



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 212**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02290458 .5**

86 Fecha de presentación : **25.02.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1338657**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2003**

54 Título: **Secuencias suprimidas específicamente del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, y su uso en el diagnóstico y como vacunas.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**
25/28, rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR

72 Inventor/es: **Cole, Stewart;**
Brosch, Roland;
Gordon, Stephen;
Eiglmeier, Karin y
Garnier, Thierry

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secuencias suprimidas específicamente del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, y su uso en el diagnóstico y como vacunas.

La presente invención se refiere al campo de la biología, más particularmente el objeto de la presente invención es la identificación de una secuencia nucleotídica que hace posible en particular distinguir una infección que resulta de *Mycobacterium tuberculosis* de una infección que resulta de *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*. El objeto de la presente invención es asimismo un método para detectar las secuencias en cuestión mediante los productos de expresión de estas secuencias, y los kits para llevar a cabo estos métodos. Finalmente, el objeto de la presente invención es una nueva vacuna.

A pesar de más de un siglo de investigación desde el descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente etiológico de la tuberculosis, esta enfermedad sigue siendo una de las causas principales de mortalidad de los seres humanos. Se espera que la *M. tuberculosis* mate anualmente a 3 millones de personas (Snider, 1989 Rev. Inf. Disolución. S335), y el número de nuevas personas que se infectan cada año está aumentando y se estima en 8,8 millones. Aunque la mayoría de éstas están en países en desarrollo, la enfermedad está asumiendo una importancia renovada en países occidentales debido al número creciente de personas sin hogar, al impacto del SIDA epidémico, al cambio de la migración global, y a los patrones de los viajes.

La tuberculosis temprana a menudo pasa desapercibida en individuos de otro modo sanos. Los métodos iniciales clásicos de diagnóstico incluyen el examen de un frotis del esputo en un microscopio en busca de la micobacteria acidorresistente, y una placa de rayos X de los pulmones. Sin embargo, en la inmensa mayoría de los casos, el examen del frotis del esputo es negativo para Micobacteria en las etapas tempranas de la enfermedad, y los cambios pulmonares pueden no ser obvios en los rayos X hasta varios meses tras la infección. Otro factor complicante es que la bacteria acidorresistente en un frotis del esputo a menudo puede ser otra especie de micobacteria. Los antibióticos usados para tratar la tuberculosis tienen considerables efectos secundarios, y se deben de tomar como una combinación de tres o más fármacos durante un período de seis a doce meses. Además, la posibilidad de inducir la aparición de tuberculosis resistente a fármacos evita que la terapia se administre sin signos sólidos para apoyar el diagnóstico. Actualmente, el único método absolutamente fiable de diagnóstico se basa en el cultivo de *M. tuberculosis* a partir de la muestra clínica, y en su identificación morfológica y bioquímicamente. Esto habitualmente tiene lugar desde tres a seis semanas, durante cuyo tiempo un paciente puede enfermar gravemente, e infectar a otros individuos. Por lo tanto, un ensayo rápido, capaz de detectar de modo fiable la presencia de *M. tuberculosis*, es vital para la detección prematura y el tratamiento. Se han desarrollado recientemente varios ensayos moleculares para la detección e identificación rápidas de *M. tuberculosis*, tal como el "Ensayo Directo de *Mycobacterium tuberculosis* Amplificado" de Gen-Probe; este ensayo amplifica ARN ribosómico de *M. tuberculosis* 16S a partir de muestras respiratorias, y usa una sonda quimioluminiscente para detectar el producto amplificado, con una sensibilidad dada de alrededor de 91%. El descubrimiento del elemento de inserción IS6110 (Cave *et al.*, Eisenach *et al.*, 1990 J. Infectious Diseases 161:977-981; Thierry *et al.*, 1990 J. Clin. Microbiol. 28:2668-2673), y la creencia de que este elemento sólo puede estar presente en el complejo de *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. africanum* y *M. microti*), engendraron una serie completa de estrategias de diagnóstico rápido (Brisson-Noel *et al.*, 1991 Lancet 338: 364-366; Clarridge *et al.* 1993, J. Clin. Microbiol. 31 :2049-2056; Cormican *et al.* 1992 J. Clin. Pathology 1992, 45: 601-604; Cousins *et al.*, 1992 J. Clin. Microbiol. 30: 255-258; Del Portillo *et al.* 1991 J. Clin. Microbiol. 29: 2163-2168; Folgueira *et al.*, 1994 Neurology 44:1336-1338; Forbes *et al.* 1993, J. Clin. Microbiol. 31: 1688-1694; Hermans *et al.* 1990, J. Clin. Microbiol. 28: 1204-1213; Kaltwasser *et al.* 1993, Mol. Cell. Probes 7: 465-470; Kocagoz *et al.* 1993, J. Clin. Microbiol. 31: 1435-1438; Kolk *et al.* 1992, J. Clin. Microbiol. 30: 2567-2575; Kox *et al.* 1994, J. Clin. Microbiol. 32: 672-678; Liu *et al.* 1994, Neurology 44: 1161-1164; Miller *et al.* 1994, J. Clin. Microbiol. 32: 393-397; Reischl *et al.* 1994, Biotechniques 17: 844-845; Schluger *et al.* 1994, Chest 105: 1116-1121; Shawar *et al.* 1993, J. Clin. Microbiol. 31: 61-65; Wilson *et al.* 1993, J. Clin. Microbiol. 28: 2668-2673). Estos ensayos emplean diversas técnicas para extraer ADN del esputo. Se usa la PCR para amplificar las secuencias de ADN de IS6110 a partir del ADN extraído. La amplificación exitosa de este ADN se considera que es un indicador de la presencia de la infección por *M. tuberculosis*. Las patentes U.S. n^{os} 5.168.039 y 5.370.998 se han expedido a nombre de Crawford *et al.* para la detección de la tuberculosis a base de IS6110. La patente europea EP 0.461.045 se ha expedido a nombre de Guesdon para la detección de la tuberculosis basándose en IS6110.

De este modo, estos ensayos moleculares usados para detectar *M. tuberculosis* dependen de la secuencia de inserción IS6110 (alrededor de 10 copias) o del ARN ribosómico 16S (miles de copias). Sin embargo, estos métodos no proporcionan ninguna información respecto al subtipo de la micobacteria. De hecho, se conocen varias docenas de especies de micobacterias, y la mayoría son no patógenas para seres humanos. La tuberculosis está provocada habitualmente por infección debido a *M. tuberculosis*, siendo unos pocos casos provocados por *M. bovis*, *M. canetti*, y *M. africanum*. A fin de escoger un tratamiento apropiado, y de realizar las investigaciones epidemiológicas, es absolutamente necesario ser capaz de identificar rápida y exactamente los aislados, es decir, distinguir el subtipo de micobacteria del complejo de *Mycobacterium*, que se origina a partir de pacientes tuberculosos potenciales. Ése es el problema que pretende resolver la presente invención.

La presente solicitud describe un ácido nucleico aislado o purificado, en el que dicho ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que consiste en:

a) SEC ID n° 1

- b) un ácido nucleico que tiene una secuencia completamente complementaria a SEC ID nº 1
- c) un fragmento de ácido nucleico que comprende al menos 8, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 de nucleótidos consecutivos de SEC ID nº 1;
- d) un ácido nucleico que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% después del alineamiento óptimo con una secuencia definida en a) o b);
- e) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones restrictivas con el ácido nucleico definido en a) o b).

Sin embargo, el objeto de la invención es el que reivindica en la reivindicación 1. Tal como se usa en la presente memoria, los términos “aislado” y “purificado”, según la invención, se refieren a un nivel de pureza que se puede lograr usando tecnología actual. Las moléculas de la invención no necesitan ser absolutamente puras (es decir, no contienen absolutamente ninguna molécula de otras macromoléculas celulares), pero deben ser suficientemente puras de forma que el experto en la materia reconozca que ya no están presentes en el entorno en el que se encontraban originalmente (es decir, el medio celular). De este modo, una molécula purificada o aislada, según la invención, es la que se ha eliminado de al menos alguna otra molécula presente en el entorno natural en el que se encontró. Más preferentemente, las moléculas de la invención están esencialmente purificadas y/o aisladas, lo que significa que la composición en la que están presentes está casi completamente, o incluso absolutamente, libre de otras macromoléculas encontradas en el entorno en el que las moléculas de la invención se encuentran originalmente. De este modo, el aislamiento y la purificación no se producen mediante adición o eliminación de sales, disolventes o elementos de la tabla periódica, sino deben incluir la eliminación de al menos algunas macromoléculas. Los ácidos nucleicos englobados por la invención están purificados y/o aislados mediante cualquier técnica apropiada conocida por el experto en la materia. Tales técnicas son ampliamente conocidas, habitualmente practicadas, y están dentro de la pericia del experto en la materia. Como se usa en la presente memoria, la expresión “ácido nucleico” se refiere a una secuencia polinucleotídica, tal como una secuencia de ADN mono- o bicatenario, una secuencia de ARN, una secuencia de ADNc; tal secuencia polinucleotídica se ha aislado, purificado o sintetizado, y puede estar constituida por nucleótidos naturales o no naturales. En una realización preferida, la molécula de ADN de la invención es una molécula de ADN bicatenario. Como se usa en la presente memoria, las expresiones “ácido nucleico”, “oligonucleótido”, “polinucleótido”, tienen el mismo significado y se usan indiferentemente.

Mediante la expresión “complejo de *Mycobacterium*”, tal como se usa en la presente memoria, se quiere decir el complejo de micobacterias que provocan la tuberculosis, que son *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti* y la cepa de la vacuna *Mycobacterium bovis* BCG.

La presente solicitud describe no sólo la secuencia completa SEC ID nº 1, su complemento, y su forma bicatenaria, sino cualquier fragmento de esta secuencia, su complemento, y su forma bicatenaria.

Típicamente, el fragmento de SEC ID nº 1 comprende al menos aproximadamente 8 nucleótidos. Por ejemplo, el fragmento puede tener aproximadamente entre 8 y 30 nucleótidos, y se puede diseñar como un cebador para la síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, el fragmento de SEC ID nº 1 comprende entre aproximadamente 1.500 y aproximadamente 2.500 nucleótidos, y más preferentemente 2153 nucleótidos que corresponden a SEC ID nº 4. Como se usa en la presente memoria, “nucleótidos” se usa en referencia al número de nucleótidos en un ácido nucleico monocatenario. Sin embargo, el término engloba asimismo moléculas bicatenarias. De este modo, un fragmento que comprende 2.153 nucleótidos según la invención es una molécula monocatenaria que comprende 2.153 nucleótidos, y también una molécula bicatenaria que comprende 2153 pares de bases (pb).

Típicamente, el fragmento de ácidos nucleicos, tal como se describe en la presente solicitud, se suprime específicamente en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, y está presente en el genoma de *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG.

El fragmento de ácidos nucleicos, tal como se describe en la presente solicitud, se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en:

- a) SEC ID nº 4;
- b) un ácido nucleico que tiene una secuencia completamente complementaria a SEC ID nº 4;
- c) un fragmento de ácido nucleico que comprende al menos 20, 25, 30, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 de nucleótidos consecutivos de SEC ID nº 4;
- d) un ácido nucleico que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia tras el alineamiento óptimo con una secuencia definida en a) o b);
- e) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones restrictivas con el ácido nucleico definido en a) o b);

sin embargo, el objeto de la invención es tal como se reivindica en la reivindicación 2.

Típicamente, las condiciones restrictivas en las que se determina una secuencia según la solicitud son condiciones que no son menos restrictivas que 5 x SSPE, 2 x disolución de Denhardt, y 0,5% (p/v) de dodecilsulfato de sodio a 65°C. Se pueden utilizar condiciones más restrictivas por la persona normal, y las condiciones apropiadas para un ensayo dado se pueden determinar fácil y rápidamente sin experimentación innecesaria o excesiva. Como una realización ilustrativa, las condiciones de hibridación restrictivas usadas a fin de detectar específicamente un polinucleótido según la presente invención son ventajosamente las siguientes: la prehibridación y la hibridación se realizan a 65°C en una mezcla que contiene:

- 5 X SSPE (1 X SSPE es 3 M de NaCl, 30 mM de citrato trisódico)
- 2 X disolución de Denhardt
- 0,5% (p/v) de dodecilsulfato de sodio (SDS)
- 100 µg ml⁻¹ de ADN de esperma de salmón.

Los lavados se realizan según lo siguiente:

- dos lavados a la temperatura del laboratorio (aproximadamente 21-25°C) durante 10 minutos, en presencia de 2 X SSPE y 0,1% de SDS; y
- un lavado a 65°C durante 15 minutos, en presencia de 1 X SSPE y 0,1% de SDS.

La invención se refiere asimismo al ácido nucleico aislado y purificado de la invención, en el que dicho ácido nucleico comprende al menos una supresión de un fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 2.

Los polinucleótidos según se describen en la presente solicitud se pueden caracterizar por el porcentaje de identidad que muestran con las secuencias descritas en la presente memoria. Por ejemplo, en la presente solicitud se describen polinucleótidos que tienen al menos una identidad de 90% con los polinucleótidos según se describen en la presente solicitud, particularmente las secuencias del listado de secuencias. Preferentemente, las secuencias muestran al menos una identidad de 90% con las del listado de secuencias. Más preferentemente, muestran una identidad de al menos 92%, por ejemplo 95% o 99% de identidad. El experto en la materia puede identificar secuencias según la invención, o como se describen en la presente solicitud, mediante el uso del programa de análisis de secuencias BLAST (véase, por ejemplo, Coffin *et al.*, eds., "*Retroviruses*", Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 723-755). El porcentaje de identidad se calcula usando el programa de análisis de secuencias BLAST, Versión 2, disponible de NCBI (NIH). Se usan todos los parámetros por defecto. BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básica) es el algoritmo de búsqueda heurística empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx, todos los cuales están disponibles del paquete de programas de ordenador de análisis BLAST en el NCBI. Estos programas adscriben una significancia a sus hallazgos, usando los métodos estadísticos de Karlin y Altschul (1990, 1993), con unas pocas mejoras. Usando este paquete de programas de análisis de secuencias públicamente disponible, el experto en la materia puede identificar fácilmente polinucleótidos según se describen en la presente solicitud.

Está dentro de la pericia de la persona normal identificar regiones de la secuencia de ácidos nucleicos de la invención, o como se han descrito anteriormente, que serían útiles como una sonda, un cebador, u otra ayuda experimental, de diagnóstico o terapéutica. Por ejemplo, el experto en la materia podría utilizar cualquiera de los programas de análisis de secuencias ampliamente disponibles para seleccionar regiones (fragmentos) de estas secuencias que son útiles para ensayos de hibridación, tales como transferencia Southern, transferencias Northern, ensayos de unión a ADN, y/o hibridaciones *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Adicionalmente, el experto en la materia, con las secuencias de la presente invención, o como se han descrito anteriormente, puede utilizar programas de análisis de secuencias ampliamente disponibles para identificar regiones que se pueden usar como sondas y cebadores, así como para el diseño de moléculas antisentido. La única limitación práctica en el fragmento elegido por el experto en la materia es la capacidad del fragmento para que sea útil para los fines para los cuales se elige. Por ejemplo, si el experto en la materia desea elegir una sonda de hibridación, esta persona sabría cómo escoger una de longitud suficiente, y de estabilidad suficiente, para dar resultados significativos. Las condiciones elegidas serían las usadas típicamente en ensayos de hibridación desarrollados para fragmentos de ácidos nucleicos de la longitud escogida aproximada.

De este modo, la presente invención proporciona oligonucleótidos cortos, útiles como sondas y cebadores. En realizaciones, la sonda y/o el cebador comprenden 8 a 30 nucleótidos consecutivos del polinucleótido según la invención o del polinucleótido complementario al mismo. Típicamente, un fragmento tal como se define en la presente memoria tiene una longitud de al menos 8 nucleótidos, que es aproximadamente la longitud mínima que se ha determinado que permite la hibridación específica. Por ejemplo, el fragmento nucleico tiene una longitud de al menos 12 nucleótidos, y más preferentemente 20 nucleótidos consecutivos de cualquiera de SEC ID NO:1 o SEC ID NO:4. La secuencia según la presente invención se selecciona de entre el grupo siguiente: SEC ID n°13, SEC ID n°14, SEC ID n°15, SEC ID n°16, SEC ID n°17, SEC ID n°18. Más precisamente, los pares de cebadores SEC ID n°13/SEC ID n°14 y SEC ID n°15/SEC ID n°16 son específicos para el fragmento de ácidos nucleicos SEC ID n°4. El par de cebadores SEC ID n°17/SEC ID n°18 es específico para la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n°1, y están flanqueando el fragmento de ácido nucleico de SEC ID n°4.

De este modo, los polinucleótidos de SEC ID nº 1 y SEC ID nº 4 se pueden usar para seleccionar cebadores nucleotídicos, principalmente para una reacción de amplificación, tales como las reacciones de amplificación descritas posteriormente.

5 La PCR se describe en la patente US nº 4.683.202.

Los fragmentos amplificados se pueden identificar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o en agarosa, mediante una electroforesis capilar, o, como alternativa, mediante una técnica de cromatografía (filtración en gel, cromatografía hidrófoba, o cromatografía de intercambio iónico). La especificidad de la amplificación se puede asegurar
10 mediante una hibridación molecular usando, como sondas nucleicas, los polinucleótidos SEC ID nº 1 o SEC ID nº 4, y sus fragmentos, oligonucleótidos que son complementarios a estos polinucleótidos o sus fragmentos, o sus propios productos de amplificación, o incluso mediante secuenciación de ADN.

También se pueden usar las siguientes técnicas relacionadas con la amplificación de ácidos nucleicos, y generalmente se prefieren a la técnica mediante PCR. La técnica de amplificación de desplazamiento de hebra (SDA) es una
15 técnica de amplificación isotérmica basada en la capacidad de una enzima de restricción para escindir una de las hebras en un sitio de reconocimiento (que está en una forma de hemifosforotioato), y en la propiedad de una ADN polimerasa para iniciar la síntesis de una nueva hebra a partir del extremo 3'OH generado por la enzima de restricción, y en la propiedad de esta ADN polimerasa para desplazar la hebra previamente sintetizada que se localiza en dirección 3'.
20 La técnica de amplificación de SDA se realiza más fácilmente que la PCR (es necesario un único dispositivo de baño de agua termostático), y es más rápida que los otros métodos de amplificación. De este modo, la presente invención comprende asimismo el uso de fragmentos de ácidos nucleicos según la invención (cebadores) en un método de amplificación de ADN o de ARN según la técnica de SDA.

25 Cuando el polinucleótido diana a detectar es un ARN, por ejemplo un ARNm, se usará una enzima de transcriptasa inversa antes de la reacción de amplificación, a fin de obtener un ADNc a partir del ARN contenido en la muestra biológica. El ADNc generado se usa subsiguientemente como la diana de ácido nucleico para los cebadores o las sondas usados en el proceso de amplificación o en un proceso de detección según la presente invención.

30 Los polinucleótidos u oligonucleótidos no marcados de la invención se pueden usar directamente como sondas. No obstante, los polinucleótidos u oligonucleótidos se marcan generalmente con un elemento radioactivo (³²P, ³⁵S, ³K, ¹²⁵I) o mediante una molécula no isotópica (por ejemplo, biotina, acetilaminofluoreno, digoxigenina, 5-bromodesoxiuridina, fluoresceína), a fin de generar sondas que son útiles para numerosas aplicaciones. Los ejemplos de marcaje no radioactivo de fragmentos de ácidos nucleicos se describen en la patente francesa nº FRECUENCIA 7810975 y
35 por Urdea *et al.* (1988, *Nucleic Acids Research* 11:4937-4957) o Sanchez-Pescador *et al.* (1988, *J. Clin. Microbiol.* 26 (10):1934-1938). También se pueden usar otras técnicas de marcaje, tales como las descritas en las patentes francesas FR 2422956 y FR 2518755. La etapa de hibridación se puede realizar de diferentes maneras. Véase, por ejemplo, Matthews *et al.*, 1988, *Anal. Biochem.* 169:1-25. Un método general comprende inmovilizar el ácido nucleico, que se ha extraído de la muestra biológica, sobre un sustrato (por ejemplo, nitrocelulosa, nailon, poliestireno), e incubar
40 después, en condiciones definidas, el ácido nucleico diana con la sonda. Tras la etapa de hibridación, se desecha la cantidad en exceso de la sonda específica, y las moléculas híbridas formadas se detectan mediante un método apropiado (radioactividad, medida de la fluorescencia o de la actividad enzimática, etc.).

45 Los fragmentos nucleotídicos amplificados son útiles, entre otras cosas, como sondas usadas en reacciones de hibridación a fin de detectar la presencia de un polinucleótido según la presente invención, o a fin de detectar mutaciones. Los cebadores se pueden usar asimismo como sondas oligonucleotídicas para detectar específicamente un polinucleótido según la invención.

Las sondas oligonucleotídicas según la presente invención se pueden usar asimismo en un dispositivo de detección
50 que comprende una librería matriz de sondas inmovilizadas sobre un sustrato, localizándose la secuencia de cada sonda de una longitud dada en un desplazamiento de una o varias bases, unas de las otras, siendo de este modo cada sonda de la librería matriz complementaria a una secuencia distinta del ácido nucleico diana. Opcionalmente, el sustrato de la matriz puede ser un material capaz de actuar como un dador de electrones, determinándose subsiguientemente, mediante un dispositivo electrónico, la detección de las posiciones de la matriz en las que se ha producido una hibridación.
55 Tales librerías matrices de sondas, y los métodos de detección específica de un ácido nucleico diana, se describen en la solicitud de patente europea nº EP-0713016 (Affymax technologies) y también en la patente US nº 5.202.231 (Drmanac). Puesto que casi toda la longitud completa de un cromosoma micobacteriano está cubierta por una librería de ADN genómico a base de BAC (es decir, el 97% del cromosoma de *M. tuberculosis* está cubierto por la librería I-1945 de BAC), estas librerías de ADN desempeñarán un papel importante en una pluralidad de aplicaciones post-genómicas, tales como en estudios de expresión génica micobacteriana en los que se podría usar el conjunto canónico de BAC como una matriz para estudios de hibridación. De este modo, se describe asimismo en la presente solicitud cómo proporcionar chips de ácidos nucleicos, más precisamente chips de ADN o chips proteínicos que comprenden,
60 respectivamente, un ácido nucleico o un polipéptido según se ha descrito anteriormente.

65 La presente invención proporciona asimismo un vector que comprende la molécula de ADN aislada de la invención. Un "vector" es un replicón en el que se une otro segmento polinucleotídico, para provocar la replicación y/o expresión al segmento unido. Un vector puede tener uno o más sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los que las secuencias de ADN se pueden cortar de una manera determinable sin pérdida de la función biológica esencial

del vector, y en los que se puede cortar y empalmar un fragmento de ADN a fin de provocar su replicación y clonación. Los vectores pueden proporcionar además sitios de cebadores (por ejemplo, para PCR), sitios de iniciación y/o de regulación transcripcionales y/o traduccionales, señales recombinatorias, replicones, marcadores seleccionables, etc. Además del uso de las enzimas de recombinación o de restricción homólogas para insertar un fragmento de ADN deseado en el vector, también se pueden aplicar la clonación UDG de fragmentos de PCR (patente US nº 5.334.575), la clonación T:A, y similares. El vector de clonación puede contener además un marcador seleccionable adecuado para uso en la identificación de células transformadas con el vector de clonación.

El vector puede ser cualquier vector útil conocido por el experto en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a, un vector de clonación, un vector de inserción, o un vector de expresión. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosoma artificial de levadura (YAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial humano (HAC), un vector vírico, tal como un vector adenovírico, un vector retrovírico, y otras secuencias de ADN que son capaces de replicarse o de ser replicadas *in vitro* o en una célula hospedante, o para transportar un segmento de ADN deseado hasta una localización deseada dentro de una célula hospedante. Según una realización preferida de la invención, el vector recombinante es un BAC pBeloBAC11, en el que la región genómica de *Mycobacterium bovis*-BCG 1173P3, que se extiende sobre la región correspondiente al locus 1.760.753 pb a 1.830.364 pb en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, se ha insertado en el sitio de restricción HindIII; este vector recombinante se denomina X229. En esta región, se ha demostrado la eliminación de un fragmento de 2153 pb en la inmensa mayoría de la cepa de *M. tuberculosis*. Ésta es la razón por la que se ha denominado a esta supresión TbD1 ("supresión 1 específica de *M. tuberculosis*"). La TbD1 está flanqueada por la secuencia GGC CTG GTC AAA CGC GGC TGG ATG CTG y AGA TCC GTC TTT GAC ACG ATC GAC G. Se pueden usar, para la amplificación de TbD1, cebadores externos que se hibridan con tales secuencias o con sus secuencias complementarias, para comprobar la presencia o ausencia de la supresión de la TbD1. Se han diseñado, por ejemplo, los siguientes cebadores:

5'-CTA CCT CAT CTT CCG GTC CA-3' (SEC ID Nº 17)

5'-CAT AGA TCC CGG ACA TGG TG-3' (SEC ID Nº 18)

A fin de obtener una sonda de 500 pb específica para experimentos de hibridación, se puede obtener una amplificación mediante PCR de un fragmento interno usando el plásmido X229 como matriz. La amplificación de un fragmento de aproximadamente 500 pb contenido en TbD1 se puede realizar usando los siguientes cebadores:

5'-CGT TCA ACC CCA AAC AGG TA-3' (SEC ID Nº 13)

5'-AAT CGA ACT CGT GGA ACA CC-3' (SEC ID Nº 14)

La amplificación de un fragmento de aproximadamente 2.000 pb contenido en TbD1 se puede realizar usando los siguientes cebadores:

5'-ATT CAG CGT CTA TCG GTT GC-3' (SEC ID Nº 15)

5'-AGC AGC TCG GGA TAT CGT AG-3' (SEC ID Nº 16)

Las condiciones de PCR son las siguientes: desnaturalización a 95°C 1 min., después 35 ciclos de amplificación [95°C durante 30 segundos, 58°C durante 1 min.], después alargamiento a 72°C durante 4 min.

De este modo, la invención se refiere asimismo a un hospedante celular recombinante que contiene un polinucleótido o un vector recombinante según la invención. El hospedante celular se puede transformar o transfectar con un polinucleótido o con un vector recombinante para proporcionar una expresión transitoria, estable, o controlada del polinucleótido deseado. Por ejemplo, el polinucleótido de interés se puede subclonar en un plásmido de expresión en el sitio de clonación en dirección 3' desde un promotor en el plásmido, y el plásmido se puede introducir en una célula hospedante en la que se puede producir la expresión. La célula hospedante recombinante puede ser cualquier hospedante adecuado conocido por el experto en la materia, tal como una célula eucariota o un microorganismo. Por ejemplo, el hospedante puede ser una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, células de insecto, y levaduras. Preferentemente, el hospedante celular recombinante es una DH10B de *Escherichia coli* comercialmente disponible (Gibco) que contiene el BAC denominado X229 descrito anteriormente. Esta DH10B de *Escherichia coli* (Gibco), que contiene el BAC denominado 229, se ha depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), Institut Pasteur, París, Francia, el 18 de febrero de 2002, con el número de CNCM 1-2799.

Otro aspecto de la invención es el polipéptido aislado o purificado codificado por un polinucleótido de la invención, en particular el ácido nucleico de las reivindicaciones 1 ó 2. El polipéptido purificado comprende una secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2, Nº 8, Nº 10, Nº 12, y fragmentos de las mismas. Por ejemplo, el polipéptido purificado de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8, una forma truncada de mmpL6. El polipéptido purificado de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:10, que es la

secuencia de aminoácidos de la proteína mmpS6, o la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 12, una forma truncada de mmpS6.

Ahora es fácil producir proteínas en grandes cantidades mediante técnicas de ingeniería genética, a través del uso de vectores de expresión, tales como plásmidos, fagos, y fagémidos. El polipéptido de la presente invención se puede producir mediante inserción del polinucleótido apropiado en un vector de expresión apropiado en la posición apropiada dentro del vector. Tal manipulación de polinucleótidos es bien conocida y ampliamente practicada por el experto en la materia. El polipéptido se puede producir a partir de estos vectores recombinantes ya sea *in vitro* o *in vivo*. Todos los ácidos nucleicos aislados o purificados, que codifican el polipéptido de la invención, están dentro del alcance de la invención. Un polipéptido descrito en la presente solicitud es un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida a cualquiera de SEC ID nº 1 o SEC ID nº 4 en condiciones restrictivas, tal como se define en la presente memoria.

Más preferentemente, dicho ácido nucleico aislado o purificado según la invención se selecciona de entre:

- SEC ID Nº 7 que codifica el polipéptido de SEC ID Nº8;
- SEC ID Nº 9 que codifica el polipéptido de SEC ID Nº10;
- SEC ID Nº 11 que codifica el polipéptido de SEC ID Nº12.

La presente solicitud describe asimismo un método para la detección discriminatoria e identificación de:

- *Mycobacterium tuberculosis* frente a
- *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG* en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:
 - a) aislar el ADN de la muestra biológica a analizar, o producir un ADNc a partir del ARN de la muestra biológica,
 - b) detectar las secuencias de ácidos nucleicos de la micobacteria presente en dicha muestra biológica,
 - c) analizar la presencia o ausencia de un fragmento de ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente.

Mediante una muestra biológica según la presente invención, se pretende decir principalmente un fluido biológico, tal como esputo, saliva, plasma, sangre, orina o esperma, o un tejido, tal como una biopsia.

El análisis de las secuencias deseadas se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa. Si se observa la presencia de un fragmento de ADN que migra al sitio esperado, se puede concluir que la muestra analizada contenía ADN micobacteriano. Este análisis se puede llevar a cabo asimismo mediante técnica de hibridación molecular, usando una sonda nucleica. Esta sonda se marcará ventajosamente con un elemento no radioactivo (sonda fría) o radioactivo. Ventajosamente, la detección de las secuencias de ADN micobacteriano se llevará a cabo usando secuencias nucleotídicas complementarias a dichas secuencias de ADN. A título de ejemplo, pueden incluir sondas nucleotídicas marcadas o no marcadas; también pueden incluir cebadores para amplificación. La técnica de amplificación usada puede ser PCR, pero también otras técnicas alternativas tales como la técnica de SDA (Amplificación por Desplazamiento de Hebra), la técnica de TAS (Sistema de Amplificación Basado en la Transcripción), la técnica de NASBA (Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos), o la técnica de TMA (Amplificación Mediada por Transcripción).

Los cebadores según la invención tienen una secuencia nucleotídica escogida del grupo que comprende SEC ID nº13, SEC ID nº14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18. Los pares SEC ID nº 13/SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15/SEC ID nº 16 son específicos para el fragmento de ácidos nucleicos SEC ID nº 4, y el par de cebadores SEC ID nº 17/SEC ID nº 18 es específico para el ácido nucleico de la invención.

En una variante, la presente solicitud describe asimismo un método para la detección discriminatoria e identificación de:

- *Mycobacterium tuberculosis* frente a
- *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG* en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:
 - a) poner en contacto la muestra biológica a analizar con al menos un par de cebadores según se define anteriormente, habiéndose hecho accesible de antemano a la hibridación el ADN contenido en la muestra, cuando sea apropiado,

- b) amplificar el ADN de la micobacteria,
- c) visualizar la amplificación de los fragmentos de ADN.

5 Los fragmentos amplificados se pueden identificar mediante electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, mediante electroforesis capilar, o mediante una técnica cromatográfica (filtración en gel, cromatografía hidrófoba, o cromatografía de intercambio iónico). La especificación de la amplificación se puede controlar mediante hibridación molecular usando sondas, plásmidos que contienen estas secuencias o su producto de amplificación. Los fragmentos nucleotídicos amplificados se pueden usar como un reactivo en reacciones de hibridación, a fin de detectar la presencia, 10 en una muestra biológica, de un ácido nucleico diana que tiene secuencias complementarias a las de dichos fragmentos nucleotídicos amplificados. Estas sondas y amplicones se pueden marcar o de cualquier otro modo con elementos radioactivos o con moléculas no radioactivas, tales como enzimas o elementos fluorescentes.

La presente solicitud describe asimismo un kit para la detección discriminativa e identificación de:

- *Mycobacterium tuberculosis* frente a
- *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, en una muestra biológica, que comprende los siguientes elementos:

- a) al menos un par de cebadores seleccionados de entre fragmentos de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 1 a 3, 6 y 7;
- b) los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN.

La presente solicitud describe un kit que comprende opcionalmente el elemento c):

- c) cuyos componentes necesarios hacen posible verificar o comparar la secuencia y/o el tamaño del fragmento amplificado.

30 De hecho, dependiendo del par de cebadores usados, es posible obtener resultados muy diferentes. De este modo, el uso de cebadores que son internos a la supresión, tales como, por ejemplo, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, es tal que no se detecta ningún producto de amplificación en *M. tuberculosis*, y que el producto de amplificación es detectable en *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*. Sin embargo, el uso de cebadores externos a la región de supresión no da necesariamente el mismo resultado, en cuanto, por ejemplo, al tamaño del fragmento amplificado, dependiendo del tamaño de la región suprimida en *M. tuberculosis*. De este modo, el uso del par de cebadores externos a la supresión, tales como SEC ID nº 17 y SEC ID nº 18, es probable que dé lugar a un amplicón en *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG* de alrededor de 2100 pb, mientras que el uso del par de cebadores externos a la supresión dará lugar, en *M. tuberculosis*, a un amplicón de alrededor de unas pocas pb.

De forma más general, la invención se refiere al uso de al menos un par de cebadores según la reivindicación 16 para la amplificación de una secuencia de ADN procedente de *Mycobacterium tuberculosis* o de *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*.

El objeto de la invención es asimismo una proteína, polipéptido o fragmento polipeptídico que resulta de la expresión de todo o de parte del fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 2. La expresión "producto de expresión" se entiende que significa cualquier proteína, polipéptido o fragmento polipeptídico que resulta de la expresión de toda o de parte de las secuencias nucleotídicas mencionadas anteriormente. Entre esos productos de expresión, uno puede citar las proteínas de membrana mmpL6, mmpS6, y su forma truncada o reordenada, debido a la supresión del fragmento de la invención.

De hecho, la presente solicitud describe asimismo un método para la detección discriminativa *in vitro* de anticuerpos dirigidos contra *Mycobacterium tuberculosis* o contra *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la muestra biológica con al menos un producto tal como se ha definido anteriormente,
- b) detectar el complejo de antígeno-anticuerpo formado.

La presente solicitud describe asimismo un método para la detección discriminativa de una vacuna con *Mycobacterium bovis BCG*, o una infección mediante *Mycobacterium tuberculosis*, en un mamífero, que comprende las siguientes etapas:

- a) preparar una muestra biológica que contiene células, más particularmente células del sistema inmunitario de dicho mamífero, y más particularmente células T,

- b) incubar la muestra biológica de la etapa a) con al menos un producto tal como se ha definido anteriormente,
- c) detectar una reacción celular que indica la sensibilización previa del mamífero a dicho producto, en particular la proliferación celular y/o síntesis de proteínas tales como gamma-interferón. La proliferación celular se puede medir, por ejemplo, incorporando ³H-timidina.

La solicitud se refiere asimismo a un kit para el diagnóstico *in vitro* de una infección por *Mycobacterium tuberculosis*, en un mamífero vacunado opcionalmente de antemano con *M. bovis* BCG, que comprende:

- a) un producto tal como se ha definido anteriormente,
- b) cuando sea apropiado, los reactivos para la constitución del medio adecuado para la reacción inmunológica,
- c) los reactivos que permiten la detección de los complejos antígeno-anticuerpo producidos por la reacción inmunológica,
- d) cuando sea apropiado, una muestra biológica de referencia (control negativo) libre de anticuerpos reconocidos por dicho producto,
- e) cuando sea apropiado, una muestra biológica de referencia (control positivo) que contiene una cantidad predeterminada de anticuerpos reconocidos por dicho producto.

Los reactivos que permiten la detección de los complejos antígeno-anticuerpo pueden llevar un marcador, o pueden ser capaces de ser reconocidos a su vez mediante un reactivo marcado, más particularmente en el caso en el que el anticuerpo usado no esté marcado.

El objeto de la invención es asimismo los anticuerpos mono- o policlonales, sus fragmentos o anticuerpos quiméricos, capaces de reconocer específicamente un producto según la reivindicación 13.

Por lo tanto, la presente solicitud se refiere asimismo a un método para la detección discriminativa de la presencia de un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* o de *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis*-BCG, en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de la invención,
- b) detectar el complejo de antígeno-anticuerpo formado.

La invención se refiere asimismo al kit para la detección discriminativa de la presencia de un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* con supresión de TbD₁ según SEC ID nº 4, o de *Mycobacterium tuberculosis* sin supresión de TbD₁, o de *Mycobacterium africanum*, o de *Mycobacterium canetti*, o de *Mycobacterium microti*, o de *Mycobacterium bovis*, o de *Mycobacterium bovis* BCG, en una muestra biológica, que comprende los siguientes elementos:

- a) un anticuerpo tal como se ha reivindicado anteriormente en la reivindicación 19,
- b) los reactivos para constituir el medio adecuado para la reacción inmunológica,
- c) los reactivos que permitan la detección del complejo de antígeno-anticuerpo producido por la reacción inmunológica.

Los reactivos mencionados anteriormente son bien conocidos por un experto en la materia, el cual no tendrá dificultad para adaptarlos al contexto de la presente invención.

La presente solicitud describe asimismo una composición inmunológica, caracterizada porque comprende al menos un producto de expresión tal como se ha descrito anteriormente.

Ventajosamente, la composición inmunológica según la presente solicitud entra en la composición de una vacuna cuando se proporciona en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente con uno o más adyuvantes de inmunidad, tales como alumbre, o un representante de la familia de péptidos muramílicos, o el adyuvante incompleto de Freund.

La presente solicitud se refiere asimismo a una vacuna que comprende al menos un producto de expresión tal como se ha descrito anteriormente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente compatible y, cuando sea apropiado, con uno o más adyuvantes de inmunidad apropiados.

La invención proporciona asimismo un método *in vitro* para la detección e identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- a) aislar el ADN de la muestra biológica a analizar, o producir un ADNc a partir del ARN de la muestra biológica,
- b) detectar las secuencias de ácidos nucleicos de la micobacteria presente en dicha muestra biológica,
- c) analizar la presencia o ausencia de un fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 2.

Además, el objeto de la invención es tal como se reivindica en las reivindicaciones 13, 14 y 15.

En otra realización, la presente solicitud describe un método *in vitro* para la detección e identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto a la muestra biológica a analizar con al menos un par de cebadores seleccionados de entre fragmentos de ácidos nucleicos tal como se ha descrito anteriormente, y más preferentemente seleccionados de entre los cebadores escogidos del grupo que comprende SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, habiéndose hecho accesible, cuando sea apropiado, el ADN contenido en la muestra a la hibridación de antemano,
- b) amplificar el ADN de la micobacteria,
- c) visualizar la amplificación de los fragmentos de ADN.

La invención proporciona asimismo un kit para la detección de la supresión de TbD1 según SEC ID nº 4 en *Mycobacterium tuberculosis* CTG en una muestra biológica, que comprende los siguientes elementos:

- a) al menos un par de cebadores que comprende 8 a 30 nucleotídicos consecutivos de los polinucleótidos según las reivindicaciones 2, 3 y 6, seleccionados de entre fragmentos de ácidos nucleicos, más preferentemente seleccionados de entre los cebadores escogidos del grupo que comprende SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18,
- b) los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN.

La presente solicitud describe asimismo un kit que comprende opcionalmente el elemento C):

- c) los componentes necesarios que hacen posible verificar o comparar la secuencia y/o el tamaño del fragmento amplificado.

La presente solicitud se refiere asimismo a un método para la detección *in vitro* de anticuerpos dirigidos contra *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la muestra biológica con al menos un producto tal como se ha definido anteriormente,
- b) detectar el complejo de antígeno-anticuerpo formado.

Un objetivo de la invención es asimismo usar la supresión de TbD1 según SEC ID nº 4 como un marcador genético para la diferenciación de la cepa de *Mycobacterium* del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Un objetivo de la presente solicitud es asimismo usar el polimorfismo mmpL6⁵⁵¹ como un marcador genético (véase SEC ID nº 20) para la diferenciación de la cepa de *Mycobacterium* del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

El uso de tal o tales marcadores genéticos, en asociación con al menos un marcador genético seleccionado de entre RD1, RD2, RD3, RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, Rd11, RD13, RD14, RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5, katG⁴⁶³, gyrA⁹⁵, oxyR²⁸⁵, pncA⁵⁷, permite la diferenciación de la cepa de *Mycobacterium* de complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (véase el ejemplo 4).

La presente solicitud describe un método *in vitro* para la detección e identificación de *Mycobacteria* a partir de complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- a) analizar la presencia o ausencia de un fragmento de ácido nucleico de la secuencia TbD1, y
- b) analizar al menos un marcador genético adicional seleccionado de entre RD1, RD2, RD3, RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, Rd11, RD13, RD14, RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5, katG⁴⁶³, gyrA⁹⁵, oxyR²⁸⁵, pncA⁵⁷.

Se usan típicamente dos marcadores adicionales, preferentemente RD4 y RD9. El análisis se realiza mediante una técnica seleccionada de entre hibridación de secuencias, amplificación de ácidos nucleicos, complejo de antígeno-anticuerpo.

5 También es una meta de la presente invención proporcionar un kit para la detección e identificación de *Mycobacteria* a partir del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra biológica, que comprende los siguientes elementos:

10 a) al menos un par de cebadores que comprenden 8 a 30 nucleótidos consecutivos del polinucleótido según las reivindicaciones 2, 3 y 6, más preferentemente seleccionados de entre los cebadores escogidos del grupo que comprende SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18,

15 b) los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN,

c) al menos un par de cebadores específicos de los marcadores genéticos seleccionados de entre RD1, RD2, RD3, RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, Rd11, RD13, RD14, RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5, katG⁴⁶³, gyrA⁹⁵, oxyR²⁸⁵, pncA⁵⁷.

20 La presente solicitud describe asimismo un kit que comprende opcionalmente el elemento d):

d) los componentes necesarios que hacen posible verificar o comparar la secuencia y/o el tamaño del fragmento amplificado.

25 En una realización preferida, el kit según la presente invención se caracteriza porque dichos pares de cebadores específicos de marcadores genéticos según c) son

b) un par de cebadores específicos de los marcadores genéticos RD4, y

30 c) un par de cebadores específicos de los marcadores genéticos RD9.

Las figuras y ejemplos presentados a continuación se proporcionan como una guía adicional para la persona con pericia normal en la técnica, y no se deben interpretar como limitativos de la invención de ninguna manera.

35 Figuras

Figura 1: amplicones obtenidos a partir de cepas que tienen presente o tienen suprimida la región genómica indicada. Los tamaños de los amplicones en cada grupo son uniformes. Los números corresponden a la denominación de la cepa usada en Kremer *et al.* (1999, J. Clin. Microbiol. 37:2607-2618 (Ref. 8) y Supply *et al.* (2001, J. Clin. Microbiol. 39:3563-3571) (ref. 9).

Figura 2: secuencias en la región de TbD1 obtenidas a partir de cepas de diversas regiones geográficas.

45 * se refiere a grupos basados en el polimorfismo de secuencia katG^{c463}/gyrA^{c95} definido por Sreevatsan y colegas (Ref. 2). Los números corresponden a la denominación de la cepa usada en Kremer *et al.* (1999, J. Clin. Microbiol. 37:2607-2618 (Ref. 8) y Supply *et al.* (2001, J. Clin. Microbiol. 39:3563-3571) (ref. 9).

Figura 3: espoligotipos de las cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* seleccionadas. Los números corresponden a la denominación de la cepa usada en Kremer *et al.* (1999, J. Clin. Microbiol. 37:2607-2618 (Ref. 8) y Supply *et al.* (2001, J. Clin. Microbiol. 39:3563-3571) (ref. 9).

Figura 4: esquema de la ruta evolutiva propuesta del bacilo de la tuberculosis, que ilustra la pérdida sucesiva de ADN en ciertas estirpes (cajas grises). El esquema se basa en la presencia o en la ausencia de regiones suprimidas conservadas y en polimorfismos de secuencia en cinco genes seleccionados. Obsérvese que las distancias entre ciertas ramificaciones pueden no corresponder a diferencias filogenéticas reales calculadas por otros métodos.

Las flechas azules indican que las cepas están caracterizadas por katG^{c463} CTG (Leu), gyrA^{c95} ACC (Thr), típica para organismos del grupo 1. Las flechas en verde indican que las cepas pertenecen al grupo 2 caracterizado por katG^{c463} CGG (Arg), gyrA^{c95} ACC (Thr). La flecha en rojo indica que las cepas pertenecen al grupo 3, caracterizado por katG^{c463} CGG (Arg), gyrA^{c95} AGC (Ser), según se define por Sreevatsan y colegas (Sreevatsan *et al.*, 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 151:9869-9874) (Ref. 2).

65

Ejemplos

1. Material y métodos

1.1. *Cepas bacterianas*: las 100 cepas del complejo de *M. tuberculosis* comprendieron 46 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en 30 países, 14 cepas de *M. africanum*, 28 cepas de *M. bovis* procedentes de 5 países, 2 cepas de la vacuna de *M. bovis* BCG (Pasteur y Japón), 5 cepas de *M. microti*, y 5 cepas de *M. canetti*. Las cepas se aislaron de fuentes humanas y de animales, y se seleccionaron para representar una amplia diversidad, incluyendo 60 cepas que se habían usado en un estudio con múltiples centros (8). Las cepas de *M. africanum* se consiguieron de la colección del Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, Nueva York, mientras que la mayoría de los aislados de *M. bovis* procedieron de la colección de la Universidad de Zaragoza, España. Cuatro cepas de *M. canetti* procedieron de la colección de cultivos del Institut Pasteur, París, Francia. Las cepas se habían caracterizado ampliamente mediante métodos de tipaje de referencia, es decir, tipaje y espoligotipaje de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) IS6110. Como cepas de referencia, se incluyeron H37Rv de *M. tuberculosis*, H37Ra de *M. tuberculosis*, CDC1551 de *M. tuberculosis*, AF2122/97 de *M. bovis*, OV254 de *M. microti*, y CIPT 140010059 de *M. canetti*. El ADN se preparó como se ha descrito anteriormente.

1.2. Comparaciones del genoma y diseño de cebadores

Con fines comparativos preliminares del genoma entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se usaron los sitios web <http://genolist.pasteur.frecuencia/TubercuList/> y [http://www.sanger.ac.uk/Projects/M bovis/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/), así como bases de datos de la casa. Para el diseño de cebadores, se obtuvieron, a partir de los mismos sitios web, secuencias en el interior o que flanquean las regiones de RD y RvD. Los cebadores se diseñaron usando el sitio web del cebador 3, [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3 www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi), que amplificaría fragmentos de aprox. 500 pares de bases en las cepas de referencia (Tabla 1).

1.3. Análisis de RD-PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, y contenían por reacción 1,25 μ l de 10 x tampón de PCR (600 mM de Tris HCl pH 8,8, 20 mM de $MgCl_2$, 170 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 100 mM de β -mercaptoetanol), 1,25 μ l de mezcla nucleotídica de 20 mM, 50 nM de cada cebador, 1-10 ng de ADN molde, DMSO al 10%, 0,2 unidades de *Taq* polimerasa (Gibco-BRL) y agua destilada estéril hasta 12,5 μ l. El ciclo térmico se realizó en un amplificador PCT-100 (MJ Inc.), con una etapa inicial de desnaturalización de 90 segundos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 58°C, y 4 minutos a 72°C.

1.4. Secuenciación de las regiones de unión (*Rds*, *TbD1*), genes *kalG*, *gyrA*, *oxyR* y *pncA*

Los productos de la PCR se obtuvieron como se ha descrito anteriormente, usando los cebadores enumerados en la Tabla 1.

Para la eliminación del cebador, se incubaron 6 μ l del producto de PCR con 1 unidad de fosfatasa alcalina de gamba (USB), 10 unidades de exonucleasa I (USB), y 2 μ l de 5 x tampón (200 mM de Tris HCl pH 8,8, 5 mM de $MgCl_2$) durante 15 minutos a 37°C, y después durante 15 minutos a 80°C. A esta mezcla de reacción se añadieron 2 μ l de mezcla de secuenciación Big Dye (Applied Biosystems), 2 μ l (2 μ M) de cebador y 3 μ l de 5 x tampón (5 mM de $MgCl_2$, 200 mM de Tris HCl pH 8,8), y se realizaron 35 ciclos (96°C durante 30 s; 56°C durante 15 s; 60°C durante 4 min.) en un termociclador (MJ-research Inc., Watertown, MA). El ADN se precipitó usando 80 μ l de etanol al 76%, se centrifugó, se aclaró con etanol al 70%, y se secó. Las reacciones se disolvieron en 2 μ l de tampón de formamida/EDTA, se desnaturalizaron y se cargaron sobre 48 cm de geles de poliacrilamida al 4%, y se realizó la electroforesis en secuenciadores automatizados de ADN 377 (Applied Biosystems), durante 10 a 12 horas. Como alternativa, las reacciones se disolvieron en 0,3 mM de tampón de EDTA, y se sometieron a secuenciación automatizada en un secuenciador de ADN 3700 (Applied Biosystems). Las reacciones generalmente dieron entre 500-700 pb de secuencia no ambigua.

1.5. Números de acceso

La secuencia de la región de TBD1, procedente de la cepa No. 74 de *M. tuberculosis* ancestral (Ref. 8), que contiene los genes *mmpS6* y *mmpL6*, se depositó en la base de datos de EMBL con el número de acceso AJ426486. Las secuencias que bordean RD4, RD7, RD8, RD9 y RD10, en BCG, están disponibles con los números de acceso AJ003103, AJ007301, AJ131210, Y18604, y AJ132559, respectivamente.

2. Datos experimentales

Se ha evaluado la distribución de 20 regiones variables que resultan de los sucesos de inserción-supresión en los genomas del bacilo de la tuberculosis, en un total de 100 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti* y *M. bovis*. Este enfoque mostró que la mayoría de estos polimorfismos no se produjo independientemente en las diferentes cepas del complejo de *M. tuberculosis*, sino, más bien, resultan de los sucesos genéticos irreversibles, más antiguos, en cepas de progenitores comunes. Basándose en la presencia o ausencia de una supresión específica de *M. tuberculosis* (TbD1), las cepas de *M. tuberculosis* se pueden dividir en cepas ancestrales y “modernas”, compren-

diendo estas últimas representantes de las principales epidemias como las agrupaciones de *M. tuberculosis* de Beijing, Haarlem y africana. Además, la pérdida sucesiva de ADN, reflejada por RD9 y otras supresiones subsiguientes, se identificó para una estirpe evolutiva representada por *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis* que divergieron del progenitor de las presentes cepas de *M. tuberculosis* antes de que se produjese la TbD1. Estos hallazgos contradicen la hipótesis presentada a menudo de que *M. tuberculosis*, el agente etiológico de la tuberculosis humana, evolucionó a partir de *M. bovis*, el agente de la enfermedad bovina. *M. canetti* y las cepas de *M. tuberculosis* ancestrales no tienen ninguna de estas regiones suprimidas y, por lo tanto, parece que son descendientes directos del bacilo de la tuberculosis que existió antes de que se separase la estirpe *M. africanum* → *M. bovis* de la estirpe *M. tuberculosis*. Esto sugiere que el ancestro común del bacilo de la tuberculosis se asemejó a *M. tuberculosis* o *M. canetti*, y podría muy bien ser ya un patógeno humano.

Las micobacterias agrupadas en el complejo de *M. tuberculosis* se caracterizan por una similitud de 99,9% a nivel nucleotídico y secuencias de ARNr 16S idénticas (1,2), pero difieren ampliamente en términos de sus tropismos, fenotipos y patogenicidad del hospedante. Suponiendo que todas derivan de un ancestro común, es intrigante que algunas son patógenos exclusivamente humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*) o de roedores (*M. microti*), mientras que otras tienen un espectro de hospedante muy amplio (*M. bovis*). ¿Cuál fue la organización genética del último ancestro común del bacilo de la tuberculosis, y en qué hospedante vivió? ¿qué sucesos genéticos han contribuido al hecho de que el espectro de hospedante sea tan diferente y a menudo tan específico? ¿cuándo y dónde evolucionó *M. tuberculosis*? las respuestas a estas preguntas son importantes para una mejor comprensión de la patogenicidad y de la epidemiología global de la tuberculosis, y puede ayudar a anticipar tendencias futuras en la propagación de la enfermedad.

Debido al grado inusualmente elevado de conservación en sus genes de mantenimiento, se ha sugerido que los miembros del complejo de *M. tuberculosis* sufrieron un cuello de botella evolutivo al mismo tiempo que la separación en especies, lo cual se estima que ocurrió aproximadamente 15.000-20.000 años atrás (2). También se ha supuesto que *M. tuberculosis*, el agente etiológico más ampliamente extendido de la tuberculosis humana, ha evolucionado a partir de *M. bovis*, el agente de la tuberculosis bovina, mediante adaptación específica de un patógeno animal al hospedante humano (3). Sin embargo, ambas hipótesis se propusieron antes de que estuviese disponible toda la secuencia genómica de *M. tuberculosis* (4), y antes de que la Genómica Comparativa destapase varias regiones genómicas variables en los miembros del complejo de *M. tuberculosis*. Conjuntos de hibridación diferencial identificaron 14 regiones (RD1-14), que oscilan en tamaño desde 2 hasta 12,7 kb, que estaban ausentes en BCG de Pasteur, con relación a H37Rv de *M. tuberculosis* (5, 6). En paralelo, se revelaron seis regiones, RvD1-5, y TbD1, que estaban ausentes del genoma de H37Rv de *M. tuberculosis* con relación a otros miembros del complejo de *M. tuberculosis*, utilizando enfoques de Genómica Comparativa que emplean técnicas de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (5, 7) y comparaciones *in silico* de la secuencia genómica de AF2122/97 de *M. bovis* casi completa y de la secuencia H37Rv de *M. tuberculosis*.

En el presente estudio se ha analizado la distribución de estas 20 regiones variables situadas alrededor del genoma (Tabla 1) en un conjunto representativo diverso de 100 cepas que pertenecen al complejo de *M. tuberculosis*. Las cepas se aislaron de diferentes hospedantes, procedentes de un amplio intervalo de localizaciones geográficas, y mostraron un amplio espectro de características de tipaje como patrones de hibridación de *IS6110* y de espigotipo, o repeticiones en tándem de número variable de unidades repetitivas entremezcladas micobacterianas (MIRU-VNTR) (8, 9). Se ha encontrado un indicio sorprendente de que la supresión de ciertas regiones genómicas variables no se produjo independientemente en las diferentes cepas del complejo de *M. tuberculosis* y, suponiendo que hay poca o ninguna recombinación de segmentos cromosómicos entre las diversas estirpes del complejo, esto permite proponer un escenario completamente nuevo para la evolución del complejo de *M. tuberculosis* y el origen de la tuberculosis humana.

Regiones genómicas variables y su aparición en los miembros del complejo de M. tuberculosis

El ensayo de identificación sistemática mediante PCR para las 20 regiones variables (Tabla 1) dentro de las 46 cepas de *M. tuberculosis*, 14 cepas de *M. africanum*, 5 cepas de *M. canetti*, 5 cepas de *M. microti*, 28 cepas de *M. bovis* y 2 cepas de BCG empleó oligonucleótidos internos para RD y RvD conocidos, así como oligonucleótidos que flanquean estas regiones (Tabla 1). Este enfoque generó un gran conjunto de datos que fue robusto, muy fiable, e internamente controlado, puesto que los amplicones de la PCR obtenidos con el par de cebadores internos se correlacionó con la ausencia de un amplicón de tamaño apropiado con el par de cebadores de flanco, y viceversa.

Según la conservación de las secuencias de unión que flanquean las regiones variables, se distinguieron tres tipos de regiones, teniendo cada una de ellas una importancia diferente como un marcador evolutivo. El primer tipo incluyó elementos genéticos móviles, como los profagos ϕ Rv1 (RD3) y ϕ Rv2 (RD11) y las secuencias de inserción IS1532 (RD6) e IS6110 (RD5), cuya distribución en el bacilo de la tuberculosis fue muy divergente (Tabla 2). El segundo tipo de supresión está mediado por la recombinación homóloga entre elementos de inserción *IS6110* adyacentes que resultan de la pérdida del segmento de ADN que interviene (RvD2, RvD3, RvD4, y RvD5 (7)), y es variable de una cepa a otra (Tabla 2).

El tercer tipo incluye supresiones cuyas regiones genómicas de frontera no contienen típicamente secuencias repetitivas. A menudo, este tipo de supresión ocurrió en regiones codificantes que resultan del truncamiento de genes que aún están intactos en otras cepas del complejo de *M. tuberculosis*. El mecanismo exacto que conduce a este tipo de

supresión sigue siendo poco claro, pero posiblemente en este hecho pueden haber contribuido errores de deslizamiento de hebra de la ADN polimerasa. Como se muestra con detalle más abajo, RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13, RD14, y TbD1 son representativas de este tercer grupo, cuya distribución entre las 100 cepas permite proponer un escenario evolutivo para los miembros del complejo de *M. tuberculosis*, que identificó *M. tuberculosis* y/o *M. canetti* como el más estrechamente relacionado con el ancestro común del bacilo de la tuberculosis.

2.1. Cepas de *M. tuberculosis*

La investigación de las 46 cepas de *M. tuberculosis* mediante análisis de supresión reveló que la mayoría de las regiones de RD estaban presentes en todas las cepas de *M. tuberculosis* ensayadas (Tabla 2). Sólo estaban ausentes en algunas cepas las regiones RD3 y RD11, que corresponden a los dos profagos phiRv1 y phiRv2 de H37Rv de *M. tuberculosis* (4), RD6 que contiene la secuencia de inserción IS1532, y RD5 que está flanqueado con una copia de IS6110 (5). Esto es una observación importante puesto que implica que las cepas de *M. tuberculosis* están muy conservadas con respecto a RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13, y RD14, y que estas Rd representan regiones que pueden diferenciar cepas de *M. tuberculosis* independientes de su origen geográfico y de sus características de tipaje, de otros miembros del complejo de *M. tuberculosis*. Además, esto sugiere que estas regiones pueden estar implicadas en la especificidad de *M. tuberculosis* por el hospedante.

Por el contrario, la presencia o ausencia de regiones de RvD en cepas de *M. tuberculosis* fue variable. La región que mostró la mayor variabilidad fue RvD2, puesto que 18 de 46 cepas de *M. tuberculosis* estudiadas no portaron la región RvD2. Las cepas con un número elevado de copias de IS6110 (> 14) perdieron las regiones RvD2 a RvD5 más a menudo que las cepas con sólo unas pocas copias. Como ejemplo, las seis cepas ensayadas que pertenecen a la agrupación de Beijing (8) carecieron de las regiones RvD2 y RvD3. Esto está de acuerdo con la implicación propuesta de la recombinación de dos copias adyacentes de IS6110 en este suceso de supresión (7).

Sin embargo, el hallazgo más sorprendente que se refiere a las regiones de RvD fue que TbD1 estaba ausente en las 40 de las cepas de *M. tuberculosis* ensayadas (87%), incluyendo cepas representativas procedentes de epidemias importantes tales como las agrupaciones de Haarlem, Beijing y África (8). Para acentuar este resultado, se denominó a esta región “supresión 1 específica de *M. tuberculosis*” (TbD1). La comparación de la secuencia *in silico* de H37Rv de *M. tuberculosis* con la sección correspondiente de AF2122/97 de *M. bovis* reveló que en *M. bovis* este lugar comprende dos genes que codifican proteínas de membrana que pertenecen a una gran familia, mientras que en H37Rv de *M. tuberculosis* uno de estos genes (*mmpS6*) estaba ausente y el segundo estaba truncado (*mmpL6*). A diferencia de las supresiones de RvD2-RvD5, la región de TbD1 no está flanqueada por una copia de IS6110 en H37Rv de *M. tuberculosis*, sugiriendo que los elementos de inserción no estaban implicados en la supresión del fragmento de 2153 pb. Para investigar adicionalmente si las 40 cepas de *M. tuberculosis* que carecen de la región de TbD1 tuvieron la misma organización genómica de este lugar que H37Rv de *M. tuberculosis*, se amplificaron las regiones de unión de TbD1 de las diversas cepas, mediante PCR, usando cebadores que flanquean la región suprimida (Tabla 1). Este enfoque mostró que el tamaño de los amplicones obtenidos a partir de múltiples cepas fue uniforme (Fig. 1), y el análisis de secuencias subsiguiente de los productos de la PCR reveló que, en todas las cepas ensayadas que tenían suprimida la región TbD1, la secuencia de las regiones de unión fue idéntica a la de H37Rv de *M. tuberculosis* (Fig. 2). La conservación perfecta de las secuencias de unión en cepas en las que se ha suprimido las regiones TbD1 de amplia diversidad geográfica sugieren que el suceso genético que dio como resultado la supresión se produjo en un progenitor común. Sin embargo, seis cepas de *M. tuberculosis*, todas caracterizadas por muy pocas o ninguna copia de IS6110 y espigotipos que se parecían entre sí (Fig. 3), aún tenían la región TbD1 presente. De forma interesante, estas seis cepas también se agruparon juntas mediante el análisis de MIRU-VNTR (9).

El análisis de secuencias génicas parciales de *oxyR*, *pncA*, *katG*, y *gyrA* que se habían descrito como variables entre diferentes bacilos de la tuberculosis (2, 11, 12, 13) reveló que todas las cepas de *M. tuberculosis* ensayadas mostraron secuencias parciales de *oxyR* y *pncA* típicas para *M. tuberculosis* (nucleótido 285 de *oxyR* (*oxyR*²⁸⁵):G, codón57 de *pncA* (*pncA*⁵⁷:CAC)). Basándose en el polimorfismo de secuencias del codón463 de *katG* (*katG*⁴⁶³) y del codón 95 de *gyrA* (*gyrA*⁹⁵), Sreevatsan y colegas (2) definieron tres grupos entre el bacilo de la tuberculosis, mostrando el grupo 1 *katG*⁴⁶³CTG (Leu), *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr), mostrando el grupo 2 *katG*⁴⁶³CGG (Arg), *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr), y mostrando el grupo 3 *katG*⁴⁶³CGG (Arg), *gyrA*⁹⁵AGC (Ser). Según este esquema, en el estudio, 16 de las 46 cepas de *M. tuberculosis* ensayadas pertenecieron al grupo 1, mientras que 17 cepas pertenecieron al grupo 2, y sólo 3 aislados pertenecieron al grupo 3. De las 40 cepas que tenían suprimida la región TbD1, 9 mostraron características del grupo 1, incluyendo las cepas que pertenecen a la agrupación de Beijing, 28 mostraron características del grupo 2, incluyendo las cepas de agrupaciones de Haarlem y de África, y 3 mostraron características del grupo 3, incluyendo H37Rv y H37Ra. De forma muy interesante, las seis cepas de *M. tuberculosis* en las que no estaba suprimida la región TbD1, contenían una leucina (CTG) en *katG*⁴⁶³, lo que se describió como característico de cepas ancestrales de *M. tuberculosis* (grupo 1) (2). Como se muestra en la Figura 4, esto sugiere que durante la evolución de *M. tuberculosis*, la mutación de *katG* en el codón 463 CTG (Leu) → CGG (Arg) ocurrió en una cepa progenitora que tuvo suprimida la región TbD1. Esta propuesta está apoyada por el hallazgo de que las cepas que pertenecen al grupo 1 pueden tener o no suprimida la región TbD1, mientras que las 30 cepas que pertenecen a los grupos 2 y 3 carecían de TbD1 (Fig. 4). Además, todas las cepas de los grupos 2 y 3 carecieron característicamente de las secuencias espaciadoras 33-36 en la región de repetición directa (DR) (Fig. 3). Parece que tales espaciadores se pueden perder pero no ganar (14). Por lo tanto, las cepas que tienen suprimida la TbD1 se denominarán en lo sucesivo como cepas “modernas” de *M. tuberculosis*.

2.2. *M. canetti*

M. canetti es una variante suave muy rara de *M. tuberculosis*, aislada habitualmente de pacientes procedentes o con relación con África. Aunque comparte secuencias de ARNr 16S idénticas con los otros miembros del complejo de *M. tuberculosis*, las cepas de *M. canetti* difieren en muchos aspectos, incluyendo los polimorfismos en ciertos genes que conservan y mantienen la estructura, el número de copias de *IS1081*, la morfología de las colonias, y el contenido lipídico de la pared celular (15, 16). Por lo tanto, fue una sorpresa encontrar que, en *M. canetti*, todas las regiones de RD, RvD y TbD1, excepto los profagos (ϕ Rv1, ϕ Rv2), estaban presentes. Por el contrario, se identificó una región (RD^{can}) que estaba específicamente ausente de las cinco cepas de *M. canetti* que solaparon parcialmente RD12 (Fig. 4).

La conservación de las regiones de RD, RvD y TbD1, en el genoma de *M. canetti*, en conjunción con las muchas diferencias descritas y observadas, sugiere que *M. canetti* divergió del ancestro común del complejo de *M. tuberculosis* antes de que ocurrieran las RD, RvD y TbD1 en las estirpes del bacilo de la tuberculosis (Fig. 4). Esta hipótesis está apoyada por el hallazgo de que se mostró que *M. canetti* tiene 26 secuencias espaciadoras únicas en la región de repetición directa (14), que ya no están presentes en ningún otro miembro del complejo de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, *M. canetti* representa un bacilo de la tuberculosis fascinante, cuyo análisis genómico detallado puede revelar otras ideas en la evolución del complejo de *M. tuberculosis*.

2.3. *M. africanum*

Los aislados designados como *M. africanum* estudiados en la presente memoria se originan de fuentes de África Occidental y Oriental. Se aislaron 11 cepas en Sierra Leona, Nigeria y Guinea, y 2 cepas en Uganda. Una cepa proviene de los Países Bajos.

Para los 11 aislados de África Occidental, el análisis de RD indicó que estas cepas carecían todas ellas de la región RD9 que contiene *cobL*. El análisis de secuencias de la región de unión de RD9 mostró que la organización genética de este lugar, en las cepas de África Occidental, fue idéntica a la de *M. bovis* y *M. microti*, por cuanto la parte 5' de *cobL*, así como los genes Rv2073c y Rv2074c, estaban ausentes. Además, seis cepas (2 de Sierra Leona, 4 de Guinea) también carecieron de RD7, RD8 y RD10 (Tabla 2). Las secuencias de unión que bordean RD7, RD8 y RD10, al igual que para RD9, fueron idénticas a las de las cepas de *M. bovis* y *M. microti*. En cuanto a los dos profagos ϕ Rv1 y ϕ Rv2, las cepas de África Occidental contenían todas ϕ Rv2, mientras que ϕ Rv1 estaba ausente. No se observó variabilidad para las regiones de RvD. RvD1-RvD5 y TbD1 estaban presentes en todas las cepas de África Occidental ensayadas. Esto muestra que *M. africanum*, prevalente en África Occidental, se puede diferenciar de *M. tuberculosis* "moderna" en al menos dos marcadores genéticos variables, a saber, la ausencia de la región RD9 y la presencia de la región TbD1.

Por el contrario, *M. africanum* de África Oriental, y para el aislado procedente de los Países Bajos, no se encontró ningún marcador genético que lo pudiese diferenciar de las cepas de *M. tuberculosis*. Con la excepción del profago ϕ Rv1 (RD3), las 3 cepas de Uganda y la de los Países Bajos no mostraron ninguna de las supresiones de RD, pero carecieron de la región de TbD1, de la misma manera que las cepas "modernas" de *M. tuberculosis*. La ausencia de la región de TbD1 también se confirmó mediante análisis de secuencias de la región de unión de TbD1, que se encontró que era idéntica a la de las cepas de *M. tuberculosis* que tenían suprimida la región TbD1. Estos resultados indican una relación genética muy estrecha de estas cepas con *M. tuberculosis*, y sugieren que se debieran considerar como cepas de *M. tuberculosis* en lugar de cepas de *M. africanum*.

2.4. *M. microti*

Las cepas de *M. microti* se aislaron en los años de la década de 1930 a partir de ratones de campo (17), y más recientemente de pacientes inmunodeprimidos (18). Estas cepas se caracterizan por un espigotipo idéntico, característico, pero difieren en sus perfiles de *IS6110*. Tanto los aislados del ratón de campo como de seres humanos carecieron de las regiones RD7, RD8, RD9, y RD10, así como de la región que está específicamente suprimida de *M. microti* (RD^{mic}). RD^{mic} se reveló mediante un estudio de Genómica Comparativa detallado de aislados de *M. microti* (19), usando clones de una librería de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de *M. microti*. RD^{mic} solapa parcialmente RD1 de BCG (datos no mostrados). Además, los aislados de ratones de campo perdieron parte de la región de RD5, mientras que esta región estaba presente en el aislado del ser humano. Puesto que la región de unión de RD5 en *M. microti* fue diferente a aquella en BCG (datos no mostrados), RD5 no se usó como un marcador evolutivo.

2.5. *M. bovis* y *M. bovis* BCG

M. bovis tiene un espectro hospedante muy grande que infecta a muchas especies de mamíferos, incluyendo al hombre. La colección de cepas de *M. bovis* que se identificó sistemáticamente en busca de las regiones de RD y RvD consistió en 2 cepas de BCG y 18 cepas "clásicas" de *M. bovis* caracterizadas generalmente por sólo una o dos copias de *IS6110* procedentes de fuentes bovinas, de llama y de seres humanos, además de tres aislados de cabra, tres aislados de foca, dos aislados de antílope oryx, y dos cepas de *M. bovis* procedentes de seres humanos que presentaron un número mayor de copias de *IS6110*.

Excluyendo los profagos, la distribución de las RD permitió diferenciar cinco grupos principales entre las cepas de *M. bovis* ensayadas. El primer grupo estaba formado por cepas que carecían de RD7, RD8, RD9, y RD10. Representativos de este grupo son tres aislados de foca y dos aislados de seres humanos que contienen entre tres y cinco copias de IS6110 (datos no mostrados). Dos aislados de antílope oryx, que tienen entre 17 y 20 copias de IS6110, formaron el segundo grupo, que carecía de partes de RD5 además de RD7-Rd10, y que se parecían mucho a los aislados de *M. microti*. Sin embargo, no mostraron RD^{mic}, la supresión característica de las cepas de *M. microti* (datos no mostrados). El análisis de secuencias de *oxyR* y *pncA* parciales procedentes de cepas que pertenecen a los grupos uno y dos, mostró polimorfismos de secuencia característicos de las cepas de *M. tuberculosis* (*oxyR*²⁸⁵:G, *pncA*⁵⁷:CAC, Ref. 12, 13).

Tres grupos consistieron en aislados de cabra que carecieron de las regiones RD5, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, y RD13. Como se ha descrito anteriormente por Aranaz y colegas, estas cepas mostraron una adenosina en la posición 285 del pseudogén de *oxyR* que es específico de cepas “clásicas” de *M. bovis*, mientras que la secuencia del polimorfismo *pncA*⁵⁷ fuera idéntica a aquella en *M. tuberculosis* (20). Esto concuerda bien con los resultados del análisis de secuencias (Tabla 2) y con el hallazgo de que, excepto para RD4, los aislados de cabra presentaron las mismas supresiones que las cepas “clásicas” de *M. bovis*. Tomado en conjunto, esto sugiere que la mutación *oxyR*²⁸⁵ (G → A) ocurrió en las cepas de *M. bovis* antes de que se perdiese RD4. De forma interesante, las cepas de *M. bovis* más habituales (*M. bovis* “clásicas” (21)), aisladas de ganado vacuno procedente de Argentina, de los Países Bajos, del Reino Unido y de España, así como procedente de seres humanos (por ejemplo, *M. bovis* resistente a múltiples fármacos procedente de España (22)), mostraron el número más elevado de supresiones de RD, y parece que sufrieron la mayor pérdida de ADN con relación a otros miembros del complejo de *M. tuberculosis*. Éstas carecieron de las regiones RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, y RD13, confirmando los resultados obtenidos con las cepas de referencia (5, 6). Estas cepas, junto con las dos cepas de BCG, fueron las únicas que mostraron el polimorfismo de *pncA*⁵⁷ de GAC (Asp), además de la mutación de *oxyR*²⁸⁵ (G → A) característica de *M. bovis*. El análisis de las cepas de BCG indicó que BCG careció de las mismas regiones de RD que las cepas “clásicas” de *M. bovis*, además de RD1, RD2 y RD14, lo que ocurrió aparentemente durante y después del proceso de atenuación (Fig. 4) (6, 23).

Contrariamente a las RD, las regiones de RvD se conservaron enormemente en las cepas de *M. bovis*. Con la excepción de los dos aislados del antílope oryx ricos en IS6110, que carecieron de RvD2, RvD3 y RvD4, todas las otras cepas tuvieron las cinco regiones RvD. Es particularmente digno de mención que TbD1 estaba presente en todas las cepas de *M. bovis*.

Sin embargo, excepto para los dos aislados de seres humanos, que contienen entre tres y cinco copias de IS6110 del grupo 1, las cepas denominadas como *M. bovis* mostraron un único polimorfismo nucleotídico en la región de TbD1 en el codón 551 (AAG) del gen *mmpL6*, con relación a las cepas de *M. canetti*, de *M. africanum* y de *M. tuberculosis* ancestral, que se caracterizan por el codón AAC. Incluso las cepas aisladas de focas y del antílope oryx con lugares de *oxyR* y *pncA* como los de *M. tuberculosis*, y con un número menor de regiones suprimidas que las cepas clásicas de *M. bovis*, mostraron el polimorfismo de AAG de *mmpL6*⁵⁵¹ típico para *M. bovis* y *M. microti* (Tabla 2, Fig. 4). Como tal, este polimorfismo podría servir como un marcador genético muy útil para la diferenciación de cepas que carecen de RD7, RD8, RD9, y RD10 y que se han clasificado como *M. bovis* o *M. africanum*, pero pueden diferir de otras cepas del mismo taxón.

3. Discusión

3.1. Origen de la tuberculosis humana

Durante muchos años, se pensó que la tuberculosis humana evolucionó de la enfermedad bovina mediante adaptación de un patógeno animal al hospedante humano (3). Esta hipótesis se basa en la propiedad de *M. tuberculosis* para ser un patógeno humano casi exclusivamente, mientras que *M. bovis* tiene un intervalo mucho más amplio de hospedantes. Sin embargo, los resultados de este estudio muestran sin ambigüedad que *M. bovis* ha sufrido numerosas supresiones con relación a *M. tuberculosis*. Esto está confirmado por el análisis preliminar de la secuencia genómica casi completa de AF2122/97 de *M. bovis*, una cepa “clásica” de *M. bovis* aislada de ganado vacuno, que no reveló agrupaciones génicas que estuvieran confinadas específicamente en *M. bovis*. Esto indica que el genoma de *M. bovis* es más pequeño que el de *M. tuberculosis* (24). Parece plausible que *M. bovis* es el miembro final de una estirpe separada representada por *M. africanum* (RD9), *M. microti* (RD7, RD8, RD9, RD10) y *M. bovis* (RD4, RD5, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13) (25), que se ramificó del progenitor de aislados de *M. tuberculosis*. La pérdida sucesiva de ADN puede haber contribuido a la expansión clónica y a la aparición de patógenos más exitosos en algunos hospedantes nuevos.

Es objeto de especulación si el progenitor de las cepas de *M. tuberculosis* existentes fueron ya un patógeno humano cuando la estirpe *M. africanum* → *M. bovis* se separó de la estirpe de *M. tuberculosis*. Sin embargo, existen dos razones para creer que éste fue el caso. En primer lugar, las seis cepas ancestrales de *M. tuberculosis* (TbD1⁺, RD9⁺) (Fig. 3) que se asemejan al último ancestro común antes de la separación de *M. tuberculosis* y *M. africanum* son todas patógenos humanos. En segundo lugar, *M. canetti*, que se separó probablemente del ancestro común de las cepas actuales de *M. tuberculosis* antes que cualquier otro miembro conocido del complejo de *M. tuberculosis*, es también un patógeno humano. Tomado en conjunto, esto significa que los bacilos de la tuberculosis, que se piensa que se asemejan mucho al progenitor de *M. tuberculosis*, son patógenos humanos y no patógenos animales. También es intrigante el hecho de que la mayoría de estas cepas fueran de origen africano o indio (Fig. 3). Es probable que estas

cepas ancestrales se originasen predominantemente de focos endémicos (15, 26), mientras que las cepas “modernas” de *M. tuberculosis*, que han perdido TbD1, pueden representar cepas epidémicas de *M. tuberculosis* que se introdujeron en las mismas regiones geográficas más recientemente como consecuencia de la expansión a nivel mundial de la epidemia de tuberculosis.

3.2. Escala de tiempo evolutiva del complejo de *M. tuberculosis*

Debido a la elevada conservación de secuencias en genes propios, Sreevatsan *et al.* teorizaron previamente que los bacilos de la tuberculosis encontraron un cuello de botella importante hace 15.000-20.000 años (2). Puesto que la conservación de la secuencia de unión de TbD1 en todas las cepas que tienen suprimida TbD1 ensayadas sugiere una descendencia a partir de un único clon, la supresión de TbD1 es un indicador perfecto de que las cepas “modernas” de *M. tuberculosis* que dan cuenta de la inmensa mayoría de los casos de tuberculosis actuales, sufrieron definitivamente tal cuello de botella y se extendieron entonces alrededor del mundo.

Como se describe en detalle en la sección de resultados, el análisis mostró que las mutaciones *katG*⁴⁶³ CTG → CGG y las mutaciones *gyrA*⁹⁵ ACC → AGC subsiguientes, que se usaron por Sreevatsan y colegas para designar a los grupos 2 y 3 de su ruta evolutiva propuesta del bacilo de la tuberculosis (2), ocurrieron en una estirpe de cepas de *M. tuberculosis* que ya había perdido TbD1 (Fig. 4). Aunque las supresiones son marcadores más estables que las mutaciones puntuales, que pueden estar sometidas a inversión, se encontró para las cepas ensayadas una correlación perfecta de los datos de supresión y de mutación puntual.

Esta información, junto con los resultados procedentes de un estudio reciente de Fletcher y colegas (27), que han demostrado que los ADN de *M. tuberculosis* amplificados a partir de aldeanos húngaros momificados de forma natural de los siglos 18 y 19 pertenecieron a los grupos 2 y 3 de *katG*⁴⁶³/*gyrA*⁹⁵, sugiere que la supresión de TbD1 ocurrió en la estirpe de *M. tuberculosis* antes del siglo 18. Esto podría significar que el drástico incremento de casos de tuberculosis al final del siglo 18 en Europa implicó principalmente a las cepas “modernas” de *M. tuberculosis*. Además, muestra que la tuberculosis fue causada por *M. tuberculosis* y no por *M. bovis*, un hecho que se describe también para casos en la Inglaterra medieval rural (28).

Existe buena prueba de que las infecciones micobacterianas ocurrieron en el hombre varios miles de años atrás. Se sabe que la tuberculosis apareció en Egipto durante el reino de los faraones, debido a que se han identificado, en momias procedentes de ese período (29), lesiones patognomónicas de la médula espinal y de las costillas debidas a tuberculosis. La identificación de bacilos acidorresistentes, así como la amplificación mediante PCR de IS6110 de momias peruanas (30), también sugiere que la tuberculosis existió en sociedades precolombinas de América Central y del Sur. Para estimar cuándo se produjo el cuello de botella de TbD1, sería ahora muy interesante saber si las momias egipcias y de América del Sur portaban el ADN de la *M. tuberculosis* que tenía o no suprimido la TbD1.

El otro cuello de botella principal, que parece que ha ocurrido para miembros de la estirpe *M. africanum* → *M. microti* → *M. bovis*, se refleja por RD9 y las supresiones subsiguientes RD7, RD8 y RD10 (Fig. 4). Parece que estas supresiones ocurrieron en el progenitor de los bacilos de la tuberculosis que -actualmente- muestran espectros naturales de hospedantes tan diversos como seres humanos en África, campañoles en las Islas Orkney (UK), focas en Argentina, cabras en España, y tejones en el Reino Unido. Por esta razón, es difícil imaginar que la extensión y adaptación de bacterias que tienen suprimida las RD9, a sus hospedantes específicos, podrían haber aparecido dentro de los 15.000-20.000 de especiación postulados del complejo de *M. tuberculosis*.

Sin embargo, se podría ganar una mayor idea en esta materia mediante análisis de RD de muestras de ADN anti-guas, por ejemplo ADN micobacteriano aislado de un esqueleto de bisonte de 17.000 años (31). La micobacteria cuyo ADN se amplificó mostró un espoligotipo que estaba muy estrechamente relacionado con patrones de *M. africanum*, y podría haber sido un representante temprano de la estirpe *M. africanum* → *M. bovis*. Con las secuencias de unión de TbD1 y RD9 que se suministran en la presente memoria, los análisis mediante PCR de ADN antiguos deberían permitir que se llevaran a cabo estudios muy concretos para aprender más sobre la escala de tiempos dentro de la cual han evolucionado los miembros del complejo de *M. tuberculosis*.

3.3. Comentarios de conclusión

El estudio proporciona un sumario de la diversidad y conservación de regiones variables en un amplio intervalo de bacilos de la tuberculosis. El análisis de la supresión de 100 cepas procedentes de diversos hospedantes y países ha identificado algunas cepas de *M. canetti*, *M. tuberculosis* y *M. africanum* evolutivamente “viejas”, la mayoría de ellas de origen africano, así como cepas “modernas” de *M. tuberculosis*, incluyendo estas últimas representantes de agrupaciones epidémicas importantes como Beijing, Haarlem y África. El uso del análisis de supresión en conjunción con el tipaje molecular y el análisis de mutaciones específicas ha mostrado que representa un enfoque muy poderoso para el estudio de la evolución de los bacilos de la tuberculosis, y para la identificación de marcadores evolutivos. En una perspectiva más práctica, estas regiones, principalmente RD9 y TbD1, pero también RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD10, RD12 y RD13, representan candidatos muy interesantes para el desarrollo de herramientas de diagnóstico poderosas para la identificación rápida y no ambigua de miembros del complejo de *M. tuberculosis* (32). Este enfoque genético para la diferenciación se puede usar ahora para sustituir la división tradicional, a menudo confusa, del complejo de *M. tuberculosis* en subespecies rígidamente definidas.

Además, los análisis funcionales mostrarán si la supresión de TbD1 confiere alguna ventaja selectiva a *M. tuberculosis* “moderna”, o si otras circunstancias contribuyeron a la pandemia de las cepas de *M. tuberculosis* a las que se les suprimió TbD1.

5 Ejemplo 4

Los miembros del complejo de *M. tuberculosis* tienen un grado inusualmente alto de conservación, de forma que las sondas de ácidos nucleicos y los ensayos de amplificación comercialmente disponibles no pueden diferenciar estos organismos. Además, los métodos de identificación convencionales a menudo son ambiguos, problemáticos y consumen tiempo, debido al crecimiento lento de los organismos.

En la presente invención se ha resuelto el problema, mediante análisis de supresión, al que se han enfrentado laboratorios de microbiología clínica para la diferenciación dentro del complejo de *M. tuberculosis*.

Este enfoque permite realizar un diagnóstico en un fluido biológico usando al menos tres marcadores, incluyendo TbD1. La Tabla 3 siguiente ilustra tal combinación suficiente para realizar la distinción entre los miembros del complejo de *M. tuberculosis*.

20 TABLA 3

CEPA DE MYCOBACTERIUM	MARCADORES		
	RD4	RD9	TBD1
M. bovis BCG	-	-	+
M. bovis	-	-	+
M. africanum	+	-	+
M. tuberculosis	+	+	-
M. tuberculosis ancestral	+	+	+
M. canettii	+	+	+

Además del marcador de TbD1, se deben usar preferentemente al menos otros 2 marcadores. Los ejemplos de tales marcadores adicionales disponibles en la bibliografía se enumeran en la siguiente Tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 286 212 T3

Datos suplementarios

TABLA 1

Regiones de RD, RvD y TbD1, y marcadores seleccionados

	Región ausente de BCG	Gen	Tamaño (kb)	Par de cebadores internos	Cebadores de flanqueo o 2º par de cebadores internos *
5					
10	RD1	Rv3871-Rv3879c	9,5	RD1in-Rv3878F GTC AGC CAA GTC AGG CTA CC RD1in-Rv3878R CAA CGT TGT GGT TGT TGA GG	RD1-flanco.izquierdo GAA ACA GTC CCC AGC AGG T RD1-flanco.derecho TTC AAC GGG TTA CTG CGA AT
15	RD2	Rv1978-Rv1988	10,8	RD2-Rv1979.int.F TAT AGC TCT CGG CAG GTT CC RD2-Rv1979-int.R ATC GGC ATC TAT GTC GGT GT	RD2-flanco.F CTC GAC CGC GAC GAT GTG C RD2-flanco.R CCT CGT TGT CAC CGC GTA TG
20	RD3*	Rv1573-Rv1586c	9,2	RD3-Rv1586.int.F TTA TCT TGG CGT TGA CGA TG RD3-Rv1586.int.R CAT ATA AGG GTG CCC GCT AC	RD3-int-REP.F CTG ACG TCG TTG TCG AGG TA* RD3-int-REP.R GTA CCC CCA GGC GAT CTT*
25	RD4	Rv1505c-Rv1516c	12,7	RD4-Rv1516.int.F CAA GGG GTA TGA GGT TCA CG RD4-Rv1516.int.R CGG TGA TTC GTG ATT GAA CA	RD4-flanco.F CTC GTC GAA GGC CAC TAA AG RD4-flanco.R AAG GCG AAC AGA TTC AGC AT
30	RD5*	Rv2346c-Rv2353c	9,0	RD5A-Rv2348.int.F AAT CAC GCT GCT ACT CC RDSA-Rv2348.int.R GTG CTT TTG CCT CTT GGT C	RD5B-plcA.int.F CAA GTT GGG TCT GGT CGA AT RD5B-plcA.int.R GCT ACC CAA GGT CTC CTG GT ND
35	RD6*	Rv3425-Rv3428c	4,9	RD6-IS1532F CAG CTG GTG ACT TCA AAT GC RD6-IS1532R CTC CCG ACA CCT GTT CGT	ND
40	RD7	Rv1964-Rv1977	12,7	RD7-Rv1976.int.F TGG ATT GTC GAC GGT ATG AA RD7-Rv1976.int.R GGT CGA TAA GGT CAC GGA AC	RD7-flanco.F GGT AAT CGT GGC CGA CAA G RD7-flanco.R CAG CTC TTC CCC TCT CGA C
45	RD8	ephA-lpqG	5,9	RD8-ephA.F GGT GTG ATT TGG TGA GAC GAT G RD8.ephA.R R ACT TCC TCG TGA CTA ATC CAG GC	RD8-flanco.F CAA TCA GGG CTG TGC TAA CC RD3-flank.R CGA CAG TTG TGC GTA CTG GT
50	RD9	cobL-Rv2075	2,0	RD9-intF CGA TGG TCA ACA CCA CTA CG RD9-intR CTG GAC CTC GAT GAC CAC TC	RD9-flancoF GTG TAG GTC AGC CCC ATC C RD9-flancoR GCC CAA CAG CTC GAC ATC
55					
60					
65					

ES 2 286 212 T3

5	RD10	Rv0221-Rv0223	1,9	RD10-intF GTA ACC GCT TCA CCG GAA T RD10-intR GTC AAC TCC ACG GAA AGA CC	RD10-flankF CTG CAA CCA TCC GGT ACA C RD10-flancoR GTC ATG AAC GCC GGA CAG
10	RD11	Rv2645-Rv2695c	11,0	RD11-Rv2646F CGG CAG CTA GAC GAC CTC RD 11-Rv2646R AAC GTG CTG CGA TAG GTT TT	RD11-fla-F TCA CAT AGG GGC TGC GAT AG RD 11-fla-R AGA GGA ACC TTT CGG TGG TT
15	RD12	sseC-Rv3121	2,8	RD12-Rv3120.int.F GAA ATA CGA GTG CGC TGA CC RD12-Rv3120.int.R CTC TGA ACC ATC GGT GTC G	RD12-flanco.F GCC ATC AAC GTC AAG AAC CT RD12-flanco.R CGG CCA GGT AAC AAG GAG T
20	RD13	Rv1255c-Rv1257c	3,0	RD13intF GGA TGT CAC TCG GAA CGG CA RD13intR CAC CGG GCT GAT CGA GCG A	RD13-flanco.F CGA TGG TGT TTC TTG GTG AG RD13-flanco.R GGA TCG GCT CAG TGA ATA CC
25	RD14	Rv1765c-Rv1773c	9,0	RD14-Rv1769.int.F GTG GAG CAC CTT GAC CTG AT RD14-Rv1769.int.R CGT CGA ATA CGA GTC GAA CA	RD14-flanco.F TTG ATT CGC CAA CAA CTG AA RD14-flanco.R GGG CTG GTT ACT GTC GAT TC
30	Región perdida de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i>				
35	RvD1*		5,0	RvD1-int1F AGC GCG TCG AAC ACC GGC RvD 1-int1 R CCT GAA TCC GCG CAA TTC CAT	RvD1-int2.F GAG CCA CTC CGA TGT TGA CT RvD 1-int2. R CAC GCG AAC CCT ACC TAC AT
40	RvD2*	<i>plcD</i>	5,1	RvD2-int1F- GTT CTC CTG TCG AAC CTC CA RvD2-int R ACT TCA CCG GTT TCA TCT CG	RvD2-int2F GGA CGG TGA CGG TAT TTG TC RvD2-int2R TCG CCA ACT TCT ATG GAC CT
45	RvD3		1,0	RvD3-intF ATC GAT CAG GTC GTC AAT GC RvD3-intR ACG CCA CCA TCA AGA TCC	RvD3-flanco.F AAA CCA TGC AGC GTC TGC CA RvD3-flancoR GCG TTT CTG CGT CTG GTT GA
50	RvD4*	gen PPE	0,8	RvRD4-intF-PPE GGT TGC CAA CGT TAC CGA TGC RvD4-intR-PPE CCG GTG GTG GTG GCG GCT	ND ND
55	RvD5	<i>moa</i>	4,0	RvD5intF GGG TTC ACG TTC ATT ACT GTT C RvD5intR CCT GCG CTT ATC TCT AGC GG	RvD5-flancoF CCC ATC GTG GTC GTT CAC C RvD5-flancoR GTA CCC GCA CCA CCT GCT G
60					
65					

ES 2 286 212 T3

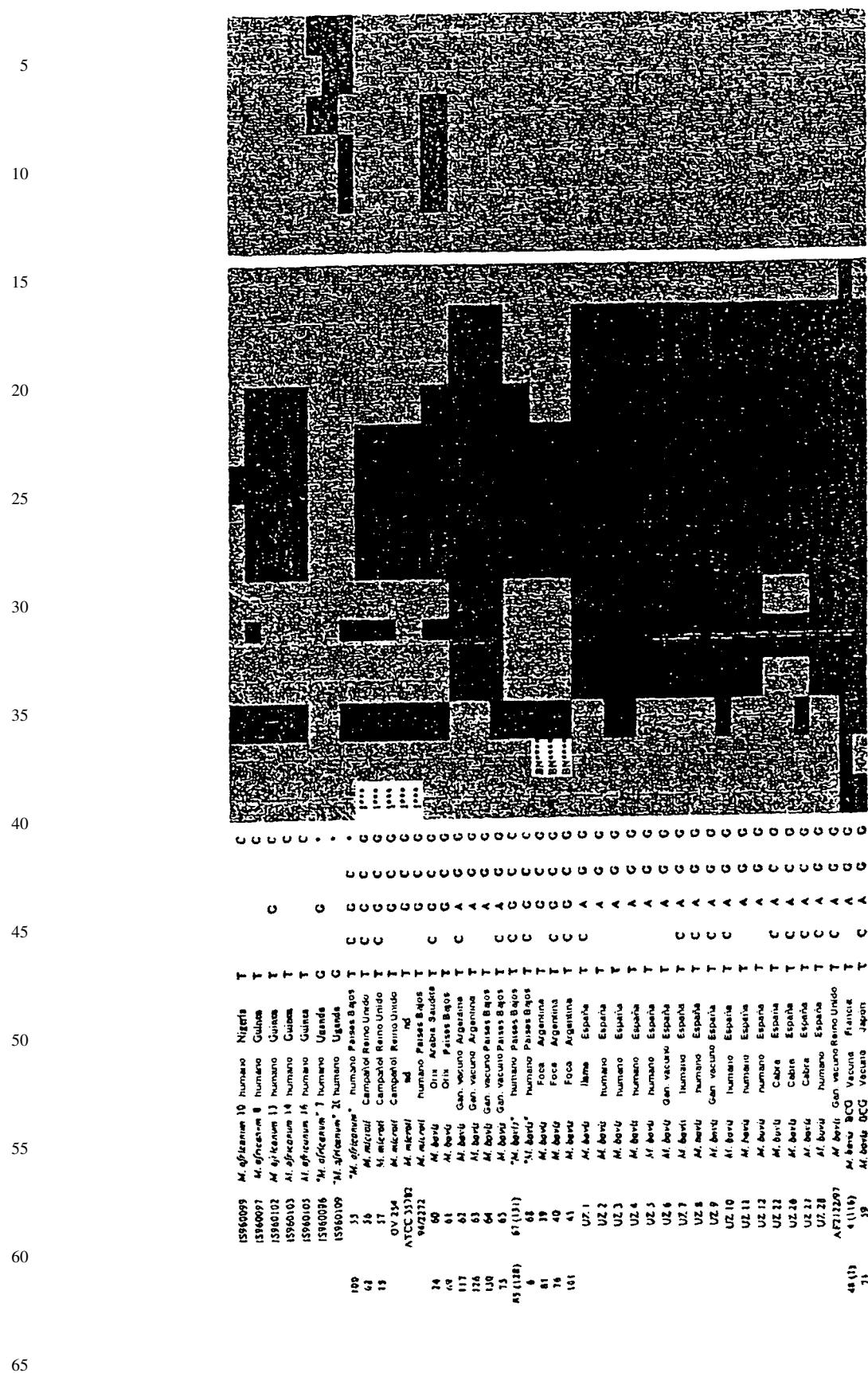
	TbD1	<i>mmpL6</i>	2,1	TBD1intS.F CGT TCA ACC CCA AAC AGG TA	TBD1flal-F CTA CCT CAT CTT CCG GTC CA
5				TBD1 intS.R AAT CGA ACT CGT GGA ACA CC	TBD1flal-R CAT AGA TCC CGG ACA TGG TG
	PCR de <i>katG</i>, <i>gyrA</i>, <i>oxyR</i>¹, <i>pncA</i> y <i>mmpL6</i>, y cebadores de secuenciación				
10		<i>katG</i> ⁴⁶³		<i>katG</i> -2154,225-PCR-F CTA CCA GCA CCG TCA TCT CA	<i>katG</i> -2154,872-SEC-R ACA AGC TGA TCC ACC GAG AC
15				<i>katG</i> -2155, 157-PCR-R AGG TCG TAT GGA CGA ACA CC	
		<i>gyrA</i> ⁹⁵		<i>gyrA</i> -7,127-PCR-F GTT CGT GTG TTG CGT CAA GT	<i>gyrA</i> -7,461 F CGG GTG CTC TAT GCA ATG TT
20				<i>gyrA</i> - 8,312-PCR-R CAG CTG GGT GTG CTT GTA AA	
25		<i>oxyR</i> ²⁸⁵		<i>oxyR</i> 2725,559F TATGCGATCAGGCGT ACT TG	<i>oxyR</i> -2726,024-SEC-R CAA AGC AGT GGT TCA GCA GT
30				<i>oxyR</i> -2726,024-PCR-R CAAAGCAGTGGTTCA GCA GT	
		<i>pncA</i> ⁵⁷		<i>pncA</i> -2288,678-PCR-F ATC AGG AGC TGC AAA CCA AC	<i>pncA</i> -2289,319-SEC-R GGC GTC ATG GAC CCT ATA TC
35				<i>pncA</i> -2289,319-PCR-R GGC GTC ATG GAC CCT ATA TC	
40		<i>mmpL6</i> ⁵⁵¹		<i>mmpL</i> -seq5F GTA TCA GAG GGA CCG AGC AG	<i>mmpL</i> -seq5F GTA TCA GAG GGA CCG AGC AG
45				TBD1flal-R CATAGATCC CGG ACA TGG TG	

La nomenclatura de RD usada en esta tabla se basa en la usada por Brosch *et al.* (2000), (Ref. 25), y difiere de la propuesta por Behr y colaboradores (1999), (Ref. 6). Las secuencias de los cebadores se muestran en la dirección 5' → 3'.

* Regiones en las que se usó un segundo par de cebadores internos en lugar de cebadores de flanqueo, debido a regiones repetitivas de flanqueo, y/o elementos genéticos móviles.

Tabla 2 en forma de red

nº de ident.	Especie	Hospedante	País	latG	long	RD1	RD2	RD3	RD4	RD5	RD6	RD7	RD8	RD9	RD10	RD11	RD12	RD13	RD14	RD15	RD16	RD17	RD18	RD19	RD20	RD21	RD22	RD23	RD24	RD25	RD26	RD27	RD28	RD29	RD30	RD31	RD32	RD33	RD34	RD35	RD36	RD37	RD38	RD39	RD40	RD41	RD42	RD43	RD44	RD45	RD46	RD47	RD48	RD49	RD50	RD51	RD52	RD53	RD54	RD55	RD56	RD57	RD58	RD59	RD60	RD61	RD62	RD63	RD64	RD65	RD66	RD67	RD68	RD69	RD70	RD71	RD72	RD73	RD74	RD75	RD76	RD77	RD78	RD79	RD80	RD81	RD82	RD83	RD84	RD85	RD86	RD87	RD88	RD89	RD90	RD91	RD92	RD93	RD94	RD95	RD96	RD97	RD98	RD99	RD100	RD101	RD102	RD103	RD104	RD105	RD106	RD107	RD108	RD109	RD110	RD111	RD112	RD113	RD114	RD115	RD116	RD117	RD118	RD119	RD120	RD121	RD122	RD123	RD124	RD125	RD126	RD127	RD128	RD129	RD130	RD131	RD132	RD133	RD134	RD135	RD136	RD137	RD138	RD139	RD140	RD141	RD142	RD143	RD144	RD145	RD146	RD147	RD148	RD149	RD150	RD151	RD152	RD153	RD154	RD155	RD156	RD157	RD158	RD159	RD160	RD161	RD162	RD163	RD164	RD165	RD166	RD167	RD168	RD169	RD170	RD171	RD172	RD173	RD174	RD175	RD176	RD177	RD178	RD179	RD180	RD181	RD182	RD183	RD184	RD185	RD186	RD187	RD188	RD189	RD190	RD191	RD192	RD193	RD194	RD195	RD196	RD197	RD198	RD199	RD200	RD201	RD202	RD203	RD204	RD205	RD206	RD207	RD208	RD209	RD210	RD211	RD212	RD213	RD214	RD215	RD216	RD217	RD218	RD219	RD220	RD221	RD222	RD223	RD224	RD225	RD226	RD227	RD228	RD229	RD230	RD231	RD232	RD233	RD234	RD235	RD236	RD237	RD238	RD239	RD240	RD241	RD242	RD243	RD244	RD245	RD246	RD247	RD248	RD249	RD250	RD251	RD252	RD253	RD254	RD255	RD256	RD257	RD258	RD259	RD260	RD261	RD262	RD263	RD264	RD265	RD266	RD267	RD268	RD269	RD270	RD271	RD272	RD273	RD274	RD275	RD276	RD277	RD278	RD279	RD280	RD281	RD282	RD283	RD284	RD285	RD286	RD287	RD288	RD289	RD290	RD291	RD292	RD293	RD294	RD295	RD296	RD297	RD298	RD299	RD300	RD301	RD302	RD303	RD304	RD305	RD306	RD307	RD308	RD309	RD310	RD311	RD312	RD313	RD314	RD315	RD316	RD317	RD318	RD319	RD320	RD321	RD322	RD323	RD324	RD325	RD326	RD327	RD328	RD329	RD330	RD331	RD332	RD333	RD334	RD335	RD336	RD337	RD338	RD339	RD340	RD341	RD342	RD343	RD344	RD345	RD346	RD347	RD348	RD349	RD350	RD351	RD352	RD353	RD354	RD355	RD356	RD357	RD358	RD359	RD360	RD361	RD362	RD363	RD364	RD365	RD366	RD367	RD368	RD369	RD370	RD371	RD372	RD373	RD374	RD375	RD376	RD377	RD378	RD379	RD380	RD381	RD382	RD383	RD384	RD385	RD386	RD387	RD388	RD389	RD390	RD391	RD392	RD393	RD394	RD395	RD396	RD397	RD398	RD399	RD400	RD401	RD402	RD403	RD404	RD405	RD406	RD407	RD408	RD409	RD410	RD411	RD412	RD413	RD414	RD415	RD416	RD417	RD418	RD419	RD420	RD421	RD422	RD423	RD424	RD425	RD426	RD427	RD428	RD429	RD430	RD431	RD432	RD433	RD434	RD435	RD436	RD437	RD438	RD439	RD440	RD441	RD442	RD443	RD444	RD445	RD446	RD447	RD448	RD449	RD450	RD451	RD452	RD453	RD454	RD455	RD456	RD457	RD458	RD459	RD460	RD461	RD462	RD463	RD464	RD465	RD466	RD467	RD468	RD469	RD470	RD471	RD472	RD473	RD474	RD475	RD476	RD477	RD478	RD479	RD480	RD481	RD482	RD483	RD484	RD485	RD486	RD487	RD488	RD489	RD490	RD491	RD492	RD493	RD494	RD495	RD496	RD497	RD498	RD499	RD500	RD501	RD502	RD503	RD504	RD505	RD506	RD507	RD508	RD509	RD510	RD511	RD512	RD513	RD514	RD515	RD516	RD517	RD518	RD519	RD520	RD521	RD522	RD523	RD524	RD525	RD526	RD527	RD528	RD529	RD530	RD531	RD532	RD533	RD534	RD535	RD536	RD537	RD538	RD539	RD540	RD541	RD542	RD543	RD544	RD545	RD546	RD547	RD548	RD549	RD550	RD551	RD552	RD553	RD554	RD555	RD556	RD557	RD558	RD559	RD560	RD561	RD562	RD563	RD564	RD565	RD566	RD567	RD568	RD569	RD570	RD571	RD572	RD573	RD574	RD575	RD576	RD577	RD578	RD579	RD580	RD581	RD582	RD583	RD584	RD585	RD586	RD587	RD588	RD589	RD590	RD591	RD592	RD593	RD594	RD595	RD596	RD597	RD598	RD599	RD600	RD601	RD602	RD603	RD604	RD605	RD606	RD607	RD608	RD609	RD610	RD611	RD612	RD613	RD614	RD615	RD616	RD617	RD618	RD619	RD620	RD621	RD622	RD623	RD624	RD625	RD626	RD627	RD628	RD629	RD630	RD631	RD632	RD633	RD634	RD635	RD636	RD637	RD638	RD639	RD640	RD641	RD642	RD643	RD644	RD645	RD646	RD647	RD648	RD649	RD650	RD651	RD652	RD653	RD654	RD655	RD656	RD657	RD658	RD659	RD660	RD661	RD662	RD663	RD664	RD665	RD666	RD667	RD668	RD669	RD670	RD671	RD672	RD673	RD674	RD675	RD676	RD677	RD678	RD679	RD680	RD681	RD682	RD683	RD684	RD685	RD686	RD687	RD688	RD689	RD690	RD691	RD692	RD693	RD694	RD695	RD696	RD697	RD698	RD699	RD700	RD701	RD702	RD703	RD704	RD705	RD706	RD707	RD708	RD709	RD710	RD711	RD712	RD713	RD714	RD715	RD716	RD717	RD718	RD719	RD720	RD721	RD722	RD723	RD724	RD725	RD726	RD727	RD728	RD729	RD730	RD731	RD732	RD733	RD734	RD735	RD736	RD737	RD738	RD739	RD740	RD741	RD742	RD743	RD744	RD745	RD746	RD747	RD748	RD749	RD750	RD751	RD752	RD753	RD754	RD755	RD756	RD757	RD758	RD759	RD760	RD761	RD762	RD763	RD764	RD765	RD766	RD767	RD768	RD769	RD770	RD771	RD772	RD773	RD774	RD775	RD776	RD777	RD778	RD779	RD780	RD781	RD782	RD783	RD784	RD785	RD786	RD787	RD788	RD789	RD790	RD791	RD792	RD793	RD794	RD795	RD796	RD797	RD798	RD799	RD800	RD801	RD802	RD803	RD804	RD805	RD806	RD807	RD808	RD809	RD810	RD811	RD812	RD813	RD814	RD815	RD816	RD817	RD818	RD819	RD820	RD821	RD822	RD823	RD824	RD825	RD826	RD827	RD828	RD829	RD830	RD831	RD832	RD833	RD834	RD835	RD836	RD837	RD838	RD839	RD840	RD841	RD842	RD843	RD844	RD845	RD846	RD847	RD848	RD849	RD850	RD851	RD852	RD853	RD854	RD855	RD856	RD857	RD858	RD859	RD860	RD861	RD862	RD863	RD864	RD865	RD866	RD867	RD868	RD869	RD870	RD871	RD872	RD873	RD874	RD875	RD876	RD877	RD878	RD879	RD880	RD881	RD882	RD883	RD884	RD885	RD886	RD887	RD888	RD889	RD890	RD891	RD892	RD893	RD894	RD895	RD896	RD897	RD898	RD899	RD900	RD901	RD902	RD903	RD904	RD905	RD906	RD907	RD908	RD909	RD910	RD911	RD912	RD913	RD914	RD915	RD916	RD917	RD918	RD919	RD920	RD921	RD922	RD923	RD924	RD925	RD926	RD927	RD928	RD929	RD930	RD931	RD932	RD933	RD934	RD935	RD936	RD937	RD938	RD939	RD940	RD941	RD942	RD943	RD944	RD945	RD946	RD947	RD948	RD949	RD950	RD951	RD952	RD953	RD954	RD955	RD956	RD957	RD958	RD959	RD960	RD961	RD962	RD963	RD964	RD965	RD966	RD967	RD968	RD969	RD970	RD971	RD972	RD973	RD974	RD975	RD976	RD977	RD978	RD979	RD980	RD981	RD982	RD983	RD984	RD985	RD986	RD987	RD988	RD989	RD990	RD991	RD992	RD993	RD994	RD995	RD996	RD997	RD998	RD999	RD1000
--------------	---------	------------	------	------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------



Referencias

1. **Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H. y Bottger, E. C.** (1990) *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1751-9.
- 5 2. **Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S. y Musser, J. M.** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9869-74.
3. **Stead, W. W., Eisenach, K. D., Cave, M. D., Beggs, M. L., Templeton, G. L., Thoen, C. O. y Bates, J. H.** (1995) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1267-8.
- 10 4. **Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3°, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B. G. y col.** (1998) *Nature* **393**, 537-44.
- 15 5. **Gordon, S. V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K. y Cole, S. T.** (1999) *Mol. Microbiol.* **32**, 643-55.
- 20 6. **Behr, M. A., Wilson, M. A., Gill, W. P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S. y Small, P. M.** (1999) *Science* **284**, 1520-3.
7. **Brosch, R., Philipp, W. J., Stavropoulos, E., Colston, M. J., Cole, S. T. y Gordon, S. V.** (1999) *Infect. Immun.* **67**, 5768-74.
- 25 8. **Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W. H., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongam-pim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W., Yakrus, M. A., Musser, J. M. y van Embden, J. D.** (1999) *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2607-18.
- 30 9. **Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D., y Locht, C.** (2001) *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3563-71.
10. **van Soolingen, D., de Haas, P. E. W., Hermans, P. W. M. y van Embden, J. D. A.** (1994) *Methods Enzymol* **235**, 196-205.
- 35 11. **Heym, B., Honore, N., Truffot-Pernot, C., Banerjee, A., Schurra, C., Jacobs, W. R., Jr., van Embden, J. D., Grosset, J. H. y Cole, S. T.** (1994) *Lancet* **344**, 293-8.
12. **Scorpio, A., Collins, D., Whipple, D., Cave, D., Bates, J. y Zhang, Y.** (1997) *J. Clin. Microbiol.* **35**, 106-10.
- 40 13. **Sreevatsan, S., Escalante, P., Pan, X., Gillies, D. A., 2°, Siddiqui, S., Khalaf, C. N., Kreiswirth, B. N., Bifani, P., Adams, L. G., Ficht, T., Perumaalla, V. S., Cave, M. D., van Embden, J. D. y Musser, J. M.** (1996) *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2007-10.
14. **van Embden, J. D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B. A. & Schouls, L. M.** (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 2393-401.
- 45 15. **van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P. E., Hermans, P. W., Koedam, M. A., Teppema, K. S., Brennan, P. J., Besra, G. S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L. M. y van Embden, J. D.** (1997) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1236-45.
- 50 16. **Papa, F., Laszlo, A., David, H. L. y Daffe, M.** (1989) *Acta Leprol* 7 (Supl.) 98-101.
17. **Wells, A. Q.,** (1937) *Lancet* 1221.
- 55 18. **van Soolingen, D., van der Zanden, A. G., de Haas, P. E., Noordhoek, G. T., Kiers, A., Foudraine, N. A., Portaels, F., Kolk, A. H., Kremer, K. y van Embden, J. D.** (1998) *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1840-5.
19. **Brodin, P., et al.** (2002) en preparación
- 60 20. **Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J. C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G. y Dominguez, L.** (1999) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1263-73.
21. **van Soolingen, D., P.E.W. de Haas, J. Haagsma, T. Eger, P.W.M. Hermans, V. Ritacco, A. Alito, y J.D.A van Embden.** (1994) *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2425-33.
- 65 22. **Samper, S., Martin, C., Pinedo, A., Rivero, A., Blazquez, J., Baquero, F., van Soolingen, D. y van Embden, J.** (1997) *Aids* **11**, 1237-42.

23. Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C. y Stover, C. K. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 1274-82.
24. Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Brosch, R., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S. T. y Hewinson, R. G. (2001) *Tuberculosis* **81**, 157-63.
25. Brosch, R., S. V. Gordon, K. Eiglmeier, T. Garnier, F. Tekaia, E. Yeramian, y S. T. Cole. (1999) en Molecular genetics of mycobacteria, eds. Hatful G. F. & Jacobs, W. R. Jr. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.), p. 19-36.
26. Radhakrishnan, I., K. M. Y., Kumar, R. A. y Mundayoor, S. (2001) *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1683.
27. Fletcher, H. A., Donoghue, H. D., Holton, J., Pap, I. y Spigelman, M. (2002) *Am. J. Phys. Anthropol.*, en prensa.
28. Mays, S., Taylor, G. M., Legge, A. J., Young, D. B. y Turner-Walker, G. (2001) *Am. J. Phys. Anthropol.* **114**, 298-311.
29. Nerlich, A. G., Haas, C. J., Zink, A., Szeimies, U. y Hagedorn, H. G. (1997) *Lancet* **350**, 1404.
30. Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J. y Holcomb, T. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2091-4.
31. Rothschild, B. M., Martin, L. D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G. K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M. y Brittain, D. (2001) *Clin. Infect. Dis.* **33**, 305-11.
32. Parsons, L.M., Brosch, R., Cole, S. T., Somoskovi, A., Loder, A., Britzel, G., van Soolingen, D., Hale, Y., y Salfinger, M. (2001) en preparación

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ácido nucleico aislado o purificado, en el que dicho ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- a) SEC ID nº 1;
 - b) un ácido nucleico que tiene una secuencia completamente complementaria a SEC ID nº 1.
- 10 2. Fragmento de ácido nucleico de SEC ID nº 1 según la reivindicación 1, seleccionado de entre el grupo que consiste en:
- a) SEC ID nº 4;
 - 15 b) un ácido nucleico que tiene una secuencia completamente complementaria a SEC ID nº 4;
 - c) un fragmento de ácido nucleico de SEC ID nº 4 que comprende al menos 20 nucleotídicos consecutivos de SEC ID nº 4.
- 20 3. Ácido nucleico aislado o purificado según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico comprende al menos una supresión de un fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 2.
4. Polipéptidos aislados o purificados codificados por el ácido nucleico de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 25 5. Polipéptido según la reivindicación 4, seleccionado de entre el polipéptido con secuencia SEC ID nº 8, Nº10, Nº12 y Nº2.
6. Ácido nucleico aislado o purificado que codifica el polipéptido según la reivindicación 5.
- 30 7. Ácido nucleico aislado o purificado según la reivindicación 6, seleccionado de entre:
- SEC ID nº 7 que codifica el polipéptido de SEC ID nº 8;
 - 35 - SEC ID nº 9 que codifica el polipéptido de SEC ID nº 10;
 - SEC ID nº 11 que codifica el polipéptido de SEC ID nº 12.
- 40 8. Vector recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre ácidos nucleicos según las reivindicaciones 1, 2, 6 y 7.
9. Vector recombinante según la reivindicación 8, que consiste en un vector denominado X229 introducido en la *Escherichia coli* recombinante depositada con el número I-2799 en CNCM el 18 de febrero de 2002.
- 45 10. Célula recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre ácidos nucleicos según las reivindicaciones 1, 2, 6 y 7, y vectores según las reivindicaciones 8 y 9.
11. Célula recombinante según la reivindicación 10, que consiste en la *Escherichia coli* depositada en CNCM el 18 de febrero de 2002 con el número I-2799 .
- 50 12. Método *in vitro* para la detección e identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:
- 55 a) aislar el ADN procedente de la muestra biológica a analizar, o producir un ADNc a partir del ARN de la muestra biológica,
 - b) detectar las secuencias de ácidos nucleicos de la micobacteria presente en dicha muestra biológica,
 - 60 c) analizar la presencia o ausencia de un fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 2.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la detección de las secuencias de ADN micobacteriano se lleva a cabo usando secuencias nucleotídicas complementarias a dichas secuencias de ADN.
- 65 14. Método según la reivindicación 12 ó 13, en el que la detección de las secuencias de ADN micobacteriano se lleva a cabo mediante amplificación de estas secuencias usando cebadores.

15. Método según la reivindicación 12, en el que la detección de las secuencias de ADN micobacteriano se lleva a cabo mediante amplificación de estas secuencias usando cebadores que comprenden 8 a 13 nucleotídeos consecutivos del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 y 6, y seleccionados a fin de amplificar el fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 2.

16. Método según la reivindicación 14 ó 15, en el que los cebadores tienen una secuencia nucleotídica escogida del grupo que comprende SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17 y SEC ID nº 18.

17. Uso de al menos un par de cebadores según la reivindicación 16, para la amplificación de una secuencia de ADN procedente de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium bovis BCG*.

18. Proteína, polipéptido o fragmento polipeptídico que resulta de la expresión de la totalidad o parte del fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 2.

19. Anticuerpo mono- o policlonal, sus fragmentos o anticuerpos quiméricos, **caracterizado** porque son capaces de reconocer específicamente un producto según la reivindicación 18.

20. Kit para la detección discriminativa de la presencia de un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* con supresión de TbD1 según SEC ID nº 4, o de *Mycobacterium tuberculosis* sin supresión de TbD1, o de *Mycobacterium africanum*, o de *Mycobacterium canetti*, o de *Mycobacterium microti*, o de *Mycobacterium bovis* o de *Mycobacterium bovis BCG*, en una muestra biológica, que comprende los siguientes elementos:

- a) un anticuerpo según la reivindicación 19,
- b) los reactivos para constituir el medio adecuado para la reacción inmunológica,
- c) los reactivos que permitan la detección de los complejos de antígeno-anticuerpo producidos por la reacción inmunológica.

21. Kit para la detección de la supresión de TbD1 según SEC ID nº 4 en *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra biológica, que comprende los siguientes elementos:

- a) al menos un par de cebadores que comprenden 8 a 30 nucleótidos consecutivos del polinucleótido según las reivindicaciones 2, 3 y 6,
- b) los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de ADN.

22. Kit según la reivindicación 21, en el que dicho par de cebadores se selecciona de entre los cebadores escogidos del grupo que comprende SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17 y SEC ID nº 18.

23. Uso de la supresión de TbD1 según SEC ID nº 4 como un marcador genético para la diferenciación de la cepa de *Mycobacterium* del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

24. Uso del marcador genético según la reivindicación 23, en asociación con al menos un marcador genético seleccionado de entre RD1, RD2, RD3, RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, Rd11, RD13, RD14, RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5, katG⁴⁶³, gyrA⁹⁵, oxyR²⁸⁵, pncA⁵⁷, para la diferenciación de la cepa de *Mycobacterium* de complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

25. Uso según la reivindicación 24, en el que se seleccionan dos marcadores genéticos RD4 y RD9 para usarlos en asociación con el marcador genético de la reivindicación 24.

26. Uso según la reivindicación 24, en el que el análisis se realiza mediante una técnica seleccionada de entre hibridación de secuencias, amplificación de ácidos nucleicos, complejo de antígeno-anticuerpo.

27. Kit según la reivindicación 21 ó 22, para la detección e identificación de *Mycobacteria* a partir del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra biológica, que comprende además los siguientes elementos:

- b) al menos un par de cebadores específicos para los marcadores genéticos seleccionados de entre RD1, RD2, RD3, RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, Rd11, RD13, RD14, RvD1, RvD2, RvD3, RvD4, RvD5, katG⁴⁶³, gyrA⁹⁵, oxyR²⁸⁵, pncA⁵⁷.

28. Kit según la reivindicación 27, **caracterizado** porque dicho par de cebadores específico de los marcadores genéticos según c) son:

- d) un par de cebadores específicos del marcador genético RD4, y
- e) un par de cebadores específicos del marcador genético RD9.

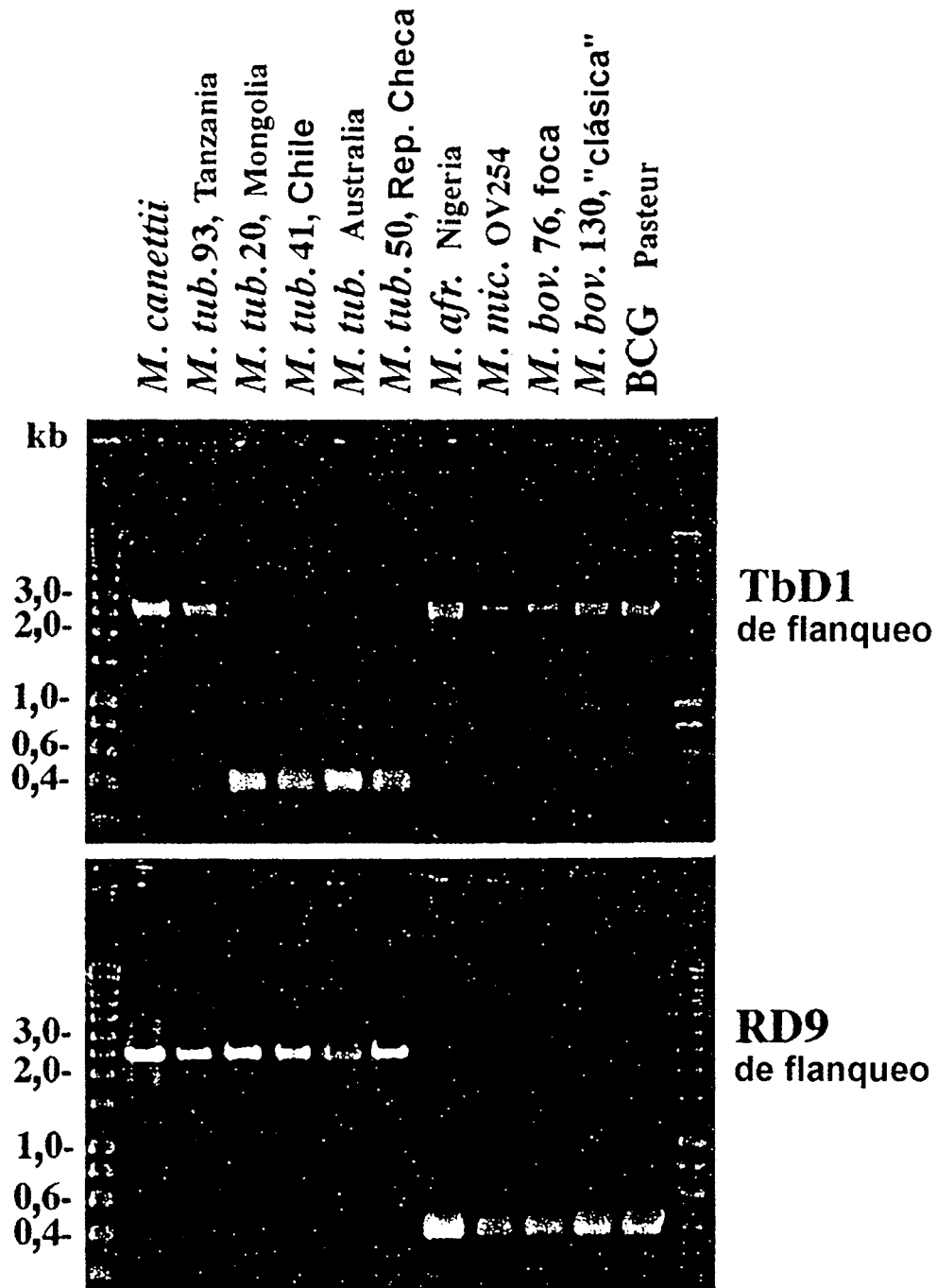


Figura 1

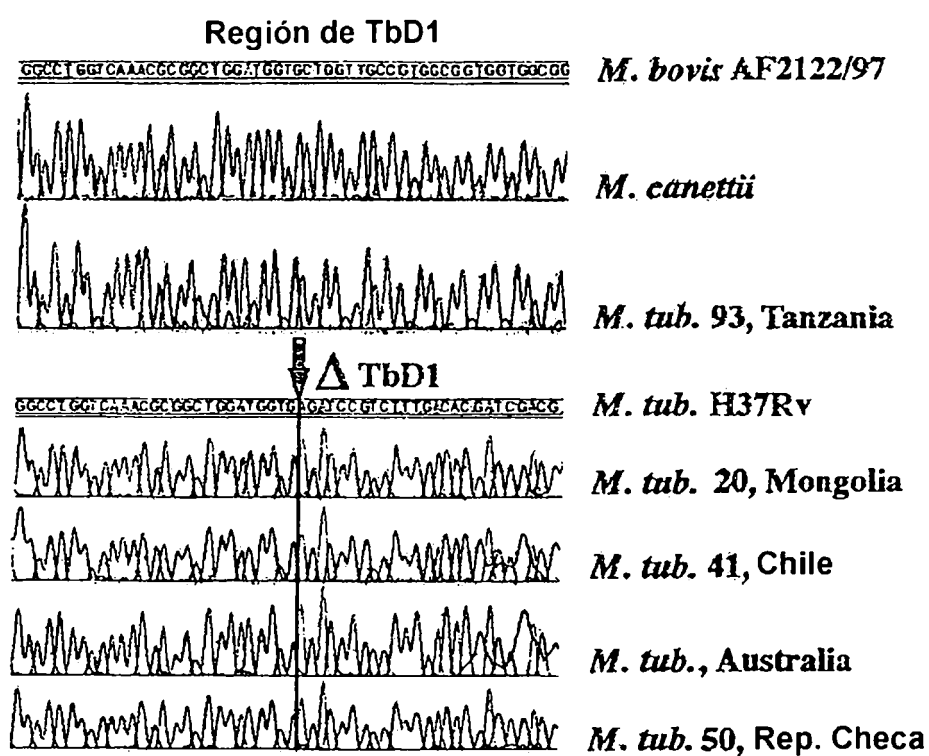


Figura 2

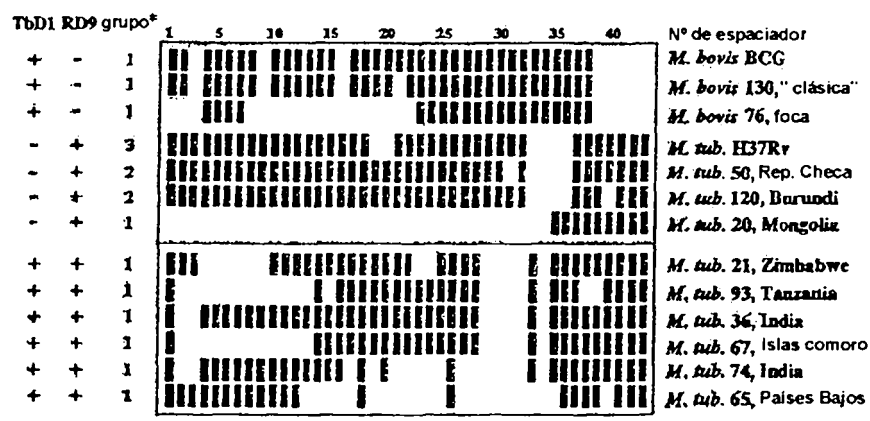


Fig. 1c: Espoligotipos y presencia/ausencia de regiones TbD1 y RD9 de cepas seleccionadas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Los números corresponden a la denominación de la cepa usada en las Ref. 8 y 9.

FIGURA 3

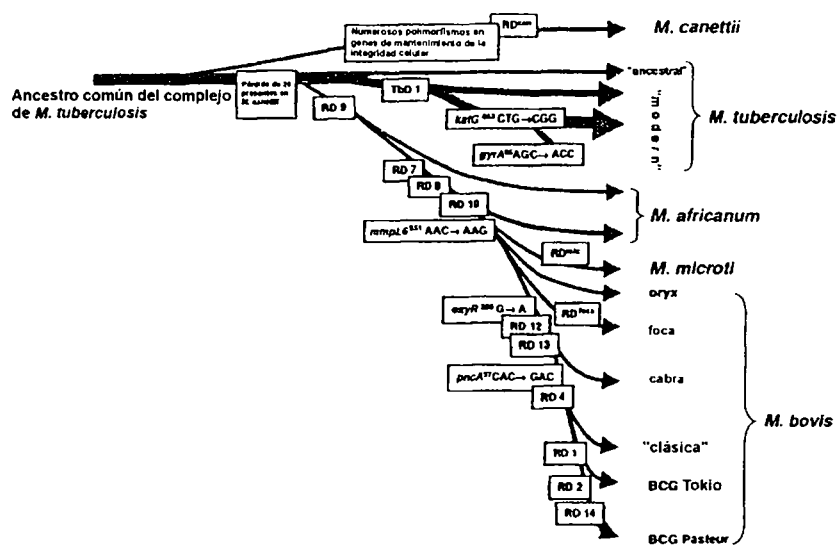


Figura 4

ES 2 286 212 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Institut PASTEUR

5 <120> SECUENCIA SUPRIMIDA EN *M. TUBERCULOSIS*, MÉTODO PARA DETECTAR MICOBACTERIAS USANDO ESTAS SECUENCIAS, Y VACUNAS

<130> D20110

<160> 20

10 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3953

<212> ADN

15 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<221> CDS

20 <222> (735)..(3638)

<400> 1

25 tccagcgcgg ccatcagcga tgaactctgg gacctgctac ccggctacct catcttccgg 60

 tccatcatcc ccaaccggcc gccacccag gacacgggtgc aagccctcgt cgacgacgtg 120

30 atactcccca gcctcaccgg atccaccggt tgagtcagcg gtgcgaatgg ctgggcaccg 180

 ttgtgggtgc cgggtcccgta ccgtactgtt gaatccgcgg atccccgcct gaggtacggg 240

35 gcgtgggtgc gccccgggca atagcgtcgc cggttatcga aaggctaacg ggtgcagggg 300

 atttcagtga ctggcctggt caaacgcggc tggatgggtgc tggttgccgt ggcggtgggtg 360

40 gcggtcgcgg gattcagcgt ctatcggttg cacggcatct tcggctcgca cgacaccacc 420

 tcgaccgccg gtgggtgtgc gaacgacatc aagccgttca accccaaaca ggtaaccctc 480

45 gaggtctttg gcgctcccg aaccgtggca acgatcaatt atctggacgt ggatgccaca 540

 cctcggaag tcctggacac gacctgccc tggtcataca cgatcacgac gacctgccc 600

50 gcggctcttcg ccaatgttgt cgcgcaaggc gacagcaatt ccatcggctg ccgcatcacc 660

 gtcaacgggtg tagtcaagga cgaaaggatc gtcaacgaag tgcgcgccta taccttctgc 720

 ctcgacaagt cctc atg agc aac cac cac cgc ccg cgg cct tgg ttg ccg 770

55 Met Ser Asn His His Arg Pro Arg Pro Trp Leu Pre-

 1 5 10

 cac acc atc cga cgg ctt tgc ttg ccg atc ttg ctg ttt tgg gtg ggt 818

 His Thr Ile Arg Arg Leu Ser Leu Pro Ile Leu Leu Phe Trp Val Gly

 15 20 25

60 gtg gcc gcc ata acc aat gcc gcc gtg ccg caa ttg gag gtg gtc ggg 866

 Val Ala Ala Ile Thr Asn Ala Ala Val Pro Gln Leu Glu Val Val Gly

 30 35 40

65 gag gcg cat aac gtc gca cag agc tcc ccg gat gac ccg tgc ctg cag 914

ES 2 286 212 T3

	Glu	Ala	His	Asn	Val	Ala	Gln	Ser	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	Gln	
	45					50					55					60	
5	gcg	atg	aaa	cgc	atc	ggc	aag	gtg	ttc	cac	gag	ttc	gat	tcc	gac	agt	962
	Ala	Met	Lys	Arg	Ile	Gly	Lys	Val	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	
					65				70						75		
10	gcg	gcc	atg	atc	gtc	ttg	gaa	ggc	gat	aag	ccg	ctc	ggc	aac	gac	gcc	1010
	Ala	Ala	Met	Ile	Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Asn	Asp	Ala	
				80					85					90			
15	cac	cgg	ttc	tac	gac	acc	ctg	ctc	cgc	aac	ctt	tca	aac	gac	acc	aaa	1058
	His	Arg	Phe	Tyr	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Lys	
			95					100					105				
20	cac	gtc	gag	cac	gtt	cag	gac	ttc	tgg	ggc	gat	ccg	ctg	acc	gcg	gcc	1106
	His	Val	Glu	His	Val	Gln	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	
	110					115					120						
25	ggc	tcg	caa	agc	acc	gac	ggc	aaa	gcc	gcc	tac	gtt	cag	gtc	tat	ctc	1154
	Gly	Ser	Gln	Ser	Thr	Asp	Gly	Lys	Ala	Ala	Tyr	Val	Gln	Val	Tyr	Leu	
	125					130					135					140	
30	gcc	ggc	aac	caa	ggc	gag	gcg	ttg	tca	atc	gag	tcc	gtc	gac	gcg	gtg	1202
	Ala	Gly	Asn	Gln	Gly	Glu	Ala	Leu	Ser	Ile	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Val	
				145					150						155		
35	cgc	gac	atc	gtc	gcc	cat	acg	cca	cca	ccg	gcc	ggg	gtc	aag	gcc	tac	1250
	Arg	Asp	Ile	Val	Ala	His	Thr	Pro	Pro	Pro	Ala	Gly	Val	Lys	Ala	Tyr	
				160					165					170			
40	gtc	acc	ggc	gcg	gcc	ccg	ctc	atg	gcc	gat	cag	ttt	cag	gtg	ggc	agc	1298
	Val	Thr	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Met	Ala	Asp	Gln	Phe	Gln	Val	Gly	Ser	
			175					180					185				
45	aaa	gga	acc	gcg	aaa	gtt	acc	ggg	ata	act	ctg	gtt	gtg	atc	gcg	gtg	1346
	Lys	Gly	Thr	Ala	Lys	Val	Thr	Gly	Ile	Thr	Leu	Val	Val	Ile	Ala	Val	
		190				195						200					
50	atg	ttg	ctc	ttc	gta	tac	cgt	tcc	gtc	gtc	acc	atg	gtc	ctg	gtg	ctt	1394
	Met	Leu	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Ser	Val	Val	Thr	Met	Val	Leu	Val	Leu	
	205					210					215					220	
55	atc	acg	gtt	ctt	att	gag	ttg	gcc	gcg	gcc	cgc	ggg	atc	gtc	gct	ttt	1442
	Ile	Thr	Val	Leu	Ile	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	
					225				230					235			
60	ctc	gga	aac	gcc	ggg	gta	atc	ggg	ctg	tcg	aca	tac	tcg	acg	aat	ctg	1490
	Leu	Gly	Asn	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Thr	Tyr	Ser	Thr	Asn	Leu	
				240					245					250		--	
65	ctc	aca	cta	ttg	gta	atc	gcg	gcg	ggc	aca	gac	tac	gcg	att	ttt	gtc	1538
	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ile	Phe	Val	
			255					260					265				
70	ctc	ggc	cgc	tat	cac	gag	gcg	cgc	tac	gcc	gca	cag	gat	cgg	gaa	acg	1586
	Leu	Gly	Arg	Tyr	His	Glu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Ala	Gln	Asp	Arg	Glu	Thr	
		270				275						280					
75	gcc	ttc	tac	acg	atg	tat	cgc	ggg	acc	gcc	cac	gtc	gtc	ttg	ggc	tcg	1634
	Ala	Phe	Tyr	Thr	Met	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	His	Val	Val	Leu	Gly	Ser	

ES 2 286 212 T3

	285		290		295		300	
5	ggt ctg acc gtt gcc ggc gcg gtg tat tgc ctg agc ttt acc cgg cta	1682						
	Gly Leu Thr Val Ala Gly Ala Val Tyr Cys Leu Ser Phe Thr Arg Leu							
		305			310		315	
10	ccc tat ttt caa agc ctg ggt att ccc gcc tcg ata ggg gtg atg att	1730						
	Pro Tyr Phe Gln Ser Leu Gly Ile Pro Ala Ser Ile Gly Val Met Ile							
		320			325		330	
15	gcg ttg gca gcc gcg ctc agc ctg gcc cca tcc gtg ctc atc ttg ggc	1778						
	Ala Leu Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ala Pro Ser Val Leu Ile Leu Gly							
		335			340		345	
20	agt cgt ttc ggt tgt ttc gaa ccc aag cgc agg atg agg acc agg gga	1826						
	Ser Arg Phe Gly Cys Phe Glu Pro Lys Arg Arg Met Arg Thr Arg Gly							
		350			355		360	
25	tgg cgg cgc atc ggc acg gcc atc gtg cgt tgg ccg gga ccc atc ctg	1874						
	Trp Arg Arg Ile Gly Thr Ala Ile Val Arg Trp Pro Gly Pro Ile Leu							
		365			370		375	380
30	gca gtg gcg tgc gca att gcg gtg gtg ggt ctg ctc gcg ctg ccg gga	1922						
	Ala Val Ala Cys Ala Ile Ala Val Val Gly Leu Leu Ala Leu Pro Gly							
		385			390		395	
35	tac aaa acg agc tac gac gct cgc tat tac atg ccc gcc acc gcc ccg	1970						
	Tyr Lys Thr Ser Tyr Asp Ala Arg Tyr Tyr Met Pro Ala Thr Ala Pro							
		400			405		410	
40	gcc aat att ggc tac atg gcc gcg gag cga cat ttt ccc caa gcg cgg	2018						
	Ala Asn Ile Gly Tyr Met Ala Ala Glu Arg His Phe Pro Gln Ala Arg							
		415			420		425	
45	ctg aat ccc gaa cta ctg atg atc gag acg gat cac gat atg cgc aat	2066						
	Leu Asn Pro Glu Leu Leu Met Ile Glu Thr Asp His Asp Met Arg Asn							
		430			435		440	
50	ccg gcc gac atg ctc atc ttg gat agg atc gcc aag gct gtc ttc cat	2114						
	Pro Ala Asp Met Leu Ile Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ala Val Phe His							
		445			450		455	460
55	ctg ccc ggc ata ggg ctg gtg cag gcc atg acc cgg ccg cta gga acc	2162						
	Leu Pro Gly Ile Gly Leu Val Gln Ala Met Thr Arg Pro Leu Gly Thr							
		465			470		475	
60	ccg att gac cac agc tcg ata ccg ttt cag atc agc atg caa agc gtc	2210						
	Pro Ile Asp His Ser Ser Ile Pro Phe Gln Ile Ser Met Gln Ser Val							
		480			485		490	
65	ggc cag att cag aat ctc aag tat cag agg gac cga gca gcc gac ttg	2258						
	Gly Gln Ile Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Arg Asp Arg Ala Ala Asp Leu							
		495			500		505	
70	ctg aag cag gcc gaa gag ctg ggg aag acg atc gaa atc ttg cag cgc	2306						
	Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Gly Lys Thr Ile Glu Ile Leu Gln Arg							
		510			515		520	
75	caa tat gcc cta cag cag gaa ctc gcg gcc gct act cac gag caa gcc	2354						
	Gln Tyr Ala Leu Gln Gln Glu Leu Ala Ala Ala Thr His Glu Gln Ala							
		525			530		535	540

ES 2 286 212 T3

5	gaa agc ttt cac caa acg atc gcc acg gta aac gaa ctg cga gat agg 2402 Glu Ser Phe His Gln Thr Ile Ala Thr Val Asn Glu Leu Arg Asp Arg 545 550 555
10	atc gcc aat ttc gac gat ttc ttc agg ccg att cgt agt tac ttt tac 2450 Ile Ala Asn Phe Asp Asp Phe Phe Arg Pro Ile Arg Ser Tyr Phe Tyr 560 565 570
15	tgg gaa aag cac tgc tac gat atc ccg agc tgc tgg gcg ctg aga tcc 2498 Trp Glu Lys His Cys Tyr Asp Ile Pro Ser Cys Trp Ala Leu Arg Ser 575 580 585
20	gtc ttt gac acg atc gac ggt atc gac caa ctc ggc gag cag ctg gcc 2546 Val Phe Asp Thr Ile Asp Gly Ile Asp Gln Leu Gly Glu Gln Leu Ala 590 595 600
25	agc gtg acc gta acc ttg gac aag ttg gct gcg atc cag cct caa ttg 2594 Ser Val Thr Val Thr Leu Asp Lys Leu Ala Ala Ile Gln Pro Gln Leu 605 610 615 620
30	gtg gcg ctg cta cca gac gag atc gcc agc cag cag atc aat cgg gaa 2642 Val Ala Leu Leu Pro Asp Glu Ile Ala Ser Gln Gln Ile Asn Arg Glu 625 630 635
35	ctg gcg ctg gct aac tac gcc acc atg tcc ggg atc tat gcc cag acg 2690 Leu Ala Leu Ala Asn Tyr Ala Thr Met Ser Gly Ile Tyr Ala Gln Thr 640 645 650
40	gcg gcc ttg atc gaa aac gct gcc gcc atg gga caa gcc ttt gac gcc 2738 Ala Ala Leu Ile Glu Asn Ala Ala Ala Met Gly Gln Ala Phe Asp Ala 655 660 665
45	gcc aag aac gac gac tcc ttc tat ctg ccg ccg gag gct ttt gac aac 2786 Ala Lys Asn Asp Asp Ser Phe Tyr Leu Pro Pro Glu Ala Phe Asp Asn 670 675 680
50	cca gat ttc cag cgc ggc ctg aaa ttg ttc ctg tcg gca gac ggt aag 2834 Pro Asp Phe Gln Arg Gly Leu Lys Leu Phe Leu Ser Ala Asp Gly Lys 685 690 695 700
55	gcg gct cgg atg atc atc tcc cat gaa ggc gat ccc gcc acc ccc gaa 2882 Ala Ala Arg Met Ile Ile Ser His Glu Gly Asp Pro Ala Thr Pro Glu 705 710 715
60	ggc att tcg cat atc gac gcg atc aag cag gcg gcc cac gag gcc gtg 2930 Gly Ile Ser His Ile Asp Ala Ile Lys Gln Ala Ala His Glu Ala Val 720 725 730
65	aag ggc act ccc atg gcg ggt gct ggg atc tat ctg gcc ggc acg gec 2978 Lys Gly Thr Pro Met Ala Gly Ala Gly Ile Tyr Leu Ala Gly Thr Ala 735 740 745
70	gcc acc ttc aag gac att caa gac ggc gcc acc tac gac ctc ctg atc 3026 Ala Thr Phe Lys Asp Ile Gln Asp Gly Ala Thr Tyr Asp Leu Leu Ile 750 755 760
75	gcc gga ata gcc gcg ctg agc ttg att ttg ctc atc atg atg atc att 3074 Ala Gly Ile Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Ile Met Met Ile Ile 765 770 775 780

ES 2 286 212 T3

acc cga agc ctg gtt gcg gcg ctg gtg atc gtg ggc acg gtg gcg ctg 3122
 Thr Arg Ser Leu Val Ala Ala Leu Val Ile Val Gly Thr Val Ala Leu
 785 790 795

5 tcg ttg ggc gct tct ttt ggc ctg tcc gtg ctg gtg tgg cag cat ctt 3170
 Ser Leu Gly Ala Ser Phe Gly Leu Ser Val Leu Val Trp Gln His Leu
 800 805 810

10 ctc ggt atc cag ttg tac tgg atc gtg ctc gcg ctg gcc gtc atc ctg 3218
 Leu Gly Ile Gln Leu Tyr Trp Ile Val Leu Ala Leu Ala Val Ile Leu
 815 820 825

15 ctc ctg gcc gtg gga tgc gac tat aac ttg ctg ctg att tcc cga ttc 3266
 Leu Leu Ala Val Gly Ser Asp Tyr Asn Leu Leu Leu Ile Ser Arg Phe
 830 835 840

20 aag gag gag atc ggt gca ggt ttg aac acc ggc atc atc cgt gcg atg 3314
 Lys Glu Glu Ile Gly Ala Gly Leu Asn Thr Gly Ile Ile Arg Ala Met
 845 850 855 860

25 gcc ggc acc ggc ggg gtg gtg acc gct gcc ggc ctg gtg ttc gcc gcc 3362
 Ala Gly Thr Gly Gly Val Val Thr Ala Ala Gly Leu Val Phe Ala Ala
 865 870 875

30 act atg tct tgc ttc gtg ttc agt gat ttg cgg gtc ctc ggt cag atc 3410
 Thr Met Ser Ser Phe Val Phe Ser Asp Leu Arg Val Leu Gly Gln Ile
 880 885 890

35 ggg acc acc att ggt ctt ggg ctg ctg ttc gac acg ctg gtg gtg cgc 3458
 Gly Thr Thr Ile Gly Leu Gly Leu Leu Phe Asp Thr Leu Val Val Arg
 895 900 905

40 gcg ttc atg acc ccg tcc atc gcg gtg ctg ctc ggg cgc tgg ttc tgg 3506
 Ala Phe Met Thr Pro Ser Ile Ala Val Leu Leu Gly Arg Trp Phe Trp
 910 915 920

45 tgg ccg caa cga gtg cgc ccg cgc cct gcc agc agg atg ctt cgg ccg 3554
 Trp Pro Gln Arg Val Arg Pro Arg Pro Ala Ser Arg Met Leu Arg Pro
 925 930 935 940

50 tac ggc ccg cgg ccc gtg gtt cgt gaa ttg ctg ctg cgc gag ggc aac 3602
 Tyr Gly Pro Arg Pro Val Val Arg Glu Leu Leu Leu Arg Glu Gly Asn
 945 950 955

55 gat gac ccg aga act cag gtg gct acc cac cgt taa ggtggtggga 3648
 Asp Asp Pro Arg Thr Gln Val Ala Thr His Arg
 960 965

tgccgctttc aggggaatat gcgccgagcc cgctcgactg gtcgcgcgag caagccgaca 3708

cgtatatgaa gtccggcgga accgagggca cacagctgca gggaaagccg gtcctcctgc 3768

tcaccaccgt cggggcgaag accggcgaac tccgtaagac cccgctgatg cgcgtcgagc 3828

acgacggcca gtacgcgac gtcgcctcgc tgggtggggc gccgaaaaat ccggtctggt 3888

accacaacgt cgtgaagaac ccacgggtcg agctgcagga cggcaccgga ccggcgacta 3948

cgacg 3953

60 <210> 2
 <211> 967
 <212> PRT
 65 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <220>
 <223> Proteína mmpL6

ES 2 286 212 T3

<400> 2

5	Met	Ser	Asn	His	His	Arg	Pro	Arg	Pro	Trp	Leu	Pro	His	Thr	Ile	Arg	1	5	10	15
	Arg	Leu	Ser	Leu	Pro	Ile	Leu	Leu	Phe	Trp	Val	Gly	Val	Ala	Ala	Ile	20	25	30	
10	Thr	Asn	Ala	Ala	Val	Pro	Gln	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Glu	Ala	His	Asn	35	40	45	
	Val	Ala	Gln	Ser	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	Met	Lys	Arg	50	55	60	
15	Ile	Gly	Lys	Val	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ala	Met	Ile	65	70	75	80
	Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Asn	Asp	Ala	His	Arg	Phe	Tyr	85	90	95	
20	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Lys	His	Val	Glu	His	100	105	110	
	Val	Gln	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser	115	120	125	
25	Thr	Asp	Gly	Lys	Ala	Ala	Tyr	Val	Gln	Val	Tyr	Leu	Ala	Gly	Asn	Gln	130	135	140	
30	Gly	Glu	Ala	Leu	Ser	Ile	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Arg	Asp	Ile	Val	145	150	155	160
	Ala	His	Thr	Pro	Pro	Pro	Ala	Gly	Val	Lys	Ala	Tyr	Val	Thr	Gly	Ala	165	170	175	
35	Ala	Pro	Leu	Met	Ala	Asp	Gln	Phe	Gln	Val	Gly	Ser	Lys	Gly	Thr	Ala	180	185	190	
40	Lys	Val	Thr	Gly	Ile	Thr	Leu	Val	Val	Ile	Ala	Val	Met	Leu	Leu	Phe	195	200	205	
	Val	Tyr	Arg	Ser	Val	Val	Thr	Met	Val	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Val	Leu	210	215	220	
45	Ile	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	Leu	Gly	Asn	Ala	225	230	235	240
	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Thr	Tyr	Ser	Thr	Asn	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	245	250	255	
50	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Gly	Arg	Tyr	260	265	270	
55	His	Glu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Ala	Gln	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Thr				

ES 2 286 212 T3

	275	280	285
5	Met Tyr Arg Gly Thr Ala His Val Val Leu Gly Ser Gly Leu Thr Val 290 295 300		
	Ala Gly Ala Val Tyr Cys Leu Ser Phe Thr Arg Leu Pro Tyr Phe Gln 305 310 315 320		
10	Ser Leu Gly Ile Pro Ala Ser Ile Gly Val Met Ile Ala Leu Ala Ala 325 330 335		
	Ala Leu Ser Leu Ala Pro Ser Val Leu Ile Leu Gly Ser Arg Phe Gly 340 345 350		
15	Cys Phe Glu Pro Lys Arg Arg Met Arg Thr Arg Gly Trp Arg Arg Ile 355 360 365		
	Gly Thr Ala Ile Val Arg Trp Pro Gly Pro Ile Leu Ala Val Ala Cys 370 375 380		
20	Ala Ile Ala Val Val Gly Leu Leu Ala Leu Pro Gly Tyr Lys Thr Ser 385 390 395 400		
	Tyr Asp Ala Arg Tyr Tyr Met Pro Ala Thr Ala Pro Ala Asn Ile Gly 405 410 415		
25	Tyr Met Ala Ala Glu Arg His Phe Pro Gln Ala Arg Leu Asn Pro Glu 420 425 430		
	Leu Leu Met Ile Glu Thr Asp His Asp Met Arg Asn Pro Ala Asp Met 435 440 445		
30	Leu Ile Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ala Val Phe His Leu Pro Gly Ile 450 455 460		
35	Gly Leu Val Gln Ala Met Thr Arg Pro Leu Gly Thr Pro Ile Asp His 465 470 475 480		
40	Ser Ser Ile Pro Phe Gln Ile Ser Met Gln Ser Val Gly Gln Ile Gln 485 490 495		
	Asn Leu Lys Tyr Gln Arg Asp Arg Ala Ala Asp Leu Leu Lys Gln Ala 500 505 510		
45	Glu Glu Leu Gly Lys Thr Ile Glu Ile Leu Gln Arg Gln Tyr Ala Leu 515 520 525		
	Gln Gln Glu Leu Ala Ala Ala Thr His Glu Gln Ala Glu Ser Phe His 530 535 540		
50	Gln Thr Ile Ala Thr Val Asn Glu Leu Arg Asp Arg Ile Ala Asn Phe 545 550 555 560		
55	Asp Asp Phe Phe Arg Pro Ile Arg Ser Tyr Phe Tyr Trp Glu Lys His 565 570 575		
	Cys Tyr Asp Ile Pro Ser Cys Trp Ala Leu Arg Ser Val Phe Asp Thr 580 585 590		
60	Ile Asp Gly Ile Asp Gln Leu Gly Glu Gln Leu Ala Ser Val Thr Val 595 600 605		

ES 2 286 212 T3

	Thr	Leu	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Ile	Gln	Pro	Gln	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	
	610							615				620					
5	Pro	Asp	Glu	Ile	Ala	Ser	Gln	Gln	Ile	Asn	Arg	Glu	Leu	Ala	Leu	Ala	
	625					630				635						640	
	Asn	Tyr	Ala	Thr	Met	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ala	Gln	Thr	Ala	Ala	Leu	Ile	
					645					650					655		
10	Glu	Asn	Ala	Ala	Ala	Met	Gly	Gln	Ala	Phe	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	Asp	
					660				665					670			
	Asp	Ser	Phe	Tyr	Leu	Pro	Pro	Glu	Ala	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Phe	Gln	
15			675					680					685				
	Arg	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Asp	Gly	Lys	Ala	Ala	Arg	Met	
		690						695				700					
20	Ile	Ile	Ser	His	Glu	Gly	Asp	Pro	Ala	Thr	Pro	Glu	Gly	Ile	Ser	His	
	705					710					715					720	
	Ile	Asp	Ala	Ile	Lys	Gln	Ala	Ala	His	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Thr	Pro	
25					725					730					735		
	Met	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Tyr	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Ala	Thr	Phe	Lys	
				740					745					750			
30	Asp	Ile	Gln	Asp	Gly	Ala	Thr	Tyr	Asp	Leu	Leu	Ile	Ala	Gly	Ile	Ala	
			755					760					765				
	Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Ile	Met	Met	Ile	Ile	Thr	Arg	Ser	Leu	
35			770				775					780					
	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Val	Gly	Thr	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Ala	
	785					790					795					800	
	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Trp	Gln	His	Leu	Leu	Gly	Ile	Gln	
40					805					810					815		
	Leu	Tyr	Trp	Ile	Val	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	
				820					825					830			
45	Gly	Ser	Asp	Tyr	Asn	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser	Arg	Phe	Lys	Glu	Glu	Ile	
			835					840					845				
	Gly	Ala	Gly	Leu	Asn	Thr	Gly	Ile	Ile	Arg	Ala	Met	Ala	Gly	Thr	Gly	
50			850				855					860					
	Gly	Val	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Phe	Ala	Ala	Thr	Met	Ser	Ser	
	865					870				875						880	
55	Phe	Val	Phe	Ser	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Gly	Gln	Ile	Gly	Thr	Thr	Ile	
					885					890					895		
	Gly	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Asp	Thr	Leu	Val	Val	Arg	Ala	Phe	Met	Thr	
60				900					905					910			
	Pro	Ser	Ile	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Arg	Trp	Phe	Trp	Trp	Pro	Gln	Arg	
			915					920					925				

65

ES 2 286 212 T3

Val Arg Pro Arg Pro Ala Ser Arg Met Leu Arg Pro Tyr Gly Pro Arg
 930 935 940
 5 Pro Val Val Arg Glu Leu Leu Leu Arg Glu Gly Asn Asp Asp Pro Arg
 945 950 955 960
 Thr Gln Val Ala Thr His Arg
 965
 10
 <210> 3
 <211> 148
 15 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <220>
 20 <223> proteína mmpS6
 <400> 3
 25 Val Gln Gly Ile Ser Val Thr Gly Leu Val Lys Arg Gly Trp Met Val
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Val Ala Val Val Ala Val Ala Gly Phe Ser Val Tyr Arg
 30 20 25 30
 Leu His Gly Ile Phe Gly Ser His Asp Thr Thr Ser Thr Ala Gly Gly
 35 35 40 45
 Val Ala Asn Asp Ile Lys Pro Phe Asn Pro Lys Gln Val Thr Leu Glu
 50 55 60
 Val Phe Gly Ala Pro Gly Thr Val Ala Thr Ile Asn Tyr Leu Asp Val
 40 65 70 75 80
 Asp Ala Thr Pro Arg Gln Val Leu Asp Thr Thr Leu Pro Trp Ser Tyr
 45 85 90 95
 Thr Ile Thr Thr Thr Leu Pro Ala Val Phe Ala Asn Val Val Ala Gln
 100 105 110
 Gly Asp Ser Asn Ser Ile Gly Cys Arg Ile Thr Val Asn Gly Val Val
 50 115 120 125
 Lys Asp Glu Arg Ile Val Asn Glu Val Arg Ala Tyr Thr Phe Cys Leu
 55 130 135 140
 Asp Lys Ser Ser
 145
 60 <210> 4
 <211> 2153
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 65

ES 2 286 212 T3

<400> 4

```

ctgggttgccg tggcggtggt ggcggtcgcg ggattcagcg tctatcggtt gcacggcatc 60
ttcggtcgc acgacaccac ctcgaccgcc ggtggtgtcg cgaacgacat caagccgttc 120
5 aaccccaaac aggtaaccct cgaggctctt ggcgctcccg gaaccgtggc aacgatcaat 180
tatctggacg tggatgccac acctcgga gtcctggaca cgacctgcc gtggtcatac 240

10

acgatcacga cgacctgcc cgcggtcttc gccaatgttg tcgcgcaagg cgacagcaat 300
15 tccatcggct gccgcatcac cgtcaacggg gtagtcaagg acgaaaggat cgtcaacgaa 360
gtgcgcgcct ataccttctg cctcgacaag tctcatgag caaccaccac cgcccgcggc 420
cttgggtgce gcacaccatc cgacggcttt cgttgccgat cttgctgttt tgggtgggtg 480
tggccgccat aaccaatgcc gccgtgccgc aattggaggt ggtcggggag gcgcataacg 540
tcgcacagag ctccccggat gacctgctgc tgcaggcgat gaaacgcac ggcaagggtg 600
20 tccacgagtt cgattccgac agtgcggcca tgatcgtctt ggaaggcgat aagccgctcg 660
gcaacgacgc ccaccggttc tacgacacce tgctccgcaa cctttcaaac gacaccaaac 720
acgtcgagca cgttcaggac ttctggggcg atccgctgac cgcggccggc tcgcaaagca 780
ccgacggcaa agccgcctac gttcagggtc atctcgccgg caaccaaggc gaggcgttgt 840
25 caatcgagtc cgtcgacgcg gtgcgcgaca tcgtcgcca tacgccacca ccggccgggg 900
tcaaggccta cgtcaccggc gcggcccccgc tcatggccga tcagtttcag gtgggcagca 960
aaggaaccgc gaaagttacc gggataactc tgggtgtgat cgcggtgatg ttgctcttcg 1020
tataccgttc cgtcgtcacc atggctcttg tgcttatcac ggttcttatt gagttggccg 1080
30 cggcccgcgg gatcgtcgtc ttctcggaa acgcccgggt aatcgggctg tcgacatact 1140
cgacgaatct gctcacacta ttggtaatcg cggcgggcac agactacgag atttttgtcc 1200
tcggccgcta tcacgaggcg cgtacgccc cacaggatcg ggaaacggcc ttctacacga 1260
tgtatcgcgg gaccgcccac gtctcttgg gctcgggtct gaccgttgcc ggcgcggtgt 1320
35 attgcctgag ctttaccggc ctaccctatt ttcaaagcct gggatttccc gcctcgatag 1380
gggtgatgat tgcgttgga gccgcgtca gctggcccc atccgtgctc atcttgggca 1440
gtcgtttcgg ttgtttcgaa cccaagcgca ggatgaggac caggggatgg cggcgcatcg 1500
gcacggccat cgtgcgttg ccgggaccca tctggcagt ggcgtgcgca attgcggtgg 1560
40 tgggtctgct cgcgctgcc ggatacaaaa cgagctacga cgtcgtctat tacatgcccg 1620
ccaccgcccc ggccaatatt ggctacatgg ccgcggagcg acattttccc caagcgcggc 1680
tgaatcccga actactgatg atcgagacgg atcacgatat gcgcaatccg gccgacatgc 1740
tcattcttga taggatcgcc aaggctgtct tccatctgcc cggcataggg ctggtgcagg 1800
45 ccatgaccgg gccgctagga accccgattg accacagctc gataccgttt cagatcagca 1860
tgcaaagcgt cggccagatt cagaatctca agtatcagag ggaccgagca gccgacttgc 1920
tgaagcaggc cgaagagctg gggaagacga tcgaaatctt gcagcgccaa tatgccctac 1980
agcaggaact cgcggccgct actcacgagc aagccgaaag ctttcaccaa acgatcgcca 2040
50 cggtaaacga actgcgagat aggatcgcca atttcgacga tttcttcagg ccgattcgta 2100
gttactttta ctgggaaaag cactgctacg atatcccag cgtctgggcg ctg 2153

```

<210> 5

<211> 2904

55 <212> ADN

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

60 <223> secuencia de mmpL6 y proteína

<220>

65 <221> CDS

<222> (1)..(2901)

ES 2 286 212 T3

<400> 5

	atg agc aac cac cac cgc ccg cgg cct tgg ttg ccg cac acc atc cga	48
	Met Ser Asn His His Arg Pro Arg Pro Trp Leu Pro His Thr Ile Arg	
5	1 5 10 15	
	cgg ctt tcg ttg ccg atc ttg ctg ttt tgg gtg ggt gtg gcc gcc ata	96
	Arg Leu Ser Leu Pro Ile Leu Leu Phe Trp Val Gly Val Ala Ala Ile	
10	20 25 30	
	acc aat gcc gcc gtg ccg caa ttg gag gtg gtc ggg gag gcg cat aac	144
	Thr Asn Ala Ala Val Pro Gln Leu Glu Val Val Gly Glu Ala His Asn	
15	35 40 45	
	gtc gca cag agc tcc ccg gat gac ccg tcg ctg cag gcg atg aaa cgc	192
	Val Ala Gln Ser Ser Pro Asp Asp Pro Ser Leu Gln Ala Met Lys Arg	
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 286 212 T3

	50	55	60	
5	atc ggc aag gtg ttc cac gag ttc gat tcc gac agt gcg gcc atg atc Ile Gly Lys Val Phe His Glu Phe Asp Ser Asp Ser Ala Ala Met Ile 65 70 75 80	240		
10	gtc ttg gaa ggc gat aag ccg ctc ggc aac gac gcc cac cgg ttc tac Val Leu Glu Gly Asp Lys Pro Leu Gly Asn Asp Ala His Arg Phe Tyr 85 90 95	288		
15	gac acc ctg ctc cgc aac ctt tca aac gac acc aaa cac gtc gag cac Asp Thr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asn Asp Thr Lys His Val Glu His 100 105 110	336		
20	gtt cag gac ttc tgg ggc gat ccg ctg acc gcg gcc ggc tcg caa agc Val Gln Asp Phe Trp Gly Asp Pro Leu Thr Ala Ala Gly Ser Gln Ser 115 120 125	384		
25	acc gac ggc aaa gcc gcc tac gtt cag gtc tat ctc gcc ggc aac caa Thr Asp Gly Lys Ala Ala Tyr Val Gln Val Tyr Leu Ala Gly Asn Gln 130 135 140	432		
30	ggc gag gcg ttg tca atc gag tcc gtc gac gcg gtg cgc gac atc gtc Gly Glu Ala Leu Ser Ile Glu Ser Val Asp Ala Val Arg Asp Ile Val 145 150 155 160	480		
35	gcc cat acg cca cca ccg gcc ggg gtc aag gcc tac gtc acc ggc gcg Ala His Thr Pro Pro Pro Ala Gly Val Lys Ala Tyr Val Thr Gly Ala 165 170 175	528		
40	gcc ccg ctc atg gcc gat cag ttt cag gtg ggc agc aaa gga acc gcg Ala Pro Leu Met Ala Asp Gln Phe Gln Val Gly Ser Lys Gly Thr Ala 180 185 190	576		
45	aaa gtt acc ggg ata act ctg gtt gtg atc gcg gtg atg ttg ctc ttc Lys Val Thr Gly Ile Thr Leu Val Val Ile Ala Val Met Leu Leu Phe 195 200 205	624		
50	gta tac cgt tcc gtc gtc acc atg gtc ctg gtg ctt atc acg gtt ctt Val Tyr Arg Ser Val Val Thr Met Val Leu Val Leu Ile Thr Val Leu 210 215 220	672		
55	att gag ttg gcc gcg gcc ccg ggg atc gtc gct ttt ctc gga aac gcc Ile Glu Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ile Val Ala Phe Leu Gly Asn Ala 225 230 235 240	720		
60	ggg gta atc ggg ctg tcg aca tac tcg acg aat ctg ctc aca cta ttg Gly Val Ile Gly Leu Ser Thr Tyr Ser Thr Asn Leu Leu Thr Leu Leu 245 250 255	768		
65	gta atc gcg gcg ggc aca gac tac gcg att ttt gtc ctc ggc cgc tat Val Ile Ala Ala Gly Thr Asp Tyr Ala Ile Phe Val Leu Gly Arg Tyr 260 265 270	816		
	cac gag gcg cgc tac gcc gca cag gat ccg gaa acg gcc ttc tac acg His Glu Ala Arg Tyr Ala Ala Gln Asp Arg Glu Thr Ala Phe Tyr Thr 275 280 285	864		
	atg tat cgc ggg acc gcc cac gtc gtc ttg ggc tcg ggt ctg acc gtt Met Tyr Arg Gly Thr Ala His Val Val Leu Gly Ser Gly Leu Thr Val 912			

ES 2 286 212 T3

	290	295	300	
5	gcc ggc gcg gtg tat tgc ctg agc ttt acc cgg cta ccc tat ttt caa 960 Ala Gly Ala Val Tyr Cys Leu Ser Phe Thr Arg Leu Pro Tyr Phe Gln 305 310 315 320			
10	agc ctg ggt att ccc gcc tcg ata ggg gtg atg att gcg ttg gca gcc 1008 Ser Leu Gly Ile Pro Ala Ser Ile Gly Val Met Ile Ala Leu Ala Ala 325 330 335			
15	gcg ctc agc ctg gcc cca tcc gtg ctc atc ttg ggc agt cgt ttc ggt 1056 Ala Leu Ser Leu Ala Pro Ser Val Leu Ile Leu Gly Ser Arg Phe Gly 340 345 350			
20	tgt ttc gaa ccc aag cgc agg atg agg acc agg gga tgg cgg cgc atc 1104 Cys Phe Glu Pro Lys Arg Arg Met Arg Thr Arg Gly Trp Arg Arg Ile 355 360 365			
25	ggc acg gcc atc gtg cgt tgg ccg gga ccc atc ctg gca gtg gcg tgc 1152 Gly Thr Ala Ile Val Arg Trp Pro Gly Pro Ile Leu Ala Val Ala Cys 370 375 380			
30	gca att gcg gtg gtg ggt ctg ctc gcg ctg ccg gga tac aaa acg agc 1200 Ala Ile Ala Val Val Gly Leu Leu Ala Leu Pro Gly Tyr Lys Thr Ser 385 390 395 400			
35	tac gac gct cgc tat tac atg ccc gcc acc gcc ccg gcc aat att ggc 1248 Tyr Asp Ala Arg Tyr Tyr Met Pro Ala Thr Ala Pro Ala Asn Ile Gly 405 410 415			
40	tac atg gcc gcg gag cga cat ttt ccc caa gcg cgg ctg aat ccc gaa 1296 Tyr Met Ala Ala Glu Arg His Phe Pro Gln Ala Arg Leu Asn Pro Glu 420 425 430			
45	cta ctg atg atc gag acg gat cac gat atg cgc aat ccg gcc gac atg 1344 Leu Leu Met Ile Glu Thr Asp His Asp Met Arg Asn Pro Ala Asp Met 435 440 445			
50	ctc atc ttg gat agg atc gcc aag gct gtc ttc cat ctg ccc ggc ata 1392 Leu Ile Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ala Val Phe His Leu Pro Gly Ile 450 455 460			
55	ggg ctg gtg cag gcc atg acc cgg ccg cta gga acc ccg att gac cac 1440 Gly Leu Val Gln Ala Met Thr Arg Pro Leu Gly Thr Pro Ile Asp His 465 470 475 480			
60	agc tcg ata ccg ttt cag atc agc atg caa agc gtc ggc cag att cag 1488 Ser Ser Ile Pro Phe Gln Ile Ser Met Gln Ser Val Gly Gln Ile Gln 485 490 495			
65	aat ctc aag tat cag agg gac cga gca gcc gac ttg ctg aag cag gcc 1536 Asn Leu Lys Tyr Gln Arg Asp Arg Ala Ala Asp Leu Leu Lys Gln Ala 500 505 510			
	gaa gag ctg ggg aag acg atc gaa atc ttg cag cgc caa tat gcc cta 1584 Glu Glu Leu Gly Lys Thr Ile Glu Ile Leu Gln Arg Gln Tyr Ala Leu 515 520 525			
	cag cag gaa ctc gcg gcc gct act cac gag caa gcc gaa agc ttt cac 1632 Gln Gln Glu Leu Ala Ala Ala Thr His Glu Gln Ala Glu Ser Phe His			

ES 2 286 212 T3

	530	535	540	
5	caa acg atc gcc acg gta aag gaa ctg cga gat agg atc gcc aat ttc Gln Thr Ile Ala Thr Val Lys Glu Leu Arg Asp Arg Ile Ala Asn Phe 545 550 555 560	1680		
10	gac gat ttc ttc agg ccg att cgt agt tac ttt tac tgg gaa aag cac Asp Asp Phe Phe Arg Pro Ile Arg Ser Tyr Phe Tyr Trp Glu Lys His 565 570 575	1728		
15	tgc tac gat atc ccg agc tgc tgg gcg ctg aga tcc gtc ttt gac acg Cys Tyr Asp Ile Pro Ser Cys Trp Ala Leu Arg Ser Val Phe Asp Thr 580 585 590	1776		
20	atc gac ggt atc gac caa ctc ggc gag cag ctg gcc agc gtg acc gta Ile Asp Gly Ile Asp Gln Leu Gly Glu Gln Leu Ala Ser Val Thr Val 595 600 605	1824		
25	acc ttg gac aag ttg gct gcg atc cag cct caa ttg gtg gcg ctg cta Thr Leu Asp Lys Leu Ala Ile Gln Pro Gln Leu Val Ala Leu Leu 610 615 620	1872		
30	cca gac gag atc gcc agc cag cag atc aat cgg gaa ctg gcg ctg gct Pro Asp Glu Ile Ala Ser Gln Gln Ile Asn Arg Glu Leu Ala Leu Ala 625 630 635 640	1920		
35	aac tac gcc acc atg tcc ggg atc tat gcc cag acg gcg gcc ttg atc Asn Tyr Ala Thr Met Ser Gly Ile Tyr Ala Gln Thr Ala Ala Leu Ile 645 650 655	1968		
40	gaa aac gct gcc gcc atg gga caa gcc ttt gac gcc gcc aag aac gac Glu Asn Ala Ala Ala Met Gly Gln Ala Phe Asp Ala Ala Lys Asn Asp 660 665 670	2016		
45	gac tcc ttc tat ctg ccg ccg gag gct ttt gac aac cca gat ttc cag Asp Ser Phe Tyr Leu Pro Pro Glu Ala Phe Asp Asn Pro Asp Phe Gln 675 680 685	2064		
50	cgc ggc ctg aaa ttg ttc ctg tgc gca gac ggt aag gcg gct cgg atg Arg Gly Leu Lys Leu Phe Leu Ser Ala Asp Gly Lys Ala Ala Arg Met 690 695 700	2112		
55	atc atc tcc cat gaa ggc gat ccc gcc acc ccc gaa ggc att tcg cat Ile Ile Ser His Glu Gly Asp Pro Ala Thr Pro Glu Gly Ile Ser His 705 710 715 720	2160		
60	atc gac gcg atc aag cag gcg gcc cac gag gcc gtg aag ggc act ccc Ile Asp Ala Ile Lys Gln Ala Ala His Glu Ala Val Lys Gly Thr Pro 725 730 735	2208		
65	atg gcg ggt gct ggg atc tat ctg gcc ggc acg gcc gcc acc ttc aag Met Ala Gly Ala Gly Ile Tyr Leu Ala Gly Thr Ala Ala Thr Phe Lys 740 745 750	2256		
	gac att caa gac ggc gcc acc tac gac ctc ctg atc gcc gga ata gcc Asp Ile Gln Asp Gly Ala Thr Tyr Asp Leu Leu Ile Ala Gly Ile Ala 755 760 765	2304		
	gcg ctg agc ttg att ttg ctc atc atg atg atc att acc cga agc ctg Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Ile Met Met Ile Ile Thr Arg Ser Leu 770 775 780	2352		

ES 2 286 212 T3

	gtt gcg gcg ctg gtg atc gtg ggc acg gtg gcg ctg tcg ttg ggc gct	2400
	Val Ala Ala Leu Val Ile Val Gly Thr Val Ala Leu Ser Leu Gly Ala	
	785 790 795 800	
5	tct ttt ggc ctg tcc gtg ctg gtg tgg cag cat ctt ctc ggt atc cag	2448
	Ser Phe Gly Leu Ser Val Leu Val Trp Gln His Leu Leu Gly Ile Gln	
	805 810 815	
10	ttg tac tgg atc gtg ctc gcg ctg gcc gtc atc ctg ctc ctg gcc gtg	2496
	Leu Tyr Trp Ile Val Leu Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Leu Ala Val	
	820 825 830	
15	gga tcg gac tat aac ttg ctg ctg att tcc cga ttc aag gag gag atc	2544
	Gly Ser Asp Tyr Asn Leu Leu Leu Ile Ser Arg Phe Lys Glu Glu Ile	
	835 840 845	
20	ggt gca ggt ttg aac acc ggc atc atc cgt gcg atg gcc ggc acc ggc	2592
	Gly Ala Gly Leu Asn Thr Gly Ile Ile Arg Ala Met Ala Gly Thr Gly	
	850 855 860	
25	ggg gtg gtg acc gct gcc ggc ctg gtg ttc gcc gcc act atg tct tcg	2640
	Gly Val Val Thr Ala Ala Gly Leu Val Phe Ala Ala Thr Met Ser Ser	
	865 870 875 880	
30	ttc gtg ttc agt gat ttg cgg gtc ctc ggt cag atc ggg acc acc att	2688
	Phe Val Phe Ser Asp Leu Arg Val Leu Gly Gln Ile Gly Thr Thr Ile	
	885 890 895	
35	ggt ctt ggg ctg ctg ttc gac acg ctg gtg gtg cgc gcg ttc atg acc	2736
	Gly Leu Gly Leu Leu Phe Asp Thr Leu Val Val Arg Ala Phe Met Thr	
	900 905 910	
40	ccg tcc atc gcg gtg ctg ctc ggg cgc tgg ttc tgg tgg ccg caa cga	2784
	Pro Ser Ile Ala Val Leu Leu Gly Arg Trp Phe Trp Trp Pro Gln Arg	
	915 920 925	
45	gtg cgc ccg cgc cct gcc agc agg atg ctt cgg ccg tac ggc ccg cgg	2832
	Val Arg Pro Arg Pro Ala Ser Arg Met Leu Arg Pro Tyr Gly Pro Arg	
	930 935 940	
50	ccc gtg gtt cgt gaa ttg ctg ctg cgc gag ggc aac gat gac ccg aga	2880
	Pro Val Val Arg Glu Leu Leu Leu Arg Glu Gly Asn Asp Asp Pro Arg	
	945 950 955 960	
55	act cag gtg gct acc cac cgt taa	2904
	Thr Gln Val Ala Thr His Arg	
	965	

- 55 <210> 6
 <211> 967
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 60 <220>
 <223> secuencia de mmpL6 y proteína

65

ES 2 286 212 T3

<400> 6

5	Met	Ser	Asn	His	His	Arg	Pro	Arg	Pro	Trp	Leu	Pro	His	Thr	Ile	Arg	1	5	10	15
	Arg	Leu	Ser	Leu	Pro	Ile	Leu	Leu	Phe	Trp	Val	Gly	Val	Ala	Ala	Ile	20	25	30	
10	Thr	Asn	Ala	Ala	Val	Pro	Gln	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Glu	Ala	His	Asn	35	40	45	
	Val	Ala	Gln	Ser	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	Met	Lys	Arg	50	55	60	
15	Ile	Gly	Lys	Val	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ala	Met	Ile	65	70	75	80
20	Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Asn	Asp	Ala	His	Arg	Phe	Tyr	85	90	95	
	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Lys	His	Val	Glu	His	100	105	110	
25	Val	Gln	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser	115	120	125	
30	Thr	Asp	Gly	Lys	Ala	Ala	Tyr	Val	Gln	Val	Tyr	Leu	Ala	Gly	Asn	Gln	130	135	140	
	Gly	Glu	Ala	Leu	Ser	Ile	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Arg	Asp	Ile	Val	145	150	155	160
35	Ala	His	Thr	Pro	Pro	Pro	Ala	Gly	Val	Lys	Ala	Tyr	Val	Thr	Gly	Ala	165	170	175	
40	Ala	Pro	Leu	Met	Ala	Asp	Gln	Phe	Gln	Val	Gly	Ser	Lys	Gly	Thr	Ala	180	185	190	
	Lys	Val	Thr	Gly	Ile	Thr	Leu	Val	Val	Ile	Ala	Val	Met	Leu	Leu	Phe	195	200	205	
45	Val	Tyr	Arg	Ser	Val	Val	Thr	Met	Val	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Val	Leu	210	215	220	
	Ile	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	Leu	Gly	Asn	Ala	225	230	235	240
50	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Thr	Tyr	Ser	Thr	Asn	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	245	250	255	
55	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Gly	Arg	Tyr	260	265	270	
	His	Glu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Ala	Gln	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Thr	275	280	285	
60	Met	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	His	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Val	290	295	300	
65	Ala	Gly	Ala	Val	Tyr	Cys	Leu	Ser	Phe	Thr	Arg	Leu	Pro	Tyr	Phe	Gln	305	310	315	320
	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Ile	Gly	Val	Met	Ile	Ala	Leu	Ala	Ala				

ES 2 286 212 T3

	325								330				335				
5	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Pro	Ser	Val	Leu	Ile	Leu	Gly	Ser	Arg	Phe	Gly	
				340					345					350			
	Cys	Phe	Glu	Pro	Lys	Arg	Arg	Met	Arg	Thr	Arg	Gly	Trp	Arg	Arg	Ile	
			355					360					365				
10	Gly	Thr	Ala	Ile	Val	Arg	Trp	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Cys	
		370					375					380					
15	Ala	Ile	Ala	Val	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	Tyr	Lys	Thr	Ser	
	385					390					395					400	
	Tyr	Asp	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Met	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Ala	Asn	Ile	Gly	
					405				410						415		
20	Tyr	Met	Ala	Ala	Glu	Arg	His	Phe	Pro	Gln	Ala	Arg	Leu	Asn	Pro	Glu	
				420					425					430			
25	Leu	Leu	Met	Ile	Glu	Thr	Asp	His	Asp	Met	Arg	Asn	Pro	Ala	Asp	Met	
			435					440					445				
	Leu	Ile	Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Lys	Ala	Val	Phe	His	Leu	Pro	Gly	Ile	
		450					455					460					
30	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Met	Thr	Arg	Pro	Leu	Gly	Thr	Pro	Ile	Asp	His	
	465					470					475				480		
	Ser	Ser	Ile	Pro	Phe	Gln	Ile	Ser	Met	Gln	Ser	Val	Gly	Gln	Ile	Gln	
					485				490						495		
35	Asn	Leu	Lys	Tyr	Gln	Arg	Asp	Arg	Ala	Ala	Asp	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	
				500					505					510			
40	Glu	Glu	Leu	Gly	Lys	Thr	Ile	Glu	Ile	Leu	Gln	Arg	Gln	Tyr	Ala	Leu	
			515					520					525				
	Gln	Gln	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	His	Glu	Gln	Ala	Glu	Ser	Phe	His	
			530				535					540					
45	Gln	Thr	Ile	Ala	Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Arg	Asp	Arg	Ile	Ala	Asn	Phe	
	545					550				555					560		
	Asp	Asp	Phe	Phe	Arg	Pro	Ile	Arg	Ser	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Glu	Lys	His	
					565				570						575		
50	Cys	Tyr	Asp	Ile	Pro	Ser	Cys	Trp	Ala	Leu	Arg	Ser	Val	Phe	Asp	Thr	
				580					585					590			
55	Ile	Asp	Gly	Ile	Asp	Gln	Leu	Gly	Glu	Gln	Leu	Ala	Ser	Val	Thr	Val	
		595						600					605				
	Thr	Leu	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Ile	Gln	Pro	Gln	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	
		610					615					620					
60	Pro	Asp	Glu	Ile	Ala	Ser	Gln	Gln	Ile	Asn	Arg	Glu	Leu	Ala	Leu	Ala	
	625					630				635					640		
65	Asn	Tyr	Ala	Thr	Met	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ala	Gln	Thr	Ala	Ala	Leu	Ile	
				645					650						655		

ES 2 286 212 T3

	Glu	Asn	Ala	Ala	Ala	Met	Gly	Gln	Ala	Phe	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	Asp	
				660					665					670			
5	Asp	Ser	Phe	Tyr	Leu	Pro	Pro	Glu	Ala	Phe	Asp	Asn	Pro	Asp	Phe	Gln	
			675					680					685				
	Arg	Gly	Leu	Lys	Leu	Phe	Leu	Ser	Ala	Asp	Gly	Lys	Ala	Ala	Arg	Met	
		690					695					700					
10	Ile	Ile	Ser	His	Glu	Gly	Asp	Pro	Ala	Thr	Pro	Glu	Gly	Ile	Ser	His	
	705					710					715					720	
	Ile	Asp	Ala	Ile	Lys	Gln	Ala	Ala	His	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Thr	Pro	
15					725					730					735		
	Met	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Tyr	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Ala	Thr	Phe	Lys	
				740					745					750			
20	Asp	Ile	Gln	Asp	Gly	Ala	Thr	Tyr	Asp	Leu	Leu	Ile	Ala	Gly	Ile	Ala	
			755					760					765				
	Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Ile	Met	Met	Ile	Ile	Thr	Arg	Ser	Leu	
25			770				775					780					
	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Val	Gly	Thr	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Ala	
	785					790					795					800	
	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Trp	Gln	His	Leu	Leu	Gly	Ile	Gln	
30					805					810					815		
	Leu	Tyr	Trp	Ile	Val	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	
				820					825					830			
35	Gly	Ser	Asp	Tyr	Asn	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser	Arg	Phe	Lys	Glu	Glu	Ile	
			835					840					845				
	Gly	Ala	Gly	Leu	Asn	Thr	Gly	Ile	Ile	Arg	Ala	Met	Ala	Gly	Thr	Gly	
40			850				855					860					
	Gly	Val	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Phe	Ala	Ala	Thr	Met	Ser	Ser	
	865					870				875					880		
45	Phe	Val	Phe	Ser	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Gly	Gln	Ile	Gly	Thr	Thr	Ile	
					885					890					895		
	Gly	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Asp	Thr	Leu	Val	Val	Arg	Ala	Phe	Met	Thr	
				900					905					910			
50	Pro	Ser	Ile	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Arg	Trp	Phe	Trp	Trp	Pro	Gln	Arg	
			915					920					925				
	Val	Arg	Pro	Arg	Pro	Ala	Ser	Arg	Met	Leu	Arg	Pro	Tyr	Gly	Pro	Arg	
55			930				935					940					
	Pro	Val	Val	Arg	Glu	Leu	Leu	Leu	Arg	Glu	Gly	Asn	Asp	Asp	Pro	Arg	
	945					950				955						960	
60	Thr	Gln	Val	Ala	Thr	His	Arg										
					965												

<210> 7

<211> 1758

<212> ADN

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

ES 2 286 212 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1758)

5 <220>

<223> secuencia truncada de mmpL6 y proteína

<400> 7

10	atg agc aac cac cac cgc ccg cgg cct tgg ttg ccg cac acc atc cga	48
	Met Ser Asn His His Arg Pro Arg Pro Trp Leu Pro His Thr Ile Arg	
	1 5 10 15	
15	cgg ctt tcg ttg ccg atc ttg ctg ttt tgg gtg ggt gtg gcc gcc ata	96
	Arg Leu Ser Leu Pro Ile Leu Leu Phe Trp Val Gly Val Ala Ala Ile	
	20 25 30	
20	acc aat gcc gcc gtg ccg caa ttg gag gtg gtc ggg gag gcg cat aac	144
	Thr Asn Ala Ala Val Pro Gln Leu Glu Val Val Gly Glu Ala His Asn	
	35 40 45	
25	gtc gca cag agc tcc ccg gat gac ccg tcg ctg cag gcg atg aaa cgc	192
	Val Ala Gln Ser Ser Pro Asp Asp Pro Ser Leu Gln Ala Met Lys Arg	
	50 55 60	
30	atc ggc aag gtg ttc cac gag ttc gat tcc gac agt gcg gcc atg atc	240
	Ile Gly Lys Val Phe His Glu Phe Asp Ser Asp Ser Ala Ala Met Ile	
	65 70 75 80	
35	gtc ttg gaa ggc gat aag ccg ctc ggc aac gac gcc cac cgg ttc tac	288
	Val Leu Glu Gly Asp Lys Pro Leu Gly Asn Asp Ala His Arg Phe Tyr	
	85 90 95	
40	gac acc ctg ctc cgc aac ctt tca aac gac acc aaa cac gtc gag cac	336
	Asp Thr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asn Asp Thr Lys His Val Glu His	
	100 105 110	
45	gtt cag gac ttc tgg ggc gat ccg ctg acc gcg gcc ggc tcg caa agc	384
	Val Gln Asp Phe Trp Gly Asp Pro Leu Thr Ala Ala Gly Ser Gln Ser	
	115 120 125	
50	acc gac ggc aaa gcc gcc tac gtt cag gtc tat ctc gcc ggc aac caa	432
	Thr Asp Gly Lys Ala Ala Tyr Val Gln Val Tyr Leu Ala Gly Asn Gln	
	130 135 140	
55	ggc gag gcg ttg tca atc gag tcc gtc gac gcg gtg cgc gac atc gtc	480
	Gly Glu Ala Leu Ser Ile Glu Ser Val Asp Ala Val Arg Asp Ile Val	
	145 150 155 160	
60	gcc cat acg cca cca ccg gcc ggg gtc aag gcc tac gtc acc ggc gcg	528
	Ala His Thr Pro Pro Pro Ala Gly Val Lys Ala Tyr Val Thr Gly Ala	
	165 170 175	
65	gcc ccg ctc atg gcc gat cag ttt cag gtg ggc agc aaa gga acc gcg	576

ES 2 286 212 T3

	Ala	Pro	Leu	Met	Ala	Asp	Gln	Phe	Gln	Val	Gly	Ser	Lys	Gly	Thr	Ala	
				180					185					190			
5	aaa	gtt	acc	ggg	ata	act	ctg	gtt	gtg	atc	gcg	gtg	atg	ttg	ctc	ttc	624
	Lys	Val	Thr	Gly	Ile	Thr	Leu	Val	Val	Ile	Ala	Val	Met	Leu	Leu	Phe	
			195					200					205				
10	gta	tac	cgt	tcc	gtc	gtc	acc	atg	gtc	ctg	gtg	ctt	atc	acg	gtt	ctt	672
	Val	Tyr	Arg	Ser	Val	Val	Thr	Met	Val	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Val	Leu	
			210				215					220					
15	att	gag	ttg	gcc	gcg	gcc	cgc	ggg	atc	gtc	gct	ttt	ctc	gga	aac	gcc	720
	Ile	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	Leu	Gly	Asn	Ala	
	225					230					235					240	
20	ggg	gta	atc	ggg	ctg	tcg	aca	tac	tcg	acg	aat	ctg	ctc	aca	cta	ttg	768
	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Thr	Tyr	Ser	Thr	Asn	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	
				245						250					255		
25	gta	atc	gcg	gcg	ggc	aca	gac	tac	gcg	att	ttt	gtc	ctc	ggc	cgc	tat	816
	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Gly	Arg	Tyr	
				260					265					270			
30	cac	gag	gcg	cgc	tac	gcc	gca	cag	gat	cgg	gaa	acg	gcc	ttc	tac	acg	864
	His	Glu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Ala	Gln	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Thr	
			275					280					285				
35	atg	tat	cgc	ggg	acc	gcc	cac	gtc	gtc	ttg	ggc	tcg	ggg	ctg	acc	gtt	912
	Met	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	His	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Val	
		290					295					300					
40	gcc	ggc	gcg	gtg	tat	tgc	ctg	agc	ttt	acc	cgg	cta	ccc	tat	ttt	caa	960
	Ala	Gly	Ala	Val	Tyr	Cys	Leu	Ser	Phe	Thr	Arg	Leu	Pro	Tyr	Phe	Gln	
	305					310					315					320	
45	agc	ctg	ggg	att	ccc	gcc	tcg	ata	ggg	gtg	atg	att	gcg	ttg	gca	gcc	1008
	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Ile	Gly	Val	Met	Ile	Ala	Leu	Ala	Ala	
				325						330					335		
50	gcg	ctc	agc	ctg	gcc	cca	tcc	gtg	ctc	atc	ttg	ggc	agt	cgt	ttc	ggg	1056
	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Pro	Ser	Val	Leu	Ile	Leu	Gly	Ser	Arg	Phe	Gly	
				340					345					350			
55	tgt	ttc	gaa	ccc	aag	cgc	agg	atg	agg	acc	agg	gga	tgg	cgg	cgc	atc	1104
	Cys	Phe	Glu	Pro	Lys	Arg	Arg	Met	Arg	Thr	Arg	Gly	Trp	Arg	Arg	Ile	
			355					360					365				
60	ggc	acg	gcc	atc	gtg	cgt	tgg	ccg	gga	ccc	atc	ctg	gca	gtg	gcg	tgc	1152
	Gly	Thr	Ala	Ile	Val	Arg	Trp	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Cys	
			370				375					380					
65	gca	att	gcg	gtg	gtg	ggg	ctg	ctc	gcg	ctg	ccg	gga	tac	aaa	acg	agc	1200
	Ala	Ile	Ala	Val	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Gly	Tyr	Lys	Thr	Ser	
	385					390					395					400	
70	tac	gac	gct	cgc	tat	tac	atg	ccc	gcc	acc	gcc	ccg	gcc	aat	att	ggc	1248
	Tyr	Asp	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Met	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Ala	Asn	Ile	Gly	
				405						410					415		
75	tac	atg	gcc	gcg	gag	cga	cat	ttt	ccc	caa	gcg	cgg	ctg	aat	ccc	gaa	1296
	Tyr	Met	Ala	Ala	Glu	Arg	His	Phe	Pro	Gln	Ala	Arg	Leu	Asn	Pro	Glu	

ES 2 286 212 T3

	420	425	430	
5	cta ctg atg atc gag acg gat cac gat atg cgc aat ccg gcc gac atg Leu Leu Met Ile Glu Thr Asp His Asp Met Arg Asn Pro Ala Asp Met	1344		
	435	440	445	
10	ctc atc ttg gat agg atc gcc aag gct gtc ttc cat ctg ccc ggc ata Leu Ile Leu Asp Arg Ile Ala Lys Ala Val Phe His Leu Pro Gly Ile	1392		
	450	455	460	
15	ggg ctg gtg cag gcc atg acc cgg ccg cta gga acc ccg att gac cac Gly Leu Val Gln Ala Met Thr Arg Pro Leu Gly Thr Pro Ile Asp His	1440		
	465	470	475	480
20	agc tcg ata ccg ttt cag atc agc atg caa agc gtc ggc cag att cag Ser Ser Ile Pro Phe Gln Ile Ser Met Gln Ser Val Gly Gln Ile Gln	1488		
	485	490	495	
25	aat ctc aag tat cag agg gac cga gca gcc gac ttg ctg aag cag gcc Asn Leu Lys Tyr Gln Arg Asp Arg Ala Ala Asp Leu Leu Lys Gln Ala	1536		
	500	505	510	
30	gaa gag ctg ggg aag acg atc gaa atc ttg cag cgc caa tat gcc cta Glu Glu Leu Gly Lys Thr Ile Glu Ile Leu Gln Arg Gln Tyr Ala Leu	1584		
	515	520	525	
35	cag cag gaa ctc gcg gcc gct act cac gag caa gcc gaa agc ttt cac Gln Gln Glu Leu Ala Ala Ala Thr His Glu Gln Ala Glu Ser Phe His	1632		
	530	535	540	
40	caa acg atc gcc acg gta aag gaa ctg cga gat agg atc gcc aat ttc Gln Thr Ile Ala Thr Val Lys Glu Leu Arg Asp Arg Ile Ala Asn Phe	1680		
	545	550	555	560
45	gac gat ttc ttc agg ccg att cgt agt tac ttt tac tgg gaa aag cac Asp Asp Phe Phe Arg Pro Ile Arg Ser Tyr Phe Tyr Trp Glu Lys His	1728		
	565	570	575	
50	tgc tac gat atc ccg agc tgc tgg gcg ctg Cys Tyr Asp Ile Pro Ser Cys Trp Ala Leu	1758		
	580	585		

<210> 8

45 <211> 586

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

50 <223> secuencia truncada de mmpL6 y proteína

<400> 8

55	Met Ser Asn His His Arg Pro Arg Pro Trp Leu Pro His Thr Ile Arg
	1 5 10 15
60	Arg Leu Ser Leu Pro Ile Leu Leu Phe Trp Val Gly Val Ala Ala Ile
	20 25 30
65	Thr Asn Ala Ala Val Pro Gln Leu Glu Val Val Gly Glu Ala His Asn
	35 40 45

ES 2 286 212 T3

	Val	Ala	Gln	Ser	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	Met	Lys	Arg	
	50						55					60					
5	Ile	Gly	Lys	Val	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ala	Met	Ile	
	65					70					75					80	
	Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Asn	Asp	Ala	His	Arg	Phe	Tyr	
					85					90					95		
10	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Lys	His	Val	Glu	His	
				100					105					110			
	Val	Gln	Asp	Phe	Trp	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln	Ser	
15			115					120					125				
	Thr	Asp	Gly	Lys	Ala	Ala	Tyr	Val	Gln	Val	Tyr	Leu	Ala	Gly	Asn	Gln	
	130						135					140					
20	Gly	Glu	Ala	Leu	Ser	Ile	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Arg	Asp	Ile	Val	
	145					150					155				160		
	Ala	His	Thr	Pro	Pro	Pro	Ala	Gly	Val	Lys	Ala	Tyr	Val	Thr	Gly	Ala	
						165				170					175		
25	Ala	Pro	Leu	Met	Ala	Asp	Gln	Phe	Gln	Val	Gly	Ser	Lys	Gly	Thr	Ala	
				180					185					190			
	Lys	Val	Thr	Gly	Ile	Thr	Leu	Val	Val	Ile	Ala	Val	Met	Leu	Leu	Phe	
			195				200						205				
30	Val	Tyr	Arg	Ser	Val	Val	Thr	Met	Val	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Val	Leu	
		210					215					220					
	Ile	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	Leu	Gly	Asn	Ala	
35		225				230					235				240		
	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Thr	Tyr	Ser	Thr	Asn	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	
					245					250					255		
40	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Gly	Arg	Tyr	
			260						265					270			
	His	Glu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Ala	Gln	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Thr	
			275					280						285			
45	Met	Tyr	Arg	Gly	Thr	Ala	His	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Val	
		290					295					300					
	Ala	Gly	Ala	Val	Tyr	Cys	Leu	Ser	Phe	Thr	Arg	Leu	Pro	Tyr	Phe	Gln	
		305				310					315				320		
50	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Ile	Gly	Val	Met	Ile	Ala	Leu	Ala	Ala	
					325					330				335			
	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Pro	Ser	Val	Leu	Ile	Leu	Gly	Ser	Arg	Phe	Gly	
55				340					345					350			
	Cys	Phe	Glu	Pro	Lys	Arg	Arg	Met	Arg	Thr	Arg	Gly	Trp	Arg	Arg	Ile	
		355						360					365				
60	Gly	Thr	Ala	Ile	Val	Arg	Trp	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Cys	
65																	

ES 2 286 212 T3

[illegible]

50 <210> 9
<211> 447
<212> ADN
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

55 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(444)

60 <220>
<223> secuencia de mmpS6 y proteína

ES 2 286 212 T3

<400> 9

```

5      gtg cag ggg att tca gtg act ggc ctg gtc aaa cgc ggc tgg atg gtg   48
      Val Gln Gly Ile Ser Val Thr Gly Leu Val Lys Arg Gly Trp Met Val
          1             5             10             15

10     ctg gtt gcc gtg gcg gtg gtg gcg gtc gcg gga ttc agc gtc tat cgg   96

15     Leu Val Ala Val Ala Val Val Ala Val Ala Gly Phe Ser Val Tyr Arg
          20             25             30

20     ttg cac ggc atc ttc ggc tcg cac gac acc acc tcg acc gcc ggt ggt   144
      Leu His Gly Ile Phe Gly Ser His Asp Thr Thr Ser Thr Ala Gly Gly
          35             40             45

25     gtc gcg aac gac atc aag ccg ttc aac ccc aaa cag gta acc ctc gag   192
      Val Ala Asn Asp Ile Lys Pro Phe Asn Pro Lys Gln Val Thr Leu Glu
          50             55             60

30     gtc ttt ggc gct ccc gga acc gtg gca acg atc aat tat ctg gac gtg   240
      Val Phe Gly Ala Pro Gly Thr Val Ala Thr Ile Asn Tyr Leu Asp Val
          65             70             75             80

35     gat gcc aca cct cgg caa gtc ctg gac acg acc ctg ccg tgg tca tac   288
      Asp Ala Thr Pro Arg Gln Val Leu Asp Thr Thr Leu Pro Trp Ser Tyr
          85             90             95

40     acg atc acg acg acc ctg ccc gcg gtc ttc gcc aat gtt gtc gcg caa   336
      Thr Ile Thr Thr Thr Leu Pro Ala Val Phe Ala Asn Val Val Ala Gln
          100            105            110

45     ggc gac agc aat tcc atc ggc tgc cgc atc acc gtc aac ggt gta gtc   384
      Gly Asp Ser Asn Ser Ile Gly Cys Arg Ile Thr Val Asn Gly Val Val
          115            120            125

50     aag gac gaa agg atc gtc aac gaa gtg cgc gcc tat acc ttc tgc ctc   432
      Lys Asp Glu Arg Ile Val Asn Glu Val Arg Ala Tyr Thr Phe Cys Leu
          130            135            140

      gac aag tcc tca tga   447
      Asp Lys Ser Ser
          145

```

<210> 10

55 <211> 148

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

60 <220>

<223> secuencia de mmpS6 y proteína

65

ES 2 286 212 T3

<400> 10

```

5      Val Gln Gly Ile Ser Val Thr Gly Leu Val Lys Arg Gly Trp Met Val
      1          5          10          15

      Leu Val Ala Val Ala Val Val Ala Val Ala Gly Phe Ser Val Tyr Arg
          20          25          30

10     Leu His Gly Ile Phe Gly Ser His Asp Thr Thr Ser Thr Ala Gly Gly
          35          40          45

      Val Ala Asn Asp Ile Lys Pro Phe Asn Pro Lys Gln Val Thr Leu Glu
      50          55          60

      Val Phe Gly Ala Pro Gly Thr Val Ala Thr Ile Asn Tyr Leu Asp Val
      65          70          75          80

20     Asp Ala Thr Pro Arg Gln Val Leu Asp Thr Thr Leu Pro Trp Ser Tyr

25          85          90          95

      Thr Ile Thr Thr Thr Leu Pro Ala Val Phe Ala Asn Val Val Ala Gln
          100          105          110

30     Gly Asp Ser Asn Ser Ile Gly Cys Arg Ile Thr Val Asn Gly Val Val
          115          120          125

      Lys Asp Glu Arg Ile Val Asn Glu Val Arg Ala Tyr Thr Phe Cys Leu
      130          135          140

      Asp Lys Ser Ser
      145

```

<210> 11

<211> 399

45 <212> ADN

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

50 <221> CDS

<222> (1)..(399)

<220>

55 <223> secuencia truncada de mmpS6 y proteína

60

65

ES 2 286 212 T3

<400> 11

5	ctg gtt gcc gtg gcg gtg gtg gcg gtc gcg gga ttc agc gtc tat cgg	48
	Leu Val Ala Val Ala Val Val Ala Val Ala Gly Phe Ser Val Tyr Arg	
	1 5 10 15	
10	ttg cac ggc atc ttc ggc tcg cac gac acc acc tcg acc gcc ggt ggt	96
	Leu His Gly Ile Phe Gly Ser His Asp Thr Thr Ser Thr Ala Gly Gly	
	20 25 30	
15	gtc gcg aac gac atc aag ccg ttc aac ccc aaa cag gta acc ctc gag	144
	Val Ala Asn Asp Ile Lys Pro Phe Asn Pro Lys Gln Val Thr Leu Glu	
	35 40 45	
20	gtc ttt ggc gct ccc gga acc gtg gca acg atc aat tat ctg gac gtg	192
	Val Phe Gly Ala Pro Gly Thr Val Ala Thr Ile Asn Tyr Leu Asp Val	
	50 55 60	
25	gat gcc aca cct cgg caa gtc ctg gac acg acc ctg ccg tgg tca tac	240
	Asp Ala Thr Pro Arg Gln Val Leu Asp Thr Thr Leu Pro Trp Ser Tyr	
	65 70 75 80	
30	acg atc acg acg acc ctg ccc gcg gtc ttc gcc aat gtt gtc gcg caa	288
	Thr Ile Thr Thr Thr Leu Pro Ala Val Phe Ala Asn Val Val Ala Gln	
	85 90 95	
35	ggc gac agc aat tcc atc ggc tgc cgc atc acc gtc aac ggt gta gtc	336
	Gly Asp Ser Asn Ser Ile Gly Cys Arg Ile Thr Val Asn Gly Val Val	
	100 105 110	
40	aag gac gaa agg atc gtc aac gaa gtg cgc gcc tat acc ttc tgc ctc	384
	Lys Asp Glu Arg Ile Val Asn Glu Val Arg Ala Tyr Thr Phe Cys Leu	
	115 120 125	
45	gac aag tcc tca tga	399
	Asp Lys Ser Ser	
	130	

<210> 12

<211> 132

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> secuencia truncada de mmpS6 y proteína

ES 2 286 212 T3

<400> 12

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

 Leu His Gly Ile Phe Gly Ser His Asp Thr Thr Ser Thr Ala Gly Gly
 20 25 30

10 Val Ala Asn Asp Ile Lys Pro Phe Asn Pro Lys Gln Val Thr Leu Glu
 35 40 45

 Val Phe Gly Ala Pro Gly Thr Val Ala Thr Ile Asn Tyr Leu Asp Val
 50 55 60

 Asp Ala Thr Pro Arg Gln Val Leu Asp Thr Thr Leu Pro Trp Ser Tyr
 65 70 75 80

20 Thr Ile Thr Thr Thr Leu Pro Ala Val Phe Ala Asn Val Val Ala Gln
 85 90 95

 Gly Asp Ser Asn Ser Ile Gly Cys Arg Ile Thr Val Asn Gly Val Val
 100 105 110

 Lys Asp Glu Arg Ile Val Asn Glu Val Arg Ala Tyr Thr Phe Cys Leu
 115 120 125

30 Asp Lys Ser Ser
 130

<210> 13

35 <211> 20

<212> ADN

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

40 <400> 13

cgttaaccc caaacagga

20

45 <210> 14

<211> 20

<212> ADN

50 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 14

aatcgaactc gtggaacacc

20

55 <210> 15

<211> 20

<212> ADN

60 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 15

65 attcagcgtc tatcggtgc

20

ES 2 286 212 T3

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 16
 10 agcagctcgg gatatcgtag 20
 <210> 17
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 17
 20 ctacctcatc ttccggtcca 20
 <210> 18
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 30 <400> 18
 catagatccc ggacatggtg 20
 35 <210> 19
 <211> 2390
 <212> ADN
 40 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (517)..(2307)
 45 <400> 19
 gatccccgtcg ccgcgggcgct ggagctggcc gccggggcccg cagccgcccc gcgcgaggtc 60
 50 gtgctggcga gcaaagccac catgcgcgcc acagccagcc ccggatcgct ggaccttgag 120
 caacacgaac tcgccaaacg cttagaactt gggccgcagg cgaaatcggc ccagtcgccc 180
 gagttcgccg ctcgcttggtc tgccgctcaa cacaggtagc gcctaccagc ctcgctgggt 240
 55 tccatggcgt gccccagtc gaagctgctg ctgcttgact ccgcgcgctg ggcccagagc 300
 cgcgctgttg tacggcccaa acggcggtgc ggtgtacagt cgcgcgctcg cggtttcagt 360
 ccggcccccc gactccggca ggcccagcgg cggccagcgc tagcccgaaag ttcccccttg 420
 60 tagggggcgg ctgagtttcg atctgtttcg tgagcaggtg tttctgtgtt caacttcctt 480
 65

ES 2 286 212 T3

	caacatgtac	tc	atgtatta	ttgagaatag	ctcggc	gtg	tca	tcc	tct	gat	gac	534					
						Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Asp						
						1				5							
5																	
	gct	att	atc	gcg	ctg	acc	gcg	tgt	tat	aaa	gta	atc	atg	tac	att	acc	582
	Ala	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Ala	Cys	Tyr	Lys	Val	Ile	Met	Tyr	Ile	Thr	
				10					15					20			
10																	
	cg	gta	ccc	aac	cg	gga	tcc	ccg	ccg	gcg	gtg	ctg	ttg	cg	gaa	agc	630
	Arg	Val	Pro	Asn	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ala	Val	Leu	Leu	Arg	Glu	Ser	
			25					30					35				
15																	
	ttc	cg	gaa	aac	ggc	aag	gtc	aag	acg	cgt	acc	ctg	gcc	aac	ctc	tca	678
	Phe	Arg	Glu	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Thr	Arg	Thr	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	
	40					45					50						
20																	
	cg	tgg	ccc	gag	cac	aag	ctg	gac	aga	ctg	gac	cg	gcg	ctt	aag	ggc	726
	Arg	Trp	Pro	Glu	His	Lys	Leu	Asp	Arg	Leu	Asp	Arg	Ala	Leu	Lys	Gly	
	55					60				65					70		
25																	
	ttg	ccg	ccc	gcg	gac	tgg	gat	cta	gcc	gag	gcc	ttc	gat	atc	acc	cg	774
	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp	Trp	Asp	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Asp	Ile	Thr	Arg	
				75					80					85			
30																	
	agc	ctg	ccg	cac	ggg	cat	gtg	gcc	gcg	gtg	gcc	ggc	acc	gcc	gag	aag	822
	Ser	Leu	Pro	His	Gly	His	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Gly	Thr	Ala	Glu	Lys	
				90				95					100				
35																	
	ctg	ggc	ata	ccc	gag	ctg	atc	gac	ccc	acc	ccg	tcg	cg	cg	cg	aac	870
	Leu	Gly	Ile	Pro	Glu	Leu	Ile	Asp	Pro	Thr	Pro	Ser	Arg	Arg	Arg	Asn	
			105					110					115				
40																	
	ctg	gtg	ctg	gcc	atg	ctg	atc	ggg	cag	atc	atc	gag	ccc	gga	tcg	aaa	918
	Leu	Val	Leu	Ala	Met	Leu	Ile	Gly	Gln	Ile	Ile	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	
	120					125						130					
45																	
	ctg	gcg	atc	gcg	cg	ggg	ctg	cg	gcc	cag	acc	gcc	acc	agc	acg	ctg	966
	Leu	Ala	Ile	Ala	Arg	Gly	Leu	Arg	Ala	Gln	Thr	Ala	Thr	Ser	Thr	Leu	
	135					140				145						150	
50																	
	ggt	gcg	gtg	ctg	ggt	gtc	tcg	ggc	gcc	gat	gag	gac	gac	ctg	tat	gac	1014
	Gly	Ala	Val	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Asp	Glu	Asp	Asp	Leu	Tyr	Asp	
				155				160						165			
55																	
	gcg	atg	gac	tgg	gcg	ctg	gag	cg	aaa	gac	ggc	atc	gaa	aac	gcc	ttg	1062
	Ala	Met	Asp	Trp	Ala	Leu	Glu	Arg	Lys	Asp	Gly	Ile	Glu	Asn	Ala	Leu	
				170				175						180			
60																	
	gcc	gca	cg	cat	ctg	acc	aac	ggc	acc	ctg	gtg	ctc	tat	gac	gta	tcc	1110
	Ala	Ala	Arg	His	Leu	Thr	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Leu	Tyr	Asp	Val	Ser	
			185					190					195				
65																	
	tcg	gcg	gcg	ttc	gag	ggc	cac	acc	tgc	ccg	ctg	gga	gcg	atc	ggg	cac	1158
	Ser	Ala	Ala	Phe	Glu	Gly	His	Thr	Cys	Pro	Leu	Gly	Ala	Ile	Gly	His	
	200					205						210					
70																	
	gcc	cg	gac	ggg	gtc	aaa	ggc	cg	ctg	cag	atc	gtc	tac	ggg	ctg	ctg	1206
	Ala	Arg	Asp	Gly	Val	Lys	Gly	Arg	Leu	Gln	Ile	Val	Tyr	Gly	Leu	Leu	
	215					220				225						230	

ES 2 286 212 T3

	tgc tca ccc aag gga gcg ccg gtg gcc atc gag gtg ttc aag ggc aac	1254
	Cys Ser Pro Lys Gly Ala Pro Val Ala Ile Glu Val Phe Lys Gly Asn	
	235 240 245	
5	acc gcc gac ccg aaa act ctg aaa gct caa atc gac aag ctc aaa acc	1302
	Thr Ala Asp Pro Lys Thr Leu Lys Ala Gln Ile Asp Lys Leu Lys Thr	
	250 255 260	
10	cgg ttc ggg ttg acc cgc atc gcc ctg gtg ggc gat cgg ggc atg ctc	1350
	Arg Phe Gly Leu Thr Arg Ile Ala Leu Val Gly Asp Arg Gly Met Leu	
	265 270 275	
15	act tcc gcg cgc atc cgt gac gag ctg cgt ccg gcg cac ctg gat tgg	1398
	Thr Ser Ala Arg Ile Arg Asp Glu Leu Arg Pro Ala His Leu Asp Trp	
	280 285 290	
20	atc agc gcg ctg cgc gcc ccg cag atc aag atc ctg ctc gag gac ggg	1446
	Ile Ser Ala Leu Arg Ala Pro Gln Ile Lys Ile Leu Leu Glu Asp Gly	
	295 300 305 310	
25	gcg ctg cag ctg tcg ctg ttc gat gag cag aac ctg ttc gag atc act	1494
	Ala Leu Gln Leu Ser Leu Phe Asp Glu Gln Asn Leu Phe Glu Ile Thr	
	315 320 325	
30	cac ccc gac tat ccc ggt gag cgg ctg gtg tgc tgc cac aac ccc gcc	1542
	His Pro Asp Tyr Pro Gly Glu Arg Leu Val Cys Cys His Asn Pro Ala	
	330 335 340	
35	ctg gcc gac gag cgc gcc cgc aaa cgc gcc gag ctg ctg gcg gcc acc	1590
	Leu Ala Asp Glu Arg Ala Arg Lys Arg Ala Glu Leu Leu Ala Ala Thr	
	345 350 355	
40	gaa aag gag ctg cag gcc atc gcc gaa gcc acc cgc cgc caa cgc cgg	1638
	Glu Lys Glu Leu Gln Ala Ile Ala Glu Ala Thr Arg Arg Gln Arg Arg	
	360 365 370	
45	ccg tta cgc ggt aca gac aag atc ggc ctg cgg gtg ggc aag gtg cgc	1686
	Pro Leu Arg Gly Thr Asp Lys Ile Gly Leu Arg Val Gly Lys Val Arg	
	375 380 385 390	
50	aac aag ttc aag atg gcc aag cac ttt gac ctg cac atc acc gat gag	1734
	Asn Lys Phe Lys Met Ala Lys His Phe Asp Leu His Ile Thr Asp Glu	
	395 400 405	
55	gcc ttc agc ttc acc cgc aac cag aac agt atc gcc gcc gag gcc gcc	1782
	Ala Phe Ser Phe Thr Arg Asn Gln Asn Ser Ile Ala Ala Glu Ala Ala	
	410 415 420	
60	ctc gac ggc atc tac gtg cta cgc acc agc ctg ccc gac aac gcc ctg	1830
	Leu Asp Gly Ile Tyr Val Leu Arg Thr Ser Leu Pro Asp Asn Ala Leu	
	425 430 435	
65	ggc cgc gac gac gtg gtg ggc cgc tac aaa gac ctc gcc gac gtc gaa	1878
	Gly Arg Asp Asp Val Val Gly Arg Tyr Lys Asp Leu Ala Asp Val Glu	
	440 445 450	
70	cgc ttc ttc cgc acc ctc aac agc gaa ctg gac gta cgc ccc atc cgg	1926
	Arg Phe Phe Arg Thr Leu Asn Ser Glu Leu Asp Val Arg Pro Ile Arg	
	455 460 465 470	
75	cat cgg ctg gcc gac cgg gtc cgc gcc cac atg ttc ttg cac atg ctc	1974

ES 2 286 212 T3

	His Arg Leu Ala Asp Arg Val Arg Ala His Met Phe Leu His Met Leu	
	475 480 485	
5	tcc tac tac atc agc tgg cac atg aaa caa gcc ctg gcc cca atc ctg Ser Tyr Tyr Ile Ser Trp His Met Lys Gln Ala Leu Ala Pro Ile Leu	2022
	490 495 500	
10	ttc acc gac aac gac aaa ccc gcc gcc gcc gcc aaa cgc gcc gac ccc Phe Thr Asp Asn Asp Lys Pro Ala Ala Ala Lys Arg Ala Asp Pro	2070
	505 510 515	
15	gtc gcg cca gcc caa cgc tcc gac gaa gcg ctg aac aag gca gca cgc Val Ala Pro Ala Gln Arg Ser Asp Glu Ala Leu Asn Lys Ala Ala Arg	2118
	520 525 530	
20	aaa cgc acc gaa gac aac caa ccg gtg cac agc ttc acc agc ctg ctc Lys Arg Thr Glu Asp Asn Gln Pro Val His Ser Phe Thr Ser Leu Leu	2166
	535 540 545 550	
25	acc gac ctg gcc acc atc tgc gcc aac tac atc caa ccc aca gac gac Thr Asp Leu Ala Thr Ile Cys Ala Asn Tyr Ile Gln Pro Thr Asp Asp	2214
	555 560 565	
30	ctg cca gca ttc acc aaa acc acc acc ccc acc ccc aca caa cgg cgc Leu Pro Ala Phe Thr Lys Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Gln Arg Arg	2262
	570 575 580	
35	gcc ttc gac cta ctg gcc gtt tcc cac cgc cac ggc ctg gcg tag Ala Phe Asp Leu Leu Ala Val Ser His Arg His Gly Leu Ala	2307
	585 590 595	
40	tcagtagcga accacaaatg cccaggtcaa cgacacaaac cgcgccggat caggggggaac	2367
45	ttcgggctag ccgggcgcgc cgg	2390
50	Val Ser Ser Ser Asp Asp Ala Ile Ile Ala Leu Thr Ala Cys Tyr Lys 1 5 10 15	
55	Val Ile Met Tyr Ile Thr Arg Val Pro Asn Arg Gly Ser Pro Pro Ala 20 25 30	
60	Val Leu Leu Arg Glu Ser Phe Arg Glu Asn Gly Lys Val Lys Thr Arg 35 40 45	
65	Thr Leu Ala Asn Leu Ser Arg Trp Pro Glu His Lys Leu Asp Arg Leu 50 55 60	
70	Asp Arg Ala Leu Lys Gly Leu Pro Pro Ala Asp Trp Asp Leu Ala Glu 65 70 75 80	
75	Ala Phe Asp Ile Thr Arg Ser Leu Pro His Gly His Val Ala Ala Val 85 90 95	
80	Ala Gly Thr Ala Glu Lys Leu Gly Ile Pro Glu Leu Ile Asp Pro Thr	

ES 2 286 212 T3

	100							105					110				
5	Pro	Ser	Arg	Arg	Arg	Asn	Leu	Val	Leu	Ala	Met	Leu	Ile	Gly	Gln	Ile	
			115					120					125				
10	Ile	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	Leu	Ala	Ile	Ala	Arg	Gly	Leu	Arg	Ala	Gln	
		130					135					140					
15	Thr	Ala	Thr	Ser	Thr	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Asp	
	145					150					155					160	
20	Glu	Asp	Asp	Leu	Tyr	Asp	Ala	Met	Asp	Trp	Ala	Leu	Glu	Arg	Lys	Asp	
					165					170					175		
25	Gly	Ile	Glu	Asn	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	His	Leu	Thr	Asn	Gly	Thr	Leu	
				180					185					190			
30	Val	Leu	Tyr	Asp	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Phe	Glu	Gly	His	Thr	Cys	Pro	
			195					200					205				
35	Leu	Gly	Ala	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Asp	Gly	Val	Lys	Gly	Arg	Leu	Gln	
		210					215					220					
40	Ile	Val	Tyr	Gly	Leu	Leu	Cys	Ser	Pro	Lys	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Ile	
	225					230					235					240	
45	Glu	Val	Phe	Lys	Gly	Asn	Thr	Ala	Asp	Pro	Lys	Thr	Leu	Lys	Ala	Gln	
				245						250					255		
50	Ile	Asp	Lys	Leu	Lys	Thr	Arg	Phe	Gly	Leu	Thr	Arg	Ile	Ala	Leu	Val	
			260						265					270			
55	Gly	Asp	Arg	Gly	Met	Leu	Thr	Ser	Ala	Arg	Ile	Arg	Asp	Glu	Leu	Arg	
			275					280					285				
60	Pro	Ala	His	Leu	Asp	Trp	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Ala	Pro	Gln	Ile	Lys	
		290				295						300					
65	Ile	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Ala	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu	Phe	Asp	Glu	Gln	
	305					310					315					320	
70	Asn	Leu	Phe	Glu	Ile	Thr	His	Pro	Asp	Tyr	Pro	Gly	Glu	Arg	Leu	Val	
				325						330					335		
75	Cys	Cys	His	Asn	Pro	Ala	Leu	Ala	Asp	Glu	Arg	Ala	Arg	Lys	Arg	Ala	
				340					345					350			
80	Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Glu	Lys	Glu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ala	Glu	Ala	
			355					360					365				
85	Thr	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Pro	Leu	Arg	Gly	Thr	Asp	Lys	Ile	Gly	Leu	
		370					375					380					
90	Arg	Val	Gly	Lys	Val	Arg	Asn	Lys	Phe	Lys	Met	Ala	Lys	His	Phe	Asp	
	385					390					395					400	
95	Leu	His	Ile	Thr	Asp	Glu	Ala	Phe	Ser	Phe	Thr	Arg	Asn	Gln	Asn	Ser	
					405					410					415		
100	Ile	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Asp	Gly	Ile	Tyr	Val	Leu	Arg	Thr	Ser	
				420					425					430			

ES 2 286 212 T3

	Leu	Pro	Asp	Asn	Ala	Leu	Gly	Arg	Asp	Asp	Val	Val	Gly	Arg	Tyr	Lys
			435					440					445			
5	Asp	Leu	Ala	Asp	Val	Glu	Arg	Phe	Phe	Arg	Thr	Leu	Asn	Ser	Glu	Leu
	450						455					460				
10	Asp	Val	Arg	Pro	Ile	Arg	His	Arg	Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Arg	Ala	His
	465					470					475					480
	Met	Phe	Leu	His	Met	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Ser	Trp	His	Met	Lys	Gln
				485						490					495	
15	Ala	Leu	Ala	Pro	Ile	Leu	Phe	Thr	Asp	Asn	Asp	Lys	Pro	Ala	Ala	Ala
				500					505					510		
20	Ala	Lys	Arg	Ala	Asp	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Gln	Arg	Ser	Asp	Glu	Ala
			515					520					525			
	Leu	Asn	Lys	Ala	Ala	Arg	Lys	Arg	Thr	Glu	Asp	Asn	Gln	Pro	Val	His
	530						535					540				
25	Ser	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	Thr	Ile	Cys	Ala	Asn	Tyr
	545					550					555					560
30	Ile	Gln	Pro	Thr	Asp	Asp	Leu	Pro	Ala	Phe	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro
				565						570					575	
	Thr	Pro	Thr	Gln	Arg	Arg	Ala	Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	Val	Ser	His	Arg
			580						585					590		
35	His	Gly	Leu	Ala												
			595													