLHAAVAAAVADCGRLLAGRLHRAVDGASQLRDASAAQRQORLAAMAAVRDEVNTLSAR
VGELTDSLHRDELANAQAALRIEQLEQMVLEQFGMAPADLITEYGPHVALPPELEMAEF
EQARERGEQVIAPAMPFDRVTVQERRAKRAERLAEELGRVNPLALEEFAALEERYNFLST
QLEDVKAARKDLGLGVADVADARILQVFNDAFVDVEREFGRVFTALFPGGEGRLRLTEPDD
MLPTGIEVEARPPGKKITRLSLLSGGEKALTAVAMLVAFRRPSPFYIMDEVEAALDDV
NLRRLLSLFEQLREQSQIIITHQKPTMEVADALYGVTMNDGITAVISQMRMGQVVDQL
VTNSS (Identidade da Seqüência No.: 40)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 37 -

CGCACCGCCGAGGAACGCGCCAACGCGGTTCCGCGGGCGGGCCGATTCCGT
GCGCCGT

>MT2990

GTGTACCTCAAGAGTCTGACGTTGAAGGGCTTCAAGTCCTTCGCCGCGCCGACGACTTTA
CGCTTCGAGCCGGGCATTACGGCCGTGCTTGGGCCCAACGGCTCCGGCAAATCCAATGTG
GTCGATGCCCTGGCGTGGGTGATGGGGGAGCAGGGGGCAAAGACGCTGCGCGCGGCAAG
ATGGAAGACGTCATCTTCGCCGGCACCTCGTCGCGTGCCTGCGCGCTGGCGCCGCGCGAAGTC
ACCGTTAGCATCGACAACCTCCGACACGCACTGCCTATCGAATACACCGAGGTGTCGATC
ACCCGAAGAATGTTTCGGCAGCGTGCCAGCGAATACGAAATCAACGGCAGCAGTTGCCGT
TTGATGGATGTGCAGGAGTTGCTGAGCGACTCCGGCATCGGCCGTGAGATGCATGTGATT
GTTGGCAAGGGAAGCTCGAGGAGATCTTGCAGTCGCGGCTGAGGATCGGCGGGCGTTT
ATCGAGGAAGCCGCGGTGTGCTCAAGCATCGCAAGCGCAAGGAAAAGCTCTGCGCAAA
CTCGACACGATGGCGGCGAACCTGGCCCGGCTCACCAGATCTGACCAACGAGCTCCGCGCT
CAACTCAAACCGCTGGGCGGCGAGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GATCTGCGCGACGCGCGGCTGCGCCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGGGAAGCGGTCTTTCAGGCGGAGGCTGCGATGCGCGCGGAGCATGACGAGGCGGCGGCGG
CGGCTGGCGGTGGCATCCGAGGAGCTGGCGCGGCGATGAGTCCGCGGTGCGCGAATCTCG
ACGCGGGCCGAGTCGATCCAGCACACTTGGTTCGGGCTGTCTGCGCTGGCGGAAACGGGTG
GACGCTACGCTGCGCATCGCCAGCGAACGCGCCCATCATCTCGATATCGAGCCGCTAGCG

FIG. 7B

GTCAGCGACACCGACCCAGAAAGCCCGAGGAGCTAGAAGCCGAGGCCACAGAGGTGGCC
 GTCGCCGAGCAACAACTGTTAGCGGAGCTGGACGCGGCGCGTGCCCGACTCGATGCTGCC
 CGTGCAAGAGCTGGCCGACCGGGAGCGCCGCGCCGCGAGGCCGACCGGGCACACCTGGCG
 GCGGTCCGGGAGGAGGCGGACCGCGTGAGGGAAGTGGCGCGGCTGGCTGGCCAGGTGGAG
 ACCATGCGGGCGCGTGTGAATCGATCGATGAGAGCGTGCCACGGTTGTCCGAGCGGATC
 GAGGATGCCGCAATGCCGCGCCAGCAGACCCGAGCCGAGTTCCGAAACCGTGACGGGCCG
 ATCGGTGAATGGATCAAGGCGAGGTGCGCCTGGATGAGCACCACGAGCGTACTGTGGCC
 GCGTTGCGGTGGCCGACGAACGCGTCGCGGAGCTGCAATCCGCGAACGCGCCGCGAA
 CGCCAGGTGGCATCGCTACGGGCTCGCATCGATGCGCTCGCAGTGGGGCTACAGCGCAAG
 GACGGCGCGCGTGGCTGGCGCACAAATCGCAGTGGCGCAGGGCTTTTCGGTTCGATCGCC
 CAATTGGTGAAGGTACGTTCCGGCTATGAAGCGGCACTGGCCGCGCGCTCGGGCCGCG
 GCGGACGCACTTGGCGTGGACGGCTGACTGCCGCGGTAGTGCCGTGAGCGCACTCAAA
 CAAGCCGACGCGCGTTCGCGCGGTCTCGTGCTGAGTGAAGTGGCCGCGCCCGCAAGCCCC
 CAATCCGCTCGGGGGAGATGCTGCCAGCGCGCCAGTGGGCCCTAGACCTGGTGGAG
 TCTCCACCGCAGTTGGTTGGCGCGATGATCGCCATGCTTTTCGGGTGTGCGGTGGTCAAC
 GACCTGACTGAGGCAATGGGCGTGGTTCGAGATTGCTCGGAGCTACGCGCGGTCAACGTT
 GACGGTGATCTGGTGGGCGCGGTGGGTGAGCGCGGATCGGACCGCAAGCTGTCCACC
 TTGGAGGTCACTCCGAGATCGACAAGGCCAGGAGTGAAGTGGCCGCTGCGGAGGCGCTG
 GCGGCGCAATTGAATGCGGCCCTGGCCGCTGCGCTGACCGAGCAGTCCGCCCGCCAGGAC
 GCGGCCGAGCAAGCCTTGGCCGCGCTTAACGAATCCGACACGCGCATCTCGGCGATGTAC
 GAGCAGCTGGGCGCGCTCGGGCAGGAGGCCGCGCGCGCGGAAGAAGAGTGAACCGGTTG
 CTGAGCAGCGTACGGAACAGGAAGCCGTGCGCACACAGACTCTCGACGACGTCATACAA
 CTTGAGACCCAGCTGCGTAAGGCCAGGAGACCCAAAGGGTGCAGGTGGCCCAACCGATC
 GACCGCCAGGCGATCAGTGCCGCTGCGGATCGCGCCGCGGTGTGGAAGTGAAGCCCGG
 CTGGCGGTGCGCACCGCGAGGAACGCGCCAAACGCGTTTCGCGGGCGGGCGGATTTCGCTG
CGCGGTGCGGCGAGCGCGGAACGTGAGGCGCGGTGCGGGCTCAGCAAGCACGCGCCGA
 AGACTGCATGCGGCGCGGTGGCCGAGCGGTGCGCGACTGCGGACGGCTGCTGGCCGG
 CGGTGCAACCGGGCGGTGGACGGGGCTGCAACTGCGCGACGCGTCCGCGCGCAACGT
 CAGCAGCGGTAGCGCGATGGCCGCGGTGCGGACGAGGTGAACACGCTGAGCGCCGA
 GTGGGGGAACCTACCGATTGCTGCAACCGCGACGAGTGGCTAACGCGCAGGCGGCGCTG
 CGTATCGAGCAGCTTGAAGCAGATGGTGTAGAGCAGTTCCGAATGGGCGCGCGGACTTG
 ATCACCAGAAATACGGTCCACATGTGGCGCTACCACGACCGAGCTCGAGATGGCTGAGTTC
 GAGCAAGCCCGCAACGCGCGGAGCAGGTGATTGCGCCGCGCCCATGCGGTTTCGACCGG
 GTTACCCAGGAGCGCGGGCCAAACGCGCGGAGCGTGGCTTCCGAGTTGGGCAGGGTC
 AACCCGCTGGCGCTCGAAGAGTTTCTGCTTGGAGGAGCGCTACAAATTCCTGTCCACC
 CAACTCGAGGATGTCAAGGCTGCCCGCAAGGATCTGCTGGGCGTCTGCGCGATGTTGAC
 GCCCGCATCTGCGAGGTGTTCAATGACGCGTTCTGAGACGTGGAACGCGAATTTCCGCGC
 GTGTTCAACCGCATGTTCCCGGTGGTGAAGGACGGCTGCGGCTGACCGAGCCCCGACGAC
 ATGCTCACCACCGCATCGAGGTGGAAGCCCCCGCGCGGCAAGAAGATTACCCGACTG
 TCTTTGCTCTCCGGTGGCGAGAAGGCGTGACCGCGGTGGCGATGCTGGTCCGATCTTT
 CGTGCCCGTCCATGCGGTTCTACATCATGGACGAGGTGGAGGCCGCCCTCGACGACGTG
 AACCTGCGCCGACTGCTCAGCCTGTTTGAACAGCTGCGAGAGCAGTGCAGATCATCATC
 ATCACCACAGAGCCGACGATGGAGGTGCGGACGCACTGTACGGCGTAACCATGACG
 AACGACGGCATCAACGCGTCTCTCGCAGCGCATGCGCGGTGAGCAGGTGGATCAGCTG
 GTTACCAATTCCTCGTAG (Identidade da Sequência No.: 39)

FIG. 7C

Proteína: Ornitina carbamoiltransferase

Peptídeo: R.LHAQKALLVWLLER.S (Identidade de Sequência No.: 42)

Anotação do TIGR para MT1694	
Nome do locus de TIGR:	MT1694
Nome do locus primário:	nenhum
SWISS-PROT/TrEMBL AC:	<u>P94991</u>
Suposta identificação:	ornitina carbamoiltransferase
Símbolo gênico:	argF
Função(ões) Celular(es) do TIGR:	biossíntese de aminoácidos; família da glutamina
Coordenadas:	1860829 até 1861752
Nome da molécula de DNA:	CDC1551 de M. tuberculosis cromossômica
Comprimento do gene:	924
Comprimento da proteína:	307
Peso molecular:	33057.22
pI:	5.0574
Porcentagem de GC:	68.95%
# de Licença da Enzima:	<u>2.1.3.3</u>
Reino:	Bacteria
Família:	Actinobacteria

FIG. 8A

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 42 - RLHAQKALLVWLLERS

>MT1694

MIRHFLRDDDLSPAEQAEVLEIAAELKKDPVSRRLQGPGRGVAVIFDKNSTRTFSFELG
IAQLGGHAVVVDSGSTQLGRDETLDQDTAKVLSRYVDAIVWRTFGQERLDAMASVATVPVI
NALSDEFHPCQVLADLOTIAERKGLRGLRLSYFGDGANNMAHSLLLGGVTAGIHVTVA
PEGFLPDPSVRAAAERRAQDTGASVTVTADAHAAAAGADVLTDTWTSMGQENDGLDRVK
PFRPFQLNSRLALADSDAIVLHCLPAHRGDEITDAVMDGPASAVWDEAENRLHAQKALL
VWLLERS (Identidade da Seqüência No.: 44)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 41 -

CTGCACGCGCAGAAGGCGCTGCTGGTGTGGCTGCTGGAGCGCTCATGA

>MT1694

GTGATCAGGCATTTCCTGCGCGACGACGATCTGTCCCCGGCCGAACAGGCCGAGGTGCTC
GAGCTCGCGGCCGAGCTGAAGAAAGACCCGGTTAGCCGTCGTCCCCTGCAAGGGCCGCGC
GGGGTGGCGGTCATCTTCGACAAGAACTCCACCCGCACCCGGTTCTCCTTCGAGCTGGGC
ATCGCGCAGCTGGGCGGGCATGCCGTCGTGTCGACAGCGGCAGCACCCAGCTGGGCGGC
GACGAAACCCCTGCAGGACACCGCAAAGGTGTTGTCCCGCTACGTCGATGCCATCGTCTGG
CGAACCTTCGGCCAAGAGCGGCTGGACGCCATGGCGTCGGTCGCGACGCTGCCCGTCATC
AACCGCGCTCTCCGATGAGTTCCATCCGTGTGAGGTGTTGGCCGACCTGCAGACCATCGCC
GAACGCAAGGGGGCGCTGCGGGGCTGAGGTTGTCTACTTCGGCGACGGCGCCAAACAAC
ATGGCCCACTCGCTGCTGCTCGGCGGGGTCAACGCGGGTATCCACGTCACCGTCGCGGCT
CCCGAGGGCTTCCTGCCCGACCCGTCGGTGCAGGCGCGCGCGAGCGCGCGCCAGGAT
ACCGGCGCCTCGGTGACTGTGACCGCCGACGCCACGCGGCGCGCGCGCGCGGCGGACGTT
CTGGTCAACGACACCTGGACGTGATGGGCCAGGAAACGACGGGTTGGACCGAGTGAAG
CCGTTTCGGCCGTTTCAGCTCAACTCGGCACTTCTGGCGCTGGCCGACTCGGATGCCATC
GTGTTGATTGCCTGCCGGCCATCGCGGCGACGAGATCACCGACGCGGTGATGGACGGG
CCGCGCAGCGCGGTGTGGGACGAGGCCGAAACCGGCTGCACGCGCAGAAGGCGCTGCTG
GTGTTGGCTGCTGGAGCGCTCATGA (Identidade da Seqüência No.: 43)

FIG. 8B

Proteína: Provável fosfoadenosina fosfossulfato redutase

Peptídeo: R.WTDETFGDIGGAGGGVSGHR.G (Identidade de Sequência No. 46)

Anotação do TIGR para MT2462	
Nome do locus de TIGR:	MT2462
Nome do locus primário:	nenhum
SWISS-PROT/TrEMBL AC:	<u>P71752</u>
Suposta identificação:	fosfoadenosina fosfossulfato redutase
Símbolo gênico:	cysH
Função(ões) Celular(es) do TIGR:	biossíntese de aminoácidos; família da serina Metabolismo intermediário central; metabolismo do enxofre
Coordenadas:	2683698 até 2684462
Nome da molécula de DNA:	CDC1551 de M. tuberculosis cromossômica
Comprimento do gene:	765
Comprimento da proteína:	254
Peso molecular:	27422,87
pi:	4,9994
Porcentagem de GC:	64,30%
# de Licença da Enzima:	<u>1.8.99.4</u>
Reino:	Bacteria
Família:	Actinobacteria

FIG. 9A

Seqüência da Proteína

Identidade da Seqüência No.: 46 - RWTDETFGDIGGAGGGVSGHRG

>MT2462

MSGETTRLTEPQLRELAARGAAELDGATATDMLRWTDETFGDIGGAGGGVSGHRGWTCN
YVVASNMADAVLVDLAAKVRPGVPVIFLDTGYHFFVETIGTRDAIESVYDVRVLNVTPEHT
VAEQDELLGKDLFARNPHECCRLRKVVPLGKTLRGYSAWVTGLRRVDAPTRANAPLVSFD
ETFKLVKVNPLAAWTDQDVQEYIADNDVLVNPLVREGYPSIGCAPCTAKPAEGADPRSGR
WQGLAKTECGLHAS (Identidade da Seqüência No.: 48)

Seqüência de DNA

Identidade da Seqüência No.: 45 -

CGCTGGACCGACGAAACCTTCGGCGACATCGGCGGCGCCGGCGG
CGGCGTGAGCGGACATCGCGGG

>MT2462

ATGAGCGGCGAGACAACCAGGCTGACCGAACCGCAACTACCTGAGCTGGCCGCGCGCGGA
GCTGCCGAACCTCGACGGCGGCCACCGCCACCGACATGTTGCGCTGGACCGACGAAACCTTC
GGCGACATCGGCGGCGCGCGCGGCGGCGCTGAGCGGACATCGCGGGTGGACAACGTGCAAC
TACGTAGTTGCTTCCAACATGGCTGATGCGGTGCTGGTGGATCTGGCCGCCAAGGTGCGA
CCGGGCGTACCGGTCATCTTCTTGATACCGGCTACCACTTCGTGAAACAATCGGCACC
AGAGATGCGATCGAGTCCGTCTATGACGTCCGGGTGCTCAATGCACTCCGGAGCACACA
GTGGCCGAGCAGGACGAACTGCTGGGCAAGGACTTGTTCGCCCCGAACCCCATGAATGC
TGCCGGTTGCGCAAGGTCGTTCCCTGGGCAAGACGCTGCGTGGCTACTCCGCGTGGGTG
ACCGGGCTACGGCGGGTCGATGCACCGACCGGGCCAATGCCCGCTGGTCAGCTTCGAT
GAGACGTTCAAACCTAGTGAAGGTCAACCCGCTGGCGGCGTGGACCGACCAAGATGTGCAG
GAATACATTGCCGACAACGACGTGCTGTTAATCCGCTTGTGCGGGAAGGCTATCCGTG
ATCGGTTGCGCTCCGTGCACAGCCAAACCCGCCGAAGGCGCGGACCCGCGCAGCGGACGC
TGGCAGGGGCTGGCCAAGACCGAATGCGGGTTGCACGCTTCGTGA
(Identidade da Seqüência No.: 47)

FIG. 9B

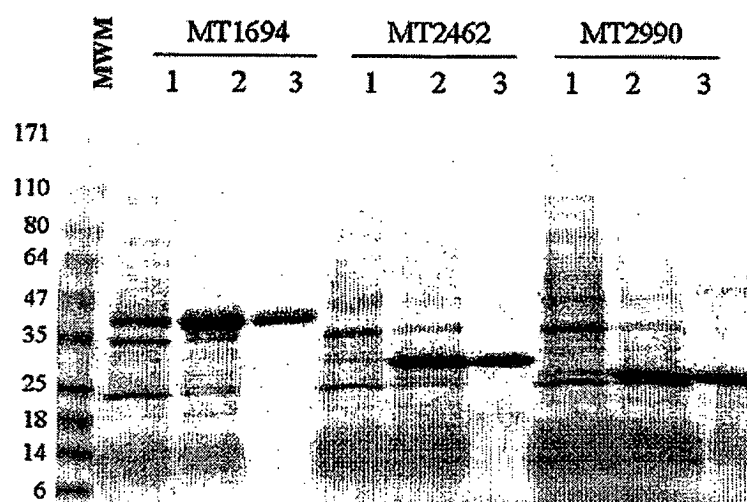


Fig. 10

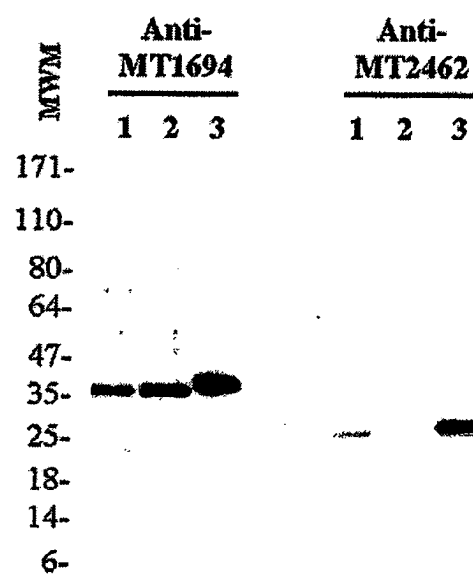


Fig. 11

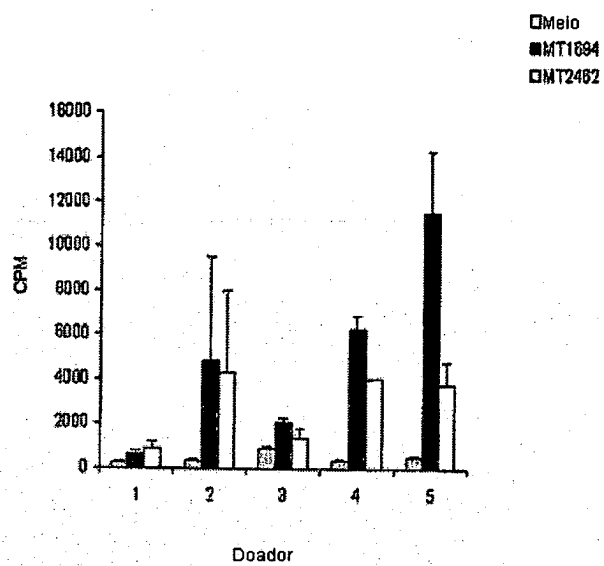


Fig. 12A

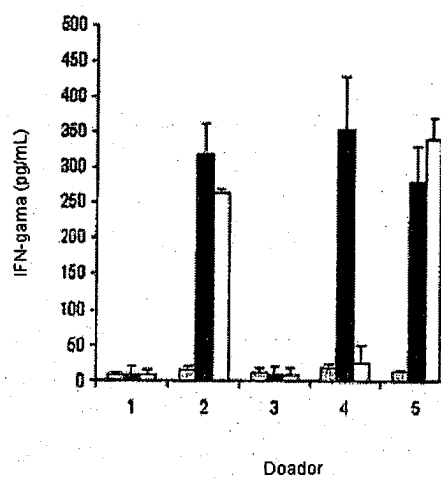


Fig. 12B

RESUMO

5 "MOLECULA DE POLIPEPTÍDEO ISOLADA; MOLECULA DE ÁCIDO
NUCLÉICO ISOLADA; VETOR OU PLASMÍDEO; CÉLULA HOSPEDEIRA;
ANTICORPO; PROTEÍNA DE FUSÃO; MÉTODO PARA ESTIMULAR UMA
10 RESPOSTA IMUNOGÊNICA ESPECÍFICA À TB EM UM INDIVÍDUO OU
PARA PREVENIR OU REDUZIR A GRAVIDADE DE DOENÇA CAUSADA PELA
TB; MÉTODO PARA MONITORAR O TRATAMENTO DA DOENÇA CAUSADA
PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇA
CAUSADA PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO DE DISTINÇÃO ENTRE
15 A DOENÇA CAUSADA PELA TB E A IMUNIDADE À DOENÇA CAUSADA
PELA TB EM UM INDIVÍDUO; MÉTODO PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO
POR M. TUBERCULOSIS EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA; COMPOSIÇÃO;
KIT PARA DIAGNÓSTICO DA PRESENÇA OU DA AUSÊNCIA DE INFECÇÃO
POR M. TUBERCULOSIS EM UMA PESSOA; E COMPOSIÇÃO
20 FARMACÊUTICA"

A presente invenção refere-se a antígenos isolados da Tuberculose (TB), que são úteis em composições terapêuticas e vacinais para estimular uma resposta imunológica específica à TB. Os antígenos também são úteis em ensaios para diagnóstico para determinar a presença da TB ativa em um indivíduo. Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas de polipeptídeos, moléculas de ácidos nucleicos, composições para vacina, ensaios para diagnóstico e métodos de diagnóstico e monitoramento do tratamento relacionado a estes antígenos de TB.