

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-504523

(P2005-504523A)

(43) 公表日 平成17年2月17日(2005.2.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/04	A 6 1 K 39/04	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	R 4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 304 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-507124 (P2003-507124)	(71) 出願人	503191210
(86) (22) 出願日	平成14年6月21日 (2002.6.21)		ヘルス プロテクション エージェンシー
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月19日 (2003.12.19)		イギリス国 エスピー4 オジェイジー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/002845		ウィルトシャー, ソールズベリー, ポート
(87) 国際公開番号	W02003/000721		ン ダウン (番地なし)
(87) 国際公開日	平成15年1月3日 (2003.1.3)	(74) 代理人	100104673
(31) 優先権主張番号	0115365.9		弁理士 南條 博道
(32) 優先日	平成13年6月22日 (2001.6.22)	(72) 発明者	ジェイムズ, ブライアン ウィリアム
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス国 エスピー4 オジェイジー
(31) 優先権主張番号	0121780.1		ウィルトシャー, ソールズベリー, ポート
(32) 優先日	平成13年9月7日 (2001.9.7)		ン ダウン (番地なし), ヘルス プロテ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		クション エージェンシー
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 低酸素圧下で発現するマイコバクテリア抗原

(57) 【要約】

37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で誘導またはアップレギュレートされるマイコバクテリア遺伝子を同定する方法が提供される。この誘導またはアップレギュレートされた遺伝子は、核酸ワクチンの主成分を形成するか、またはマイコバクテリア感染に対するワクチン用の弱毒化マイコバクテリアの調製を可能にするターゲットを提供する。同様に、この誘導またはアップレギュレートされた遺伝子によってコードされるペプチドは、ワクチンに用いられる。さらなる実施態様では、同定された遺伝子／ペプチドは、核酸プローブまたは抗体検出によって臨床試料におけるマイコバクテリア感染の存在を同定するための手段を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された *M. tuberculosis* ペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体を含む、マイコバクテリア感染の治療剤であって、該ペプチドが、遺伝子によってコードされ、該遺伝子の発現が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、*M. tuberculosis* の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該ペプチドが、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、および137からなる群より選択される、治療剤。

【請求項 2】

マイコバクテリア遺伝子を同定する方法であって、該遺伝子の発現が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該方法が、以下の工程：

37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、第1のマイコバクテリアを培養する工程；

37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、第2のマイコバクテリアを培養する工程；

該第1および第2のマイコバクテリアから、第1および第2のmRNA集団をそれぞれ得る工程；

該第1および第2のmRNA集団から、第1および第2のcDNA集団をそれぞれ調製する工程であって、該cDNA調製中に、検出可能な標識が、該第1および第2のcDNA集団のcDNA分子に導入される、工程；

該第1および第2のcDNA集団から、対応する第1および第2のcDNA分子をそれぞれ単離する工程；

該単離された第1および第2のcDNA分子に存在する標識から放出される標識または対応するシグナルの相対量を比較する工程；

該単離された第2のcDNA分子によって提供されるよりも多い量の該単離された第1のcDNA分子によって提供される標識またはシグナルを同定する工程；および

該第1のcDNA、および37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中に誘導またはアップレギュレートされる対応するマイコバクテリア遺伝子を同定する工程；

を包含する、方法。

【請求項 3】

前記対応する第1および第2のcDNA分子が、マイコバクテリアゲノムDNAから生成され、増幅されて固定化されたDNA配列を含むアレイプレートへのハイブリダイゼーションによって、それぞれ前記第1および第2のcDNA集団から単離され、ここで、該固定化された配列が、該マイコバクテリアゲノムの各公知の遺伝子を代表し、そして各代表的な配列が、該プレート上の同定された位置に固定化されている、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記第2のマイコバクテリアが、該第2のマイコバクテリアを実質的にビルレンスに誘導しない連続培養条件下で培養される、請求項2または3に記載の方法。

【請求項 5】

前記培養条件が、前記マイコバクテリアの増殖のために、酸素以外の利用可能な栄養の点

で制限されず、そして増殖因子、温度、および pH の点で制限されていない、請求項 2 から 4 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 のマイコバクテリアが、前記溶存酸素圧を除いて、実質的に前記第 2 のマイコバクテリアについての条件と実質的に同一の連続培養条件下で培養される、請求項 2 から 5 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 7】

相対誘導またはアップレギュレーションが、前記単離された第 1 の cDNA 分子によって提供される標識またはシグナルの量において、前記単離された第 2 の cDNA 分子によって提供されるより、相対的に 3 倍、好ましくは相対的に 4 倍の増加によって同定される、請求項 2 から 6 のいずれかの項に記載の方法。 10

【請求項 8】

M. tuberculosis ペプチドに対するインヒビターであって、該ペプチドが、遺伝子によってコードされ、該遺伝子の発現が、37℃で測定した少なくとも 40% 空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した 10% 空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、M. tuberculosis の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、そして該インヒビターが、該 M. tuberculosis ペプチドが本来有する生物学的効果を発揮することを抑制または阻害し得、該ペプチドが、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、および 137 からなる群より選択される、インヒビター。 20

【請求項 9】

前記インヒビターが、アシルキャリアタンパク質、モノオキシゲナーゼ、マイコバクチン合成タンパク質、転写レギュレーター、酸化還元酵素、アシル CoA デヒドロゲナーゼ、エステラーゼ/アセチルヒドロラーゼ、シトクロム D、メチルトランスフェラーゼ、トランスアミナーゼ、PPE タンパク質、バリルー tRNA シンセターゼ、グアニル酸キナーゼ、ケトール酸レダクトイソメラーゼ、ABC トランスポーター、ATP-結合タンパク質、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、σ 因子、ピルビン酸キナーゼ、熱ショックタンパク質、およびアミノトランスフェラーゼからなる群より選択されるタンパク質を阻害し得る、請求項 8 に記載のインヒビター。 30

【請求項 10】

前記誘導またはアップレギュレートされた M. tuberculosis 遺伝子またはその遺伝子産物をターゲティングし得る抗生物質；および該誘導可能またはアップレギュレート可能な遺伝子の少なくとも一部に相補的であるアンチセンスまたは三重鎖形成核酸配列からなる群より選択される、請求項 8 に記載のインヒビター。

【請求項 11】

遺伝子によってコードされるペプチド、または該ペプチドのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体に結合する抗体であって、該遺伝子の発現が、37℃で測定した少なくとも 40% 空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した 10% 空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下での M. tuberculosis の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該ペプチドが、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、および 137 からなる群より選択される、抗体。 40 50

【請求項 12】

遺伝子が改変されてマイコバクテリアが実質的に非病原性になる弱毒化 *M. tuberculosis* マイコバクテリアであって、該遺伝子が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下での *M. tuberculosis* の培養中に、その発現が誘導またはアップレギュレートされる遺伝子であり、該遺伝子が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、および138からなる群の1つに対応する野生型コード配列を有する、弱毒化 *M. tuberculosis* マイコバクテリア。

【請求項 13】

遺伝子によってコードされるペプチド、または該ペプチドのフラグメント、改変体、もしくは誘導体を含む、弱毒化微生物キャリアであって、該遺伝子の発現が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下での *M. tuberculosis* の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該ペプチドが、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、および137からなる群より選択される、弱毒化微生物キャリア。

【請求項 14】

前記弱毒化微生物キャリアが、弱毒化サルモネラ、弱毒化ワクシニアウイルス、弱毒化鶏痘ウイルス、または弱毒化 *M. bovis* (例えば、BCG株)である、請求項13に記載の弱毒化微生物キャリア。

【請求項 15】

プロモーター、ポリアデニル化シグナル、および遺伝子のコード配列に対応するDNA配列、または該DNA配列のフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体を含むDNAプラスミドであって、該遺伝子の発現が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下での野生型の *M. tuberculosis* の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該プロモーターおよびポリアデニル化シグナルが、該DNA配列に作動可能に連結され、該遺伝子のコード配列が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、および138からなる群より選択される、DNAプラスミド。

【請求項 16】

前記プロモーターが、CMVプロモーターおよびSV40プロモーターからなる群より選択され、そして前記ポリアデニル化シグナルが、SV40ポリアデニル化シグナルおよびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルからなる群より選択される、請求項15に記載のDNAプラスミド。

【請求項 17】

D N A 配列または該 D N A 配列のフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体によってコードされる単離された R N A 配列であって、該 D N A 配列が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下での *M. tuberculosis* の培養中に誘導またはアップレギュレートされる遺伝子のコード配列に対応し、該遺伝子のコード配列が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、および138からなる群より選択される、単離された R N A 配列。 10

【請求項18】

請求項17に記載の R N A 配列および宿主細胞の染色体の組込み部位を含む、R N A ベクター。

【請求項19】

マイコバクテリア感染を治療または予防するための医薬品の製造における、単離された *M. tuberculosis* ペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体であって、該ペプチドが、遺伝子によってコードされ、該遺伝子の発現が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、*M. tuberculosis* の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該ペプチドが、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、および137からなる群より選択される、ペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体； 20

請求項8から10のいずれかの項に記載のインヒビター； 30

請求項11に記載の抗体；

請求項12に記載の弱毒化マイコバクテリア；

請求項13または14に記載の弱毒化微生物キャリア；

遺伝子のコード配列に対応する D N A 配列または該 D N A 配列のフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体であって、該遺伝子が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下での *M. tuberculosis* の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該遺伝子のコード配列が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、および138からなる群より選択される、D N A 配列または該 D N A 配列のフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体； 40

請求項15または16に記載の D N A プラスミド；

請求項17に記載の R N A 配列；および／または

請求項18に記載の R N A ベクター、
の使用。

【請求項20】

マイコバクテリア感染を治療または予防する方法であって、
 単離された*M. tuberculosis*ペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘
 導体であって、該ペプチドが、遺伝子によってコードされ、該遺伝子の発現が、37℃で
 測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37
 ℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、*M.*
*tuberculosis*の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該ペプチドが、配列番号
 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、
 31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、5
 7、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83
 、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107 10
 、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127
 、129、131、133、135、および137からなる群より選択される、ペプチド
 またはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体；
 請求項8から10のいずれかの項に記載のインヒビター；
 請求項11に記載の抗体；
 請求項12に記載の弱毒化マイコバクテリア；
 請求項13または14に記載の弱毒化微生物キャリア；
 遺伝子のコード配列に対応するDNA配列または該DNA配列のフラグメントもしくは改
 変体もしくは誘導体であって、該遺伝子が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和
 の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの 20
 溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下での*M. tuberculosis*の培養中に誘導また
 はアップレギュレートされ、該遺伝子のコード配列が、配列番号2、4、6、8、10、
 12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、3
 8、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64
 、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、
 92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、
 114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、
 134、136、および138からなる群より選択される、DNA配列または該DNA配
 列のフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体；
 請求項15または16に記載のDNAプラスミド； 30
 請求項17に記載のRNA配列；および／または
 請求項18に記載のRNAベクター、
 を患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項21】

マイコバクテリア感染を同定するための診断試薬の製造における、
 単離された*M. tuberculosis*ペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘
 導体であって、該ペプチドが、遺伝子によってコードされ、該遺伝子の発現が、37℃で
 測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37
 ℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、*M.*
*tuberculosis*の培養中に誘導またはアップレギュレートされ、該ペプチドが、配列番号 40
 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、
 31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、5
 7、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83
 、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107
 、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127
 、129、131、133、135、および137からなる群より選択される、ペプチド
 またはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体；または
 請求項11に記載の抗体；または
 少なくとも8ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブであって、該プローブが、遺
 伝子の少なくとも一部に結合し、該遺伝子が、37℃で測定した少なくとも40%空気飽 50

和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下での*M. tuberculosis*の培養中に誘導またはアップレギュレートされる、プローブ、の使用。

【請求項22】

マイコバクテリア感染の治療剤であって、本明細書において実質的に実施例に記載されたインヒビター、抗体、弱毒化*M. tuberculosis*マイコバクテリア、弱毒化微生物キャリア、単離されたRNA分子、RNAベクター、またはDNAプラスミドを含む、治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、遺伝子の発現が、低い溶存酸素圧によって規定される増殖条件下でマイコバクテリアの連続培養中に誘導またはアップレギュレートされる、マイコバクテリアにおける遺伝子の同定方法；単離されたペプチド産物、その改変体、誘導体、またはフラグメント；該ペプチド、改変体、誘導体、またはフラグメントに結合する抗体；該ペプチド、改変体、誘導体、またはフラグメントを発現するDNAおよびRNAベクター；該誘導またはアップレギュレートされた遺伝子の少なくとも1つの活性が改変されている弱毒化マイコバクテリア；マイコバクテリア感染に対するワクチン；およびマイコバクテリア感染の検出方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

多くの微生物は、細胞内感染を形成し得る。これらの感染としては、サルモネラ属、エルシニア属、シゲラ属、カンピロバクター属、クラミジア属、およびマイコバクテリア属の種によって引き起こされる感染が挙げられる。これらの感染のいくつかは、もっぱら細胞内であり、他は細胞内および細胞外成分の両方を含む。しかし、疾患の進行についての主な支援因子と思われるのは、細菌感染の細胞内生存サイクルである。

【0003】

一般的に、これらの微生物は、体内、例えば血流中で自由に循環せず、そしてしばしば薬物治療法に従順ではない。薬物が利用可能な場合、この問題は、多剤耐性微生物の発生によって悪化している。

30

【0004】

多くの因子が、微生物耐性の問題に寄与している、1つは、長期にわたる変異の蓄積およびその後の変異した遺伝子の他の生物への水平および垂直移動である。したがって、所定の病原体について、全クラスの抗生物質が、不活性になっている。さらなる因子は、近年の新しいクラスの抗生物質の不在である。多剤耐性病原性細菌の出現は、公衆衛生に対して重篤な脅威を示し、そして新しい形態の治療が緊急に必要とされる。

【0005】

同様の理由で、ワクチン療法は、このような細胞内微生物に対して有効性が確認されていない。また、細胞内でのバイオアベイラビリティを改善するために抗生物質の全身濃度を上昇させることにより、重篤な副作用が生じ得る。

40

【0006】

*Mycobacterium tuberculosis*および密接に関連する種は、*Mycobacterium tuberculosis*複合体(MTC)として知られるマイコバクテリアの小さな群を構成する。この群は、全世界中で大部分の結核(TB)症例の原因因子である4つの種*M. tuberculosis*、*M. microti*、*M. bovis*、および*M. africanum*を含む。

【0007】

*M. tuberculosis*は、世界的に1年に300万名以上の死亡の原因である。他のマイコバクテリアもヒトおよび動物において病原性であり、例えば、*M. avium* subsp. *paratuberculosis*は、反芻動物においてヨーネ病を引き起こし、*M. bovis*は、ウシにおいて結核を引き起こし、*M. avium*および*M. intracellulare*は、免疫不全患者(例えば、AIDS患者

50

、および骨髄移植患者)において結核を引き起こし、そして*M. leprae*は、ヒトにおいてハンセン病を引き起こす。他の重要なマイコバクテリア種は、*M. vaccae*である。

【0008】

*M. tuberculosis*は、体内のマクロファージ細胞に感染する。マクロファージ感染後すぐに、ほとんどの*M. tuberculosis*細菌は、細胞のファゴソーム小胞内に侵入し、存続し、そして複製し、そこで細菌は宿主防御および細胞外因子から隔離される。

【0009】

細菌感染の細胞内生存および増殖または複製は、マイコバクテリア疾患の進行についての主な支援因子と思われる。

【0010】

*M. tuberculosis*感染と戦うための多くの薬物治療法が提案されており、そして現在、薬物イソニアジドを含む組み合わせ治療が最も有効であることが確認されている。しかし、このような治療法の1つの問題は、治療が長期にわたるものであり、そしてこのような治療を完了させなければ、多剤耐性微生物の発生が促進され得ることである。

【0011】

さらなる問題は、治療すべき細胞内で薬物の適切なバイオアベイラビリティを提供することである。薬物の全身濃度を(例えば、より高用量を投与することによって)上昇させることは可能であるが、これは、上昇した薬物濃度によって引き起こされる重篤な副作用を生じ得る。

【0012】

*M. tuberculosis*に対するワクチン予防の有効性は、大きく異なっている。現在の*M. tuberculosis*ワクチンであるBCGは、*M. bovis*の弱毒化株である。小児におけるTBの重篤な合併症に対して有効であるが、成人において、特に民族群間で、その有効性は大きく異なる。BCGワクチン接種は、結核性髄膜炎を予防するために用いられており、そして肺外の部位への*M. tuberculosis*の蔓延を予防することを助けるが、感染を予防しない。

【0013】

BCGの限られた有効性およびTBの全世界的な流行に対して、新しくより有効なワクチンを作り出す国際的な努力が行われている。現在のパラダイムは、その防御がTh1免疫応答の刺激によって媒介されることである。

【0014】

人間におけるBCGワクチン接種は、最初に導入されたときは経口投与であったが、その経路は、胃腸管通過中の生存BCGの損失および頻繁な頸部リンパ腺症のため中止された。実験動物種においては、BCGのエアロゾルまたは気管内送達は、有害な作用なく達成されていたが、その有効性は、霊長類、マウス、およびモルモットにおける非経口接種よりも優れた防御効果から、他の研究における皮下経路を超える明らかな有利性がないことまで、有効性は異なっていた。

【0015】

遺伝子およびタンパク質発現プロファイルを分析するための従来のマイコバクテリア培養システムは、単純なバッチタイプのシステムに基づいており、例えば、Sherman, D.R.ら(2001) PNAS, 98巻, 13号, 7534-7539頁; Boon, C.ら(2001) J. Bacteriol, 183巻, 8号, 2672-2676頁; Cunningham, A.F.ら(1998) J. Bacteriol, 180巻, 4号, 801-808頁; およびMurugasu-Oei, B.ら(1999) Mol. Gen. Genet, 262巻, 677-682頁に記載されている。これらのバッチタイプシステムにおいて、マイコバクテリア増殖は、対数増殖期および定常期を含む代表的なシグモイド増殖曲線になる。対数増殖期から定常期への移行は、遺伝子およびタンパク質発現の点で迅速かつ一時的なスイッチを含み、このスイッチは、マイコバクテリアが必須栄養の飢餓になるような、未定義またはあまり定義されていない相互作用的な刺激の完全なセットによって開始される。

【0016】

したがって、マイコバクテリア感染と戦うための改良されたおよび/または代替のワクチンあるいは治療剤の必要がある。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明の第1の局面によれば、単離されたマイコバクテリアペプチド、またはそのフラグメント、誘導体、もしくは改変体が提供され、このペプチドは、遺伝子によってコードされ、この遺伝子の発現は、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、マイコバクテリアの培養中に誘導またはアップレギュレートされる。

【0018】

本発明で用いられる連続培養方法は、バッチ培養方法と比較した場合に特に有利である。これは、連続培養が、pH、利用可能な栄養、一定の増殖速度、および溶存酸素圧などの、増殖培養パラメータの厳格な制御を可能にするからである。 10

【0019】

したがって、本発明の使用において、主要な、好ましくは唯一のマイコバクテリアビルレンス誘導パラメータが、低い溶存酸素圧の使用であることを確実にすることが可能である。これは、低い溶存酸素圧以外の環境スイッチに単に応答性である遺伝子の偶然の誘導またはアップレギュレーションが、実質的に抑制され得ることを意味する。したがって、誘導またはアップレギュレーションが低い溶存酸素圧に関連しない遺伝子の偽陽性同定が、実質的に避けられ得る。

【0020】

マイコバクテリアバッチ培養システムは、マイコバクテリアが必須栄養の飢餓になるような相互作用的な種々の刺激を含む。結果として、マイコバクテリアは、複雑な範囲の飢餓刺激に曝露され、この刺激は、単離において単一の迅速なまたは一時的な刺激に関連する細胞効果を不明瞭または改変し得る。逆に、本発明は、酸素制限の主な刺激に関する。 20

【0021】

本発明の連続培養条件とバッチタイプシステムとのさらなる違いは、本発明が、主な刺激として酸素制限を用い、そして酸素飢餓を含まないことである。酸素制限中、マイコバクテリアは増殖および再生し得、したがって、本発明は、注意深く制御された環境条件下でマイコバクテリア増殖を維持する。逆に、バッチタイプ培養システムで経験するような飢餓刺激に曝露される場合、マイコバクテリアは、実質的に増殖および再生しない。このような飢餓刺激は、代表的には、ストレスタイプ環境条件に関連し、そして栄養制限に関連するのは異なるマイコバクテリア細胞応答を誘起する。 30

【0022】

溶存酸素圧パラメータは、酸素電極および従来の実験室技法によって算出される。したがって、100%酸素飽和は、空気で飽和される溶液に対応し、一方、0%は、窒素のような不活性ガスで全体的に通気している溶液に対応する。較正は、標準大気圧条件下で、および約21%酸素を含む従来 of 空気で行われる。

【0023】

本発明の低酸素圧誘導条件は、マイコバクテリアの天然のターゲット細胞の感染中にインビボで正常に発現される少なくとも1つの遺伝子を発現するためのマイコバクテリアに伝導性である培養条件であり、本発明の発明者らは、低酸素環境を含むと考える。 40

【0024】

用語「単離された」、「実質的に純粋」、「および「実質的に均一」は、天然に随伴する成分から分離されているペプチドを記載するために交換可能に使用される。少なくとも約60~75%の試料が単一ペプチド配列を示す場合、ペプチドは実質的に純粋である。実質的に純粋なペプチドは、代表的には約60~90% w/wのタンパク質試料を含み、より通常には約95%であり、そして好ましくは約99%以上純粋である。ペプチドの純度または均一性は、例えば、タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動、次いでゲルの染色での単一のポリペプチドバンドの可視化によって示され得る。あるいは、より高い分解能が、例えば、HPLCを用いることによって提供され得る。 50

【0025】

ペプチドは、その天然の状態で随伴する夾雑物から分離される場合に、単離されたと考えられる。したがって、化学的に合成されるかまたは天然由来の細胞とは異なる細胞系で合成されるペプチドは、天然に随伴する成分を実質的に含まない。

【0026】

本発明は、マイコバクテリアから精製され得るペプチド、ならびにこれらのペプチドをコードする組換え核酸で形質転換した他のタイプの細胞から精製され得るペプチドを提供する。

【0027】

所望であれば、本発明のタンパク質のアミノ酸配列は、タンパク質配列決定法によって決定され得る。 10

【0028】

用語「ペプチド」、「オリゴペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、交換可能に使用され、そして特定の長さの産物をいうわけではない。これらの用語は、グリコシル化、アセチル化、およびリン酸化などの翻訳後改変を包含する。

【0029】

用語「フラグメント」とは、問題の誘導またはアップレギュレートされた遺伝子の遺伝子産物であるペプチドの、少なくとも5、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも20、および最も好ましくは少なくとも35のアミノ酸残基を有するペプチドを意味する。フラグメントは、好ましくは、問題の遺伝子産物のエピトープを含む。 20

【0030】

用語「改変体」とは、問題の誘導またはアップレギュレートされた遺伝子の遺伝子産物であるペプチドと、少なくとも70、好ましくは少なくとも80、より好ましくは少なくとも90パーセントのアミノ酸配列相同性を有するペプチドまたはペプチド「フラグメント」を意味する。「改変体」の例は、アミノ酸の1以上のアナログ（例えば、非天然アミノ酸）または置換された連結を含む、誘導／アップレギュレートされた遺伝子のペプチドまたはペプチドフラグメントである。用語「相同性」および「同一性」は、本明細書において同義と考えられる。さらなる実施態様では、「改変体」は、ペプチドまたはペプチドフラグメントの模倣物であり得、この模倣物は、ペプチドまたはペプチドフラグメントの少なくとも1つのエピトープを再生する。この模倣物は、例えば、核酸模倣物、好ましくはDNA模倣物であり得る。 30

【0031】

配列比較について、代表的には、1つの配列は、参照配列として作用し、これに対してテスト配列が比較され得る。配列比較アルゴリズムを用いる場合、テストおよび参照配列は、コンピュータに入力され、次の座標が指定され、必要であれば、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対するテスト配列についての配列同一性のパーセンテージを算出する。

【0032】

比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、SmithおよびWaterman [Adv. Appl. Math. 2: 484 (1981)] の局所相同性アラインメントアルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch [J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)] のアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman [Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)] の類似性方法についての検索によって、これらのアルゴリズム（GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA - Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705）のコンピュータ実行によって、または目視検査によって行われ得る [Current Protocols; Molecular Biology, F.M. Ausubelら編, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. And John Wiley & Sons, Inc. (1995 Supplement) Ausubelを参照のこと]。 40

【0033】

配列類似性のパーセントを決定するために適切なアルゴリズムの例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズム [Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410頁; およびthe National Center for Biotechnology Informationの「<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>」を参照のこと]。

【0034】

好ましい相同性比較において、同一性は、少なくとも50ヌクレオチド長である配列の領域にわたり存在する。

【0035】

用語「誘導体」とは、問題の誘導またはアップレギュレートされた遺伝子の遺伝子産物であるペプチド（またはそのフラグメントもしくは改変体）を含むペプチドを意味する。したがって、誘導体は、問題のペプチド、および1以上の追加のエピトープを導入し得るさらなるペプチド配列を含み得る。さらなるペプチド配列は、好ましくは、問題のペプチドの基本的なフォールディングおよびこのようなコンホメーション構造を妨害するべきではない。「誘導体」の例は、融合タンパク質、結合体、およびグラフトである。したがって、2以上のペプチド（またはフラグメントもしくは改変体）は、誘導体を形成するために一緒に連結され得る。あるいは、ペプチド（またはフラグメントもしくは改変体）は、関連のない分子（例えば、あるペプチド）に連結され得る。誘導体は、化学的に合成され得るが、代表的には組換え核酸方法によって調製される。脂質、および／または多糖、および／またはポリケチド成分などの追加の成分が含まれ得る。

10

20

【0036】

すべての分子「フラグメント」、「改変体」、および「誘導体」は、共通の抗原性交差反応性、および／またはそれらが由来する問題の誘導またはアップレギュレートされた遺伝子の遺伝子産物と実質的に同じインビボ生物学的活性を有する。例えば、フラグメント、改変体、または誘導体に結合し得る抗体はまた、問題の誘導またはアップレギュレートされた遺伝子の遺伝子産物に結合し得る。フラグメント、改変体、および誘導体がそれぞれ、問題の誘導またはアップレギュレートされたペプチドであるペプチドの活性部位を有することが、好ましい特徴である。あるいは、本発明のペプチドの上記の実施態様のすべては、マイコバクテリア感染の抗原性成分に既に曝露されているTリンパ球の「再現応答（recall response）」を誘導する共通の能力を有する。

30

【0037】

好ましい実施態様では、ペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、および137からなる群より選択される。

【0038】

本発明の第2の局面によれば、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中にその発現が誘導またはアップレギュレートされる、マイコバクテリア遺伝子を同定する方法が提供される。この方法は、以下の工程を包含する：

40

37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、第1のマイコバクテリアを培養する工程；

37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下で、第2のマイコバクテリアを培養する工程；

該第1および第2のマイコバクテリアから、第1および第2のmRNA集団をそれぞれ得る工程；

50

該第1および第2のmRNA集団から、第1および第2のcDNA集団をそれぞれ調製する工程であって、該cDNA調製中に、検出可能な標識が、該第1および第2のcDNA集団のcDNA分子に導入される、工程；

該第1および第2のcDNA集団から、対応する第1および第2のcDNA分子をそれぞれ単離する工程；

該単離された第1および第2のcDNA分子に存在する標識から放出される標識または対応するシグナルの相対量を比較する工程；

該単離された第2のcDNA分子によって提供されるよりも多い量の該単離された第1のcDNA分子によって提供される標識またはシグナルを同定する工程；および

該第1のcDNA、および37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中に誘導またはアップレギュレートされる対応するマイコバクテリア遺伝子を同定する工程。 10

【0039】

本明細書全体を通して、遺伝子をいう場合、オープンリーディングフレーム（ORF）を包含する。

【0040】

本発明の第1の局面について記載された種々の実施態様は、本発明の第2およびそれに続く局面に等しく適用する。

【0041】

「第1および第2のcDNA集団からの対応する第1および第2のcDNA分子」とは、 20
実質的に同じヌクレオチド配列を有するcDNAをいう。したがって、各培養条件（すなわち、高酸素、および低酸素）下で所定の遺伝子に関するcDNAコピーを単離することによって、各培養条件についての遺伝子のcDNAの相対コピー数を定量することが可能である。各cDNAコピーは、mRNA分子から生成されているので、cDNAコピー数は各培養条件についての対応するmRNAコピー数を反映し、したがって、誘導またはアップレギュレートされた遺伝子を同定することが可能である。

【0042】

マイコバクテリウムは、*M. phlei*、*M. smegmatis*、*M. africanum*、*M. caneti*、*M. fortuitum*、*M. marinum*、*M. ulcerans*、*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. microti*、*M. avium*、*M. paratuberculosis*、*M. leprae*、*M. lepraemurium*、*M. intracellulare*、*M. scrofulaceum*、*M. xenopi*、*M. genavense*、*M. kansasii*、*M. simiae*、*M. szulgai*、*M. haemophilum*、*M. asiaticum*、*M. malmoense*、*M. vaccae*、および*M. shimoidei*の種から選択される。 30
特に興味深いのは、MTCのメンバー、好ましくは*M. tuberculosis*である。同様に、本発明のすべての実施態様は、上記の同定されたマイコバクテリアソースに基づき得る。

【0043】

マイコバクテリアを培養するために適切な培地は、Wayne, L.G. (1994) [Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control, the American Society for Microbiologyによって公表, 73-83頁]に記載される。これらは、Middlebrook 7H9 Medium [Barker, L.P. ら (1998) *Molec. Microbiol.*, 29巻(5), 1167-1177頁を参照のこと]、および本発明の出願人のWO 00/52139を包含する。 40

【0044】

1つの実施態様では、第1および第2のcDNA分子は、特定のマイコバクテリア種のゲノム内の各公知の遺伝子（またはORF）を代表する固定化DNA配列を含むアレイとのハイブリダイゼーションによって、対応するcDNA集団から単離される。したがって、第1のcDNAは、両方のcDNAが同じ固定化DNA配列とハイブリダイズするならば、第2のcDNAに「対応する」と考えられる。あるいは、特定のマイコバクテリア株または多くの異なる種および／または株由来の代表的なDNA配列が、アレイで用いられ得る。

【0045】

他の実施態様では、第1および第2のcDNAは、蛍光標識の組込みによって調製される 50

。第1および第2のcDNAは、異なる波長で蛍光を発する標識を組み込み得、それによって2つのDNA試料の二重蛍光および同時検出を可能にする。

【0046】

天然に用いられる標識のタイプは、検出方法の出力が読まれる手段によって決定する。蛍光標識を用いる場合、好ましくは、共焦点レーザースキャナーが用いられる。

【0047】

使用する場合、高酸素培養条件と比較して低酸素培養条件下で少なくとも1.5倍までアップレギュレートされる遺伝子（すなわち、検出アッセイにおいてcDNAによって示される場合）が選択されることが好ましい。より好ましい実施態様では、対応するアップレギュレーション選択基準は、少なくとも2倍、より好ましくは3倍、もっとも好ましくは4倍である。さらなる実施態様では、少なくとも10倍、好ましくは50倍のアップレギュレーションレベルが用いられ得る。 10

【0048】

本発明の好ましい核酸およびペプチド配列は、上で同定したレベルによってアップレギュレートされるものである。

【0049】

1つの実施態様によれば、低および高酸素培養したシステムからの蛍光標識したcDNA配列は、マイコバクテリアゲノムアレイ全体とハイブリダイズすることが可能であった。第1のcDNA集団を、蛍光標識Aで標識し、そして第2のcDNA集団を、蛍光標識Bで標識した。アレイを、各染料の励起可能な極大に対応する2つの異なる波長でスキャンし、そして発光の強度を記録した。各cDNAについて複数のアレイを調製し、そして平均強度値を、各染料での各スポットについての2つのcDNA集団にわたって算出し、それに対する相対誘導またはアップレギュレーションを定量した。 20

【0050】

上記mRNA単離およびcDNA調製および標識付けの他に、ゲノムDNAは、第1および第2のマイコバクテリアから単離され得る。したがって、好ましい実施態様では、標識されたDNAはまた、単離されたDNAから調製される。標識されたDNAは、次いで、コントロールとして各アレイ上に含まれ得る。

【0051】

アップレギュレートまたは誘導された遺伝子を同定するための上記の転写に基づく方法の代替として、mRNAレベルよりもタンパク質レベルで同定が行われ得る。より詳細には、タンパク質試料が、第1および第2のマイコバクテリアから取り出され得、次いで、SDS-PAGEまたは非変性電気泳動のような従来の分離技法、次いでデンシトメーター分析によるような従来の分析にかけられ得る。第1および第2のマイコバクテリアのそれぞれからの特定のタンパク質の相対量を比較することによって、その生成が酸素制限下でアップレギュレートまたは誘導されるこれらのタンパク質が同定され得る。 30

【0052】

低酸素培養条件を規定する好ましい最大溶存酸素圧の閾値は、37℃で測定した5%空気飽和まで、より好ましくは37℃で測定した2%空気飽和まで、および最も好ましくは37℃で測定した1%空気飽和までである。対応する最小DOTは、代表的には37℃で測定した少なくとも0.5%空気飽和、好ましくは37℃で測定した少なくとも1%空気飽和である。 40

【0053】

同様に、高酸素培養条件を規定する好ましい最小溶存酸素圧閾値は、37℃で測定した45%空気飽和、およびより好ましくは37℃で測定した50%空気飽和である。

【0054】

培養培地のpHは、好ましくはpH6~8、より好ましくはpH6.5~7.5、最も好ましくは約pH6.9に維持される。

【0055】

本発明の好ましい核酸およびペプチド配列は、上で同定されたDOTおよびpH条件下で 50

アップレギュレートされるものである。

【0056】

本発明の第3の局面によれば、マイコバクテリアペプチドのインヒビターが提供され、該ペプチドは、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中にその発現が誘導またはアップレギュレートされる遺伝子によってコードされ、そして該インヒビターは、該マイコバクテリアペプチドが本来有する生物学的効果を発揮することを抑制または阻害し得る。

【0057】

マイコバクテリアペプチドの阻害は、核酸レベルで（すなわち、DNA、またはRNA） 10、またはペプチドレベルで行われ得る。

【0058】

1つの実施態様では、インヒビターは、1以上のアシルキャリアタンパク質、モノオキシゲナーゼ、マイコバクチン合成タンパク質、転写レギュレーター、酸化還元酵素、アシルCoAデヒドロゲナーゼ、エステラーゼ／アセチルヒドロラーゼ、シトクロムD、メチルトランスフェラーゼ、トランスアミナーゼ、PPEタンパク質、バリル-tRNAシンセターゼ、グアニル酸キナーゼ、ケトール酸レダクトイソメラーゼ、ABCトランスポーター、ATP-結合タンパク質、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、σ因子、ピルビン酸キナーゼ、熱ショックタンパク質、およびアミノトランスフェラーゼを阻害し得る。

【0059】

さらなる実施態様では、インヒビターは、本発明によって同定可能な誘導またはアップレギュレートされたマイコバクテリア遺伝子、またはその遺伝子産物をターゲティングし得る抗生物質であり得る。抗生物質は、好ましくは、遺伝子および／または遺伝子産物に特異的である。

【0060】

本発明のインヒビターは、本明細書で提供される配列情報を利用して調製され得る。例えば、これは、ペプチドを過剰発現させ、ペプチドを精製し、次いで精製されたペプチドにおけるX線結晶解析を行うことによって、その分子構造が得られ得る。次に、ポリペプチドのすべてまたは一部あるいはその基質に類似する分子構造を有する化合物が生成される。次いで、この化合物は、ペプチドと組み合わせられ、そしてペプチドに付着して、1以上のその生物学的活性をブロックし得る。 30

【0061】

低酸素圧下での誘導／アップレギュレーション（すなわち、ビルレンス）に関連する配列を含有するマイコバクテリア染色体の領域に結合する単離されたポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドも、本発明の範囲に包含され、アンチセンスおよび三重鎖形成ポリヌクレオチドが挙げられる。本明細書で使用する場合、用語「結合」とは、水素結合または他の分子力によって媒介される、オリゴヌクレオチドとターゲットヌクレオチド配列との間の相互作用または複合体生成をいう。用語「結合」とは、より詳細には、塩基-塩基水素結合によって媒介される2つのタイプのヌクレオチド間結合をいう。第1のタイプの結合は、「ワトソン-クリックタイプ」結合相互作用であり、これは、アデニン-チミン（またはアデニン-ウラシル）およびグアニン-シトシンの塩基対が、塩基間の水素結合によって形成される。このタイプの結合の例は、DNA二重らせんおよびRNA-DNAハイブリッドに伝統的に関連する結合であり；このタイプの結合は、通常は、ハイブリダイゼーション手順によって検出される。 40

【0062】

第2のタイプの結合は、「三重鎖結合」である。一般的に、三重鎖結合とは、第3のポリヌクレオチド鎖と、ワトソン-クリック様式で既に対となっている二重鎖DNA（またはDNA-RNAハイブリッド）との、任意のタイプの塩基-塩基水素結合をいう。

【0063】

好ましい実施態様では、インヒビターは、誘導可能またはアップレギュレート可能な遺伝 50

子の少なくとも一部に相補的であるアンチセンス核酸配列であり得る。

【0064】

使用するインヒビターは、核酸配列の形態である場合、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも20ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも30ヌクレオチド、および最も好ましくは少なくとも50ヌクレオチドを含む。

【0065】

本発明の第4の局面によれば、遺伝子によってコードされるペプチドに、または該ペプチドのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体に結合する抗体が提供され、該遺伝子の発現は、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中に誘導またはアップレギュレートされる。 10

【0066】

抗体は、好ましくは、問題のペプチドに特異性を有し、そしてそこへの結合によって、マイコバクテリアのコーティングを開始し得る。細菌のコーティングは、好ましくは、そのオプソニン化を導く。これは、次には、細菌の破壊に至る。抗体が、ターゲティングされるマイコバクテリア（例えば、種および／または株）に特異的であることが好ましい。

【0067】

抗体によるオプソニン化は、マクロファージにおけるレセプター媒介侵入および複製を抑制または調節することによって、食細胞および非食細胞におけるマイコバクテリアの細胞侵入および蔓延に影響し得る。 20

【0068】

本発明のペプチド、フラグメント、改変体、または誘導体は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む抗体を産生するために使用され得る。ポリクローナル抗体が所望である場合は、選択された哺乳動物（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど）に、免疫原性ポリペプチドを免疫する。免疫した動物からの血清を収集し、そして公知の手順に従って処理する。所望のマイコバクテリアエピトープに対するポリクローナル抗体を含む血清が他の抗原に対する抗体を含む場合は、ポリクローナル抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによって精製され得る。

【0069】

あるいは、ハイブリドーマによってモノクローナル抗体を作成するための一般的方法論（例えば、細胞融合による不死化抗体産生細胞株の調製）、または他の技法（例えば、発癌性DNAでのBリンパ球の直接形質転換、またはエプスタインバーウイルスでのトランスフェクション）が用いられ得る。 30

【0070】

本発明のこの局面に用いられる抗体は、任意の抗体イソタイプファミリーに属し得るか、あるいはその誘導体または模倣物であり得る。本明細書全体を通して抗体というときは、組換え産生抗体、およびマイコバクテリア抗原に結合し得る抗体の任意の部分を含む。

【0071】

1つの実施態様では、抗体は、IgG、IgM、またはIgAイソタイプファミリーに属する。 40

【0072】

好ましい実施態様では、抗体は、IgAイソタイプファミリーに属する。本明細書全体を通してIgAイソタイプというときは、この抗体の分泌形態（すなわち、sIgA）を含む。sIgAの分泌コンポーネント（SC）は、インビトロまたはインビボで付加され得る。後者の場合、患者の天然のSC標識機構の使用が用いられ得る。

【0073】

1つの実施態様では、抗体は、MTCのメンバー由来のペプチド、好ましくはM. tuberculosisに対して惹起され得る。

【0074】

好ましい実施態様では、抗体は、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、および 137 からなる群より選択されるペプチド（またはそのフラグメント、改変体、もしくは誘導体）に結合し得る。

【0075】

さらなる実施態様では、抗原は、マイコバクテリア病原菌の露出したコンポーネントである。他の実施態様では、抗原は、マイコバクテリア病原菌の細胞表面コンポーネントである。

【0076】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。

【0077】

いかなる理論にも縛られることはないが、マイコバクテリアがマクロファージに感染した後、マクロファージは殺され、そして病原菌が放出されることが可能である。この段階では、マイコバクテリアは、抗体攻撃に対して最も脆弱であると考えられる。したがって、本発明の抗体は、マクロファージの死後に放出された病原菌に作用し、そしてそれによって感染後効果を発揮することが可能である。

【0078】

感染したマクロファージに潜伏しているマイコバクテリア病原菌上の抗原に対して本発明の抗体の接近性が增強されていることによって、本発明の受動防御局面（すなわち、抗体の送達）は、容易になり得る。実際、a c r 発現は対数増殖中は低い、定常期または酸素制限状態で増加し、特にマクロファージ内で複製する生物において増加する。a c r 発現はマイコバクテリア感染性に必要と考えられ、抗体結合は、そのオリゴマー構造の立体障害または破壊によってマクロファージへの感染をブロックし得ることが可能である。したがって、感染したマクロファージが殺され、放出されたマイコバクテリア病原菌に作用する抗体は、新鮮なマクロファージへの再感染の蔓延を妨害し得る。この仮説は、抗体と、感染後早期に作用する細胞傷害性 T 細胞（例えば、 $\gamma \delta$ および NK T 細胞）との間の相乗作用を含むが、後者は C D 8 および C D 4 細胞傷害性 T 細胞もまた含み得る。

【0079】

本発明の第 5 の局面によれば、遺伝子が改変されてマイコバクテリアが実質的に非病原性になる弱毒化マイコバクテリアが提供される。この遺伝子は、37℃で測定した少なくとも 40% 空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した 10% 空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中に、その発現が誘導またはアップレギュレートされる遺伝子である。

【0080】

用語「改変された」とは、マイコバクテリアを実質的に非病原性にする核酸または核酸配列の置換、欠失、または挿入などの任意の遺伝子操作をいう。1 つの実施態様では、誘導可能またはアップレギュレート可能な遺伝子全体が欠失され得る。

【0081】

好ましい実施態様では、改変されるべき遺伝子は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、および 138 からなる群の 1 つに対応する野生型コード配列を有する。

【0082】

野生型配列が、用いられるデータベースに依存してマイナーな改変を含み得ることが理解される。

【0083】

本発明の第6の局面によれば、弱毒化微生物キャリアが提供され、これは、遺伝子によってコードされるペプチド、または該ペプチドのフラグメント、改変体、もしくは誘導体を含み、この遺伝子の発現は、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中に誘導またはアップレギュレートされる。

10

【0084】

使用する場合、ペプチド（またはフラグメント、改変体、もしくは誘導体）は、このキャリアの表面に少なくとも部分的に露出するか、またはキャリアがインビボで分解されてペプチド（またはフラグメント、改変体、もしくは誘導体）の少なくとも一部が宿主の免疫系に曝露されるかのいずれかである。

【0085】

1つの実施態様では、弱毒化微生物キャリアは、弱毒化サルモネラ、弱毒化ワクシニアウイルス、弱毒化鶏痘ウイルス、または弱毒化M. bovis（例えば、BCG株）からなる群より選択される。

【0086】

好ましい実施態様では、ペプチドは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、および137（またはそのフラグメント、改変体、もしくは誘導体）からなる群より選択される。

20

【0087】

本発明の第7の局面によれば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、および遺伝子または該遺伝子のフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体をコードするDNA配列を含むDNAプラスミドが提供され、この遺伝子の発現は、37℃で測定した少なくとも40%空気飽和の溶存酸素圧下で連続培養した場合と比較して、37℃で測定した10%空気飽和までの溶存酸素圧によって規定される連続培養条件下でのマイコバクテリアの培養中に誘導またはアップレギュレートされ、ここで、該プロモーターおよびポリアデニル化シグナルは、該DNA配列に作動可能に連結される。

30

【0088】

本発明で使用する用語DNA「フラグメント」は、通常、少なくとも約5コドン（15ヌクレオチド）、より通常には少なくとも約7~15コドン、および最も好ましくは少なくとも約35コドンを含む。このヌクレオチド数は、通常、このような配列と特異的にハイブリダイズする好ましいプローブに必要とされるほぼ最小長である。

40

【0089】

好ましい実施態様では、DNA「フラグメント」は、対応する誘導／アップレギュレートされた遺伝子のコード配列の少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、およびより好ましくは少なくとも80%であるヌクレオチド長を有する。

【0090】

用語DNA「改変体」とは、誘導／アップレギュレートされた遺伝子のコード配列（またはそのフラグメント）と実質的に相同なまたは実質的に類似するDNA配列を意味する。核酸またはそのフラグメントは、他の核酸（またはその相補鎖）と（適切なヌクレオチド挿入または欠失とともに）最適にアラインした場合に、少なくとも約60%のヌクレオチ

50

ド塩基、通常は少なくとも約70%、より通常には少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、およびより好ましくは少なくとも約95~98%のヌクレオチド塩基にヌクレオチド配列同一性があるならば、もう一方に「実質的に相同」（または「実質的に類似」）である。相同性決定は、ペプチドについて上記のように行われる。

【0091】

あるいは、DNA「改変体」は、選択的ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズし得る場合、誘導／アップレギュレートされた遺伝子のコード配列（またはそのフラグメント）と、実質的に相同（または実質的に類似）である。ハイブリダイゼーションの選択性は、ハイブリダイゼーションが生じる場合に存在し、全体的に特異性がない場合よりも実質的により選択的である。代表的には、少なくとも約14ヌクレオチドの長さに渡って 10
少なくとも約65%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約75%、および最も好ましくは少なくとも約90%の相同性がある場合に、選択的ハイブリダイゼーションが生じる。Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12: 203-213を参照のこと。上記のように、相同性比較の長さは、より長い長さにわたるものであり得、そしてある実施態様では、しばしば、少なくとも約17ヌクレオチド、通常は少なくとも約20ヌクレオチド、より通常には少なくとも約24ヌクレオチド、代表的には少なくとも約28ヌクレオチド、より代表的には少なくとも約32ヌクレオチド、および好ましくは少なくとも約36以上のヌクレオチドの長さにわたる。

【0092】

核酸ハイブリダイゼーションが、塩基組成、相補鎖の長さ、およびハイブリダイズしている核酸間のヌクレオチド塩基ミスマッチの数の他に、塩濃度（例えば、NaCl）、温度、または有機溶媒のような条件によって影響を受けることは、当業者には容易に理解される。好ましくは、ストリンジェントな温度条件が用いられ、そして一般的には30℃を超える、代表的には37℃を超える、および好ましくは45℃を超える温度を含む。ストリンジェントな塩条件は、普通には1000mM以下、代表的には500mM以下、および好ましくは200mM以下である。pHは、代表的には7.0~8.3である。しかし、パラメータの組み合わせは、任意の単一のパラメータの基準よりも非常に重要である。例えば、WetmurおよびDavidson (1968) J. Mol. Biol. 31: 349-370を参照のこと。 20

【0093】

用語DNA「誘導体」とは、誘導／アップレギュレートされた遺伝子のコード配列に対応するDNA配列（またはそのフラグメントもしくは改変体）およびコード配列に対応するDNA配列に天然には随伴しない追加のDNA配列を含む、DNAポリヌクレオチドを意味する。上記のペプチド誘導体についてのコメントがまた、DNA「誘導体」に適用される。「誘導体」は、例えば、酸素制限中に誘導されるマイコバクテリアオペロンの2以上のコード配列を含み得る。したがって、コード配列間の非コード領域の存在または不在に依存して、このような「誘導体」の発現産物は、融合タンパク質、または個々のコード領域によってコードされる別々のペプチド産物であり得る。 30

【0094】

上記の用語DNA「フラグメント」、「改変体」、および「誘導体」は、互いに共通して、得られるペプチド産物が対応する野生型ペプチドと実質的に同じ交差反応性抗原性特性を有する。好ましくは、本発明の上記DNA分子実施態様のすべてのペプチド産物は、野生型ペプチドにも結合する抗体と結合する。あるいは、上記のペプチド産物のすべては、マイコバクテリア感染の抗原性成分に既に曝露されているTリンパ球の「再現応答」を誘導し得る。 40

【0095】

プロモーターおよびポリアデニル化シグナルは、好ましくは、遺伝子が真核生物細胞中で発現されることを確実にするように選択される。強力なプロモーターおよびポリアデニル化シグナルが好ましい。

【0096】

関連の局面では、本発明は、本発明のDNA配列、または該DNA配列のフラグメントも 50

しくは改変体もしくは誘導体によってコードされる単離されたRNA分子を提供する。

【0097】

「単離された」RNAは、目的の配列と天然に随伴する他のマイコバクテリア成分（例えば、リボソーム、ポリメラーゼ、ならびにDNAおよび他の染色体配列のような他のマイコバクテリアポリヌクレオチド）から実質的に分離されるRNAである。

【0098】

上記RNA分子は、例えば、ワクチン成分のような宿主細胞に直接導入され得る。

【0099】

あるいは、RNA分子は、投与前にRNAベクターに組込まれ得る。

【0100】

本発明のポリヌクレオチド配列（DNAおよびRNA）としては、その天然に存在する環境から取り出されている核酸配列、および組換えまたはクローン化DNA単離物、および化学的に合成されたアナログまたは異種系によって生物学的に合成されたアナログが挙げられる。

【0101】

本明細書で用いる場合、用語「組換え体」とは、その起源または操作によって、（１）天然に随伴するポリヌクレオチドのすべてまたは一部と随伴しない；または、（２）天然に連結される以外のポリヌクレオチドに連結される；および（３）天然に存在しない、ゲノム、cDNA、半合成、または合成起源のポリヌクレオチドを意図する。この人工的な組み合わせは、しばしば、化学合成手段、あるいは核酸の単離されたセグメントの人工的な操作（例えば、遺伝子操作技法）のいずれかによって達成される。通常、この操作は、コドン、同じまたは保存的アミノ酸をコードする重複コドンで置換するために行われるが、代表的には、配列認識部位を導入または除去する。あるいは、機能の所望の組み合わせを生成するために所望の機能の核酸セグメントと一緒に連結するために行われる。

【0102】

本発明の実施態様では、ポリヌクレオチドは、低酸素圧下で誘導またはアップレギュレートされるペプチドをコードし得る。核酸は、その天然の状態または操作された場合に、転写および／または翻訳されて、ペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体を生成し得るならば、ペプチドを「コードする」という。このような核酸のアンチセンス鎖も、配列をコードするという。

【0103】

目的のポリヌクレオチドを含む発現ベクターも、本発明の範囲内に意図される。発現ベクターは、一般的には、適切な転写および翻訳調節エレメントに作動可能に連結されるペプチドをコードする、複製可能なポリヌクレオチド構築物である。発現ベクターに通常含まれる調節エレメントの例は、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、および転写および翻訳開始および終止配列である。これらの調節エレメントは、翻訳される配列に作動可能に連結される。核酸配列は、他の核酸配列と機能的関連に配置される場合、作動可能に連結される。例えば、プロモーターがその転写または発現に影響を及ぼすならば、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結される。一般的に、作動可能に連結されとは、連結されているDNA配列が連続的であり、そして２つのタンパク質コード領域を連結することが必要な場合、連続的かつリーディングフレーム内であることを意味する。ビルレンス因子をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターに用いられる調節エレメントは、発現に用いられる宿主細胞において機能的である。

【0104】

本発明のポリヌクレオチドは、当該技術分野で公知の任意の手段によって調製され得る。例えば、大量のポリヌクレオチドは、適切な宿主細胞中での複製によって産生され得る。所望のフラグメントをコードする天然または合成DNAフラグメントは、原核生物または真核生物細胞に導入およびそこで複製し得る、組換え核酸構築物、代表的には、DNA構築物に組込まれる。通常は、DNA構築物は、単細胞宿主（例えば、酵母または細菌）中での自律複製に適切であるが、培養された昆虫、哺乳動物、植物、または他の真核生物の

10

20

30

40

50

細胞株のゲノム内への導入および組込みについても意図され得る。

【0105】

本発明のポリヌクレオチドはまた、例えば、ホスホルアミダイト法またはトリエステル法によって、化学合成によって生成され得、そして市販の自動オリゴヌクレオチド合成機で合成され得る。二本鎖フラグメントは、相補鎖を合成しそして適切な条件下でこの鎖と一緒にアニールすること、または適切なプライマー配列とともにDNAポリメラーゼを用いて相補鎖を加えることのいずれかによって、化学合成の一本鎖産物から得られ得る。

【0106】

原核生物または真核生物宿主への導入のために調製されるDNA構築物は、代表的には、宿主によって認識される複製システムを含み、これは、所望のペプチドをコードする目的のDNAフラグメントを含み、そして好ましくは、ポリペプチドコードセグメントに作動可能に連結される転写および翻訳開始調節配列も含む。発現ベクターは、例えば、複製起点または自律複製配列（ARS）および発現調節配列、プロモーター、エンハンサー、ならびに必要なプロセッシング情報部位、例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、転写終止配列、およびmRNA安定化配列を含み得る。選択した宿主細胞から分泌されるポリペプチドからの分泌シグナルも、適切である場合、含まれ得、したがって細胞膜にタンパク質を交差および／または留まらせ、したがって、その機能的トポロジーを獲得しまたは細胞から分泌される。

10

【0107】

適切なプロモーターおよび他の必要なベクター配列は、宿主中で機能的であるように選択され、そして、適切である場合、マイコバクテリア遺伝子と天然に随伴する配列を含み得る。trp、lac、およびファージプロモーターのようなプロモーター、tRNAプロモーター、および解糖系酵素プロモーターは、原核生物宿主で使用され得る。有用な酵母プロモーターとしては、メタロチオネイン、3-ホスホグリセレートキナーゼ、または他の解糖系酵素（例えば、エノラーゼまたはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ）、マルトースおよびガラクトース利用に寄与し得る酵素などについてのプロモーター領域が挙げられる。

20

【0108】

適切な非天然哺乳動物プロモーターとしては、SV40由来の初期および後期プロモーター、またはマウスモロニー白血病ウイルス、マウス乳癌ウイルス、トリ肉種ウイルス、アデノウイルスII、ウシパピローマウイルス、またはポリオーマ由来のプロモーターが挙げられ得る。さらに、構築物は、増幅可能な遺伝子（例えば、DHFR）に連結され得、そのため遺伝子の複数のコピーが作成され得る。

30

【0109】

このような発現ベクターは自律複製し得るが、これらは宿主細胞のゲノムに挿入されることによってはあまり複製され得ない。

【0110】

発現およびクローニングベクターは、好ましくは、選択可能マーカー、すなわち、ベクターで形質転換される宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする遺伝子を含む。この遺伝子の存在は、挿入物を発現する宿主細胞のみの増殖を確実にする。代表的な選択遺伝子は、（a）抗生物質または他の毒性物質、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートなどに耐性を与える；（b）栄養欠失を補う；または（c）複合培地から利用可能でない重要な栄養を供給するタンパク質をコードする（例えば、バシラス属についてのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）。適切な選択可能マーカーの選択は、宿主細胞に依存する。

40

【0111】

目的の核酸を含むベクターは、インビトロで転写され得、そして得られるRNAは宿主細胞に（例えば、注入によって）導入され得るか、あるいは、ベクターは、細胞宿主のタイプに依存して異なる方法によって宿主細胞に直接導入され得、これらの方法としては、エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE

50

ーデキストラン、または他の物質を用いるトランスフェクション；マイクロインジェクタイロボンバードメント；リポフェクション；感染（ここではベクターは、レトロウイルスゲノムのような感染性因子である）が挙げられる。上記の核酸が導入されている細胞は、このような細胞の子孫も包含することを意味する。

【0112】

本発明の大量の核酸およびペプチドは、適合可能な原核生物または真核生物宿主細胞においてベクターまたは他の発現ベヒクル中で核酸またはその一部を発現させることによって調製され得る。最も一般的に用いられる原核生物宿主は、*Escherichia coli*の株であるが、*Bacillus subtilis*またはシュードモナス属のような他の真核生物も使用され得る。

【0113】

哺乳動物または他の真核生物宿主細胞、例えば、酵母、糸状菌、植物、昆虫、両生類、または鳥類の種の細胞もまた、本発明のタンパク質の産生に有用であり得る。培養物中における哺乳動物細胞の増殖は、それ自体周知である。通常用いられる哺乳動物宿主細胞株の例は、VEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、およびWI38、BHK、およびCOS細胞株であるが、例えば、より高発現、所望のグリコシル化パターンを提供するために、他の細胞株が適切であり得る。

【0114】

クローンは、ベクター構築物の態様に依存してマーカーを使用することによって選択される。マーカーは、同じまたは異なるDNA分子、好ましくは同じDNA分子上にあり得る。形質転換体は、スクリーニングされ、あるいは、好ましくは、当業者に周知の任意の手段によって、例えば、アンピシリン、テトラサイクリンのような抗生物質への耐性によって、選択され得る。

【0115】

本発明のポリヌクレオチドは、例えば、形質転換、形質導入、およびエレクトロポレーションを含む、当該技術分野で公知の任意の手段によって、宿主細胞に挿入され得る。本明細書で使用する場合、「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」、および微生物または単細胞体として培養された高等真核生物細胞株を示す他のこのような用語は、組換えベクターまたは他のトランスファーDNAについてのレシピエントとして使用され得るまたは使用されている細胞をいい、そして形質転換されている元の細胞の子孫を包含する。単一の親細胞の子孫は、天然、偶然、または意図的な変異のため、形態学的にまたはゲノムもしくはDNA相補物全体において、元の親と必ずしも完全に同一でなくてもよい。本明細書で使用する場合、「形質転換」とは、挿入に使用される方法、例えば、直接取り込み、形質導入、*f*-接合、またはエレクトロポレーションにかかわらず、宿主細胞への外因性ポリヌクレオチドの挿入をいう。外因性ポリヌクレオチドは、非組込みベクター、例えば、プラスミドとして維持され得るか、あるいは、宿主細胞ゲノム中に組込まれ得る。

【0116】

1つの実施態様では、DNAプラスミドまたはRNAベクターは、ペプチドでのチャレンジ後に免疫応答に特異的である免疫系の成分をコードし得、該ペプチドは、マイコバクテリアの増殖の酸素制限中に誘導またはアップレギュレートされるマイコバクテリア遺伝子によってコードされる。

【0117】

このような成分の例は、誘導またはアップレギュレートされる遺伝子のペプチド産物に対する抗体である。したがって、1つの実施態様では、核酸配列（例えば、DNAプラスミドまたはRNAベクター）は、問題のペプチドをコードする。

【0118】

本発明の第8の局面は、マイコバクテリア感染を治療または予防するための医薬品の製造における、本発明のペプチド、インヒビター、抗体、弱毒化マイコバクテリア、弱毒化微生物キャリア、誘導またはアップレギュレートされた遺伝子のコード配列に対応するDNA配列または該DNA配列のフラグメントもしくは改変体もしくは誘導體、該DNA配列

10

20

30

40

50

または該フラグメントもしくは改変体もしくは誘導体を含むDNAプラスミド、該DNA配列または該フラグメントもしくは改変体もしくは誘導体によってコードされるRNA配列、および／または該RNA配列を含むRNAベクターの使用を提供する。

【0119】

用語「予防する」とは、マイコバクテリア感染の重篤度／強度、またはその開始を減少させることを包含する。

【0120】

用語「治療する」とは、マイコバクテリア感染の感染後治療および改善を包含する。

【0121】

関連の局面では、マイコバクテリア感染の治療または予防方法が提供され、この方法は、本発明のペプチド、インヒビター、抗体、弱毒化マイコバクテリア、弱毒化微生物キャリア、誘導またはアップレギュレートされた遺伝子のコード配列に対応するDNA配列または該DNA配列のフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体、該DNA配列または該フラグメントもしくは改変体もしくは誘導体を含むDNAプラスミド、該DNA配列または該フラグメントもしくは改変体もしくは誘導体によってコードされるRNA配列、および／または該RNA配列を含むRNAベクターからなる群より選択される医薬品の患者への投与を包含する。

10

【0122】

医薬品は、従来の経路、例えば、静脈内、腹腔内、鼻内経路によって投与され得る。

【0123】

本発明のペプチドのエピトープの免疫原性は、例えば、B型肝炎表面抗原と結合されるような粒子形成タンパク質と融合または会合される、哺乳動物または酵母系においてペプチドを調製することによって増強され得る。ワクチンは、本発明の1以上の免疫原性ペプチドから調製され得る。

20

【0124】

代表的には、このようなワクチンは、溶液または懸濁液のいずれかとして注射可能薬物として調製され；注射前に溶液または懸濁液とするのに適切な固体形態も調製され得る。調製物はまた、乳化され得、あるいはペプチドはリポソーム中にカプセル化される。活性な免疫原性成分は、しばしば、薬学的に受容可能でありそして活性成分と適合可能な賦形剤と混合される。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩液、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせである。さらに、所望であれば、ワクチンは、湿潤または乳化剤、pH緩衝剤、および／またはワクチンの効果を増強するアジュバントなどの少量の補助物質を含み得る。効果的であり得るアジュバントの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：水酸化アルミニウム、N-アセチル-L-アラニン-L-トレオニン-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-アセチル-L-アラニン-L-アラニン-D-イソグルタミン (CGP 11637、nor-MDPという)、N-アセチル-L-アラニン-L-アラニン-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (CGP 19835A、MTP-PEという)、およびRIBI (これは、2%スクワレン/Tween (登録商標) 80エマルジョン中に、細菌から抽出された3つの成分、モノホスホリルリポドA、トレハロースジミコレート、および細胞壁骨格 (MPL+TDM+CWS) を含む)。

30

40

【0125】

ワクチンは、従来どおり、注射によって、例えば、皮下または筋肉内のいずれかに、非経口投与される。他の態様の投与に適切であるさらなる処方物としては、座剤、およびある場合には、経口処方物またはエアロゾルのような分布に適切な処方物が挙げられる。座剤については、伝統的な結合剤およびキャリアとして、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドが挙げられ得；このような座剤は、0.5%~10%、好ましくは1%~2%の範囲で活性成分を含む混合物から形成され得る。経口処方物は、例えば、薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカ

50

リンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような通常用いられる賦形剤を含む。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性処方物、または粉剤の形態をとり、そして10%～95%、好ましくは25%～70%の活性成分を含む。

【0126】

ペプチドは、中性または塩形態としてワクチン中に処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基と形成される）が挙げられ、そしてこれは、例えば、塩酸またはリン酸のような無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸などのような有機酸と形成される。遊離のカルボキシル基と形成される塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から誘導され得る。

10

【0127】

ワクチンは、投与処方物と適合可能な様式で、および予防的および／または治療的に効果的な量で投与される。投与されるべき量は、一般的には、用量あたり5 μ gから250 μ gの範囲であるが、治療されるべき被験者、被験者の免疫系が抗体を合成する能力、および所望の防御の程度に依存する。投与に必要とされる活性成分の正確な量は、主治医の判断に依存し、そして各被験者に特有であり得る。

【0128】

ワクチンは、単回投与スケジュールで、好ましくは多回投与スケジュールで投与され得る。多回投与スケジュールは、ワクチン接種の初回のコースは1～10の別々の投与量であり得、次いで免疫応答を維持および／または再強化するために必要なその後の時間間隔で他の投与が行われ、例えば、2回目の投与については1～4カ月目であり、必要ならば、数カ月後にその後の1または複数回の投与が行われる。投与方法はまた、少なくとも一部は、個体の必要によって決定され、そして主治医の判断に依存する。

20

【0129】

さらに、1または複数の免疫原性マイコバクテリア抗原を含むワクチンは、他の免疫調節剤、例えば、免疫グロブリンおよび抗生物質とともに投与され得る。

【0130】

抗体含有組成物を投与する結果は、感染の部位に対する抗体の伝搬の効率に依存し得る。マイコバクテリア呼吸器感染（例えば、*M. tuberculosis*感染）の場合、これは、肺への抗体の効率的な伝搬によって容易にされ得る。

30

【0131】

1つの実施態様では、医薬品は、鼻内（i.n.）投与され得る。この態様の送達は、*M. tuberculosis*感染の送達の経路に対応し、そして、抗体送達の場合、抗体が感染部位に存在して、細菌が細胞内に入る前および細胞間に広がる期間中にも、細菌と戦うことを確実にする。

【0132】

鼻内組成物は、100～5000 μ m、好ましくは500～4000 μ m、より好ましくは1000～3000 μ mの範囲のおおよその直径を有する液滴形態で投与され得る。あるいは、容量では、液滴は、0.001～100 μ l、好ましくは0.1～50 μ l、より好ましくは、1.0～25 μ lのおおよその範囲である。

40

【0133】

鼻内投与は、鼻液滴を塗布することによって、または鼻噴霧によって達成され得る。

【0134】

鼻液滴の場合、液滴は、代表的には、約1000～3000 μ mの直径および／または1～25 μ lの容量を有し得る。

【0135】

鼻噴霧の場合、液滴は、代表的には、約100～1000 μ mの直径および／または0.001～1 μ lの容量を有し得る。

50

【0136】

抗体のi.n.送達後、肺への通過は、粘膜分泌の逆流によって容易にされるが、気道における粘膜纖毛作用は、粘液内の粒子を肺から取り除くと考えられる。肺洗浄における比較的長い持続、胆汁からの速いクリアランス、およびいくつかの抗体の唾液への輸送の欠損は、粘膜部位特異的な役割を示唆する。

【0137】

異なる実施態様では、医薬品は、エアロゾル処方物で送達され得る。エアロゾル処方物は、粉剤、懸濁剤、または液剤の形態をとり得る。

【0138】

エアロゾル粒子のサイズは、エアロゾルの送達能力に関連する1つの因子である。したがって、より小さい粒子は、より大きな粒子よりも、肺胞に向かって気道をさらに下方へ移動し得る。1つの実施態様では、エアロゾル粒子は、気管支、細気管支、および肺胞の全長に沿った送達を容易にするための直径分布を有する。あるいは、粒子サイズ分布は、気道の特定の部分、例えば、肺胞をターゲティングするために選択され得る。

10

【0139】

エアロゾル粒子は、噴霧吸入器または鼻噴霧によって送達され得る。

【0140】

医薬品のエアロゾル送達の場合、粒子は、0.1～50 μm 、好ましくは1～25 μm 、より好ましくは1～5 μm のおおよその範囲の直径を有し得る。

【0141】

本発明の医薬品のエアロゾル処方物は、必要に応じて、噴射剤および／または界面活性剤を含み得る。

20

【0142】

患者に投与されるべき液滴のサイズを本発明の所定の範囲に制御することによって、肺胞への不用意な抗原送達を回避／最小化し、したがって、肺の炎症および線維形成瘢痕化のような肺胞に関連する病理学的問題を回避できる。

【0143】

i.n.ワクチン接種は、鼻および気管支関連粘膜組織におけるTおよびB細胞の両方が媒介するエフェクターメカニズムに適合し、これは、他の粘膜関連リンパ様組織とは異なる。

【0144】

鼻内投与経路によって誘起される防御メカニズムとしては、優先的な肺ホーミングを有するTリンパ球の活性化；共刺激性分子、例えば、B7.2のアップレギュレーション；および／またはマクロファージまたは分泌性IgA抗体の活性化が挙げられ得る。

30

【0145】

抗原の鼻内送達によって、粘膜抗体応答が容易に誘起され得るが、これは、T細胞応答における抗体産生を助けるTh2表現型へのシフトによる。粘膜応答は、増強されたIgA産生によって特徴づけられ、そしてTh2応答は、増強されたIL-4産生によって特徴づけられる。

【0146】

マイコバクテリア抗原の鼻内送達は、抗原を呼吸器系の粘膜下B細胞にターゲティングさせ得る。これらのB細胞は、哺乳動物において主要な局所IgA産生細胞であり、そして鼻内送達は、マイコバクテリア抗原に対するこれらの細胞によるIgA産生を迅速な増加を容易にする。

40

【0147】

1つの実施態様では、マイコバクテリア抗原を含む医薬品の投与は、IgA抗体産生を刺激し、そしてIgA抗体は、マイコバクテリア抗原に結合する。他の実施態様では、粘膜および／またはTh2免疫応答が刺激される。

【0148】

他の実施態様では、モノクローナル抗体は、特に、抗イディオタイプ抗体を惹起するために使用され得る。抗イディオタイプ抗体は、免疫グロブリンであり、防御が所望される感

50

染性因子の抗原の「内部イメージ」を有する。これらの抗イディオタイプ抗体も、マイコバクテリア感染の治療、ワクチン接種、および／または診断に有用であり得る。

【0149】

第9の実施態様によれば、本発明のペプチドおよびそれに対する抗体は、マイコバクテリアに対する抗体の存在、または生物学的試料におけるビルレンスに関連する抗原の存在を検出するためのイムノアッセイに有用である。イムノアッセイの設計は、非常に多くのバリエーションがあり、そして多くの形式が当該技術分野で知られている。イムノアッセイは、本発明のペプチドに由来する少なくとも1つのエピトープを利用し得る。1つの実施態様では、イムノアッセイは、このようなエピトープの組み合わせを使用する。これらのエピトープは、同じまたは異なる細菌ペプチドに由来し得、そして別々の組換えまたは天然のペプチド中に、あるいは同じ組換えペプチド中に一緒に存在し得る。 10

【0150】

イムノアッセイは、例えば、1または複数のビルレンス関連ペプチドエピトープに対するモノクローナル抗体、1つのマイコバクテリア抗原の複数のエピトープに対するモノクローナル抗体の組み合わせ、複数の異なるマイコバクテリア抗原のエピトープに対する複数のモノクローナル抗体、同じ抗原に対する複数のポリクローナル抗体、または複数の異なる抗原に対するポリクローナル抗体を使用し得る。プロトコルは、例えば、競合、または直接反応、またはサンドイッチタイプアッセイに基づき得る。プロトコルはまた、例えば、固体支持体を使用し得、あるいは免疫沈降によるものであり得る。ほとんどのアッセイは、標識された抗体またはポリペプチドの使用を包含し；標識は、例えば、酵素、蛍光、化学発光、放射活性、または染料分子であり得る。プローブからのシグナルを増幅するアッセイも公知であり；その例は、ビオチンおよびアビジン、ならびにE L I S Aアッセイのような酵素で標識および媒介されるイムノアッセイを利用するアッセイである。 20

【0151】

代表的には、ペプチドに対する1または複数の抗体についてのイムノアッセイは、生物学的試料のような抗体を含むと思われるテスト試料を選択および調製する工程、次いで抗原-抗体複合体を形成することが可能な条件下で1または複数の抗原性（すなわち、エピトープ含有）ペプチドと共に試料をインキュベートする工程、およびこのような複合体の形成を検出する工程を包含する。イムノアッセイは、標準または競合タイプであり得る。

【0152】

ペプチドは、代表的には、インキュベーション後の試料からのペプチドの分離を容易にするために固体支持体に結合されている。使用され得る固体支持体の例は、ニトロセルロース（例えば、メンブランまたはマイクロタイターウェル形態で）、ポリ塩化ビニル（例えば、シートまたはマイクロタイターウェルで）、ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズまたはマイクロタイタープレートで）、ポリフッ化ビニリデン（Immulonとして公知）、ジアゾ化紙、ナイロンメンブラン、活性化ビーズ、およびプロテインAビーズである。例えば、Dynatech Immulonマイクロタイタープレートまたは60mm直径のポリスチレンビーズ（Precision Plastic Ball）が使用され得る。抗原性ペプチドを含む固体支持体は、代表的には、テスト試料からの分離後、および結合した抗体の検出の前に、洗浄される。 30 40

【0153】

抗体を含む形成された複合体（または、競合アッセイの場合は、競合抗体の量）は、形式に応じて、公知の多くの技法のいずれかによって検出される。例えば、複合体中の非標識抗体は、標識（例えば、酵素標識）と複合体化した抗異種Igの結合体を用いて検出され得る。

【0154】

ペプチドが被分析物であるイムノアッセイでは、テスト試料、代表的には生物学的試料は、抗原-抗体複合体の形成を可能にする条件下でペプチドに対する抗体と共にインキュベートされる。テスト前に生物学的試料を処理して推定される細菌成分を放出させることが望ましい。種々の形式が用いられ得る。例えば、「サンドイッチアッセイ」が用いられ得 50

、ここでは、固体支持体に結合された抗体は、テスト試料とともにインキュベートされ；洗浄され；被分析物に対する第2の標識された抗体とともにインキュベートされ、そして支持体は再度洗浄される。被分析物は、第2の抗体が支持体に結合されるかどうかを測定することによって検出される。競合形式では、テスト試料は、通常、抗体とともにインキュベートされ、そして標識された競合抗原も、連続的にまたは同時にインキュベートされる。適切な容器にパッケージされた、本発明の1以上のペプチド、該ペプチドに対する1以上の抗体、および緩衝液を含むイムノアッセイキットも、本発明の実施態様として包含される。

【0155】

本発明で使用する場合、「生物学的試料」とは、個体から単離された組織または液体の試料をいい、例えば、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚、呼吸器管、腸管、および泌尿生殖器管の外切片、涙液、唾液、乳汁、血液細胞、腫瘍、器官、ならびにインビトロ細胞培養構成物の試料（細胞培養培地中の細胞の増殖から得られる馴化培地、推定ウイルス感染細胞、組換え細胞、および細胞構成成分が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0156】

関連の診断アッセイにおいて、本発明は、マイコバクテリア感染を検出するための核酸プローブを提供する。

【0157】

主剤として本発明のポリヌクレオチドを使用して、約8ヌクレオチド以上のオリゴマーが、組換えポリヌクレオチドからの切り出しによってまたは合成によってのいずれかで調製され得、これは、マイコバクテリア配列とハイブリダイズし、そしてマイコバクテリアの同定に有用である。プローブは、誘導またはアップレギュレートされた配列のハイブリダイゼーションによる検出を可能にする長さである。6～8ヌクレオチドは活用可能な長さであり得るが、10～12ヌクレオチドの配列が好ましく、そして少なくとも約20ヌクレオチドが最適なようである。これらのプローブは、自動化オリゴヌクレオチド合成方法を含むルーチンの方法を用いて調製され得る。プローブとしての使用には、完全な相補性が望ましいが、フラグメントの長さが増加するにつれて、必ずしも必要であり得ない。

20

【0158】

このようなプローブの診断剤としての使用について、血液または血清のような分析されるべき生物学的試料は、所望であれば、それが含まれる核酸を抽出するために処理され得る。試料から得られる核酸は、ゲル電気泳動または他のサイズ分離技法にかけられ得；あるいは、核酸試料はサイズ分離せずにドットブロットされ得る。プローブは通常標識される。適切な標識、およびプローブを標識するための方法は、当該技術分野で公知であり、そして例えば、ニックトランスレーションまたはキナーゼ操作によって組込まれる放射性標識、ビオチン、蛍光プローブ、および化学発光プローブが挙げられる。次いで、試料から抽出された核酸は、適切なストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下で、標識されたプローブで処理される。

30

【0159】

プローブは、ビルレンスをコードするポリヌクレオチドに完全に相補的になり得る。したがって、通常の高ストリンジェンシーの条件は、偽陽性を防止するために所望される。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション中および洗浄手順中の、温度、イオン強度、時間の長さ、およびホルムアミドの濃度を含む多くの因子によって決定される。

40

【0160】

ハイブリダイゼーションアッセイにおいて増幅技法を使用することが所望であり得る。このような技法は当該技術分野で公知であり、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法が挙げられる。

【0161】

プローブは、診断キット中にパッケージングされ得る。診断キットは、標識され得るプロ

50

ープDNAを含み；あるいは、プローブDNAは非標識であり得そして標識用の成分が別々の容器でキットに含まれ得る。キットはまた、特定のハイブリダイゼーションプロトコルに必要な他の適切なパッケージされた試薬および材料、例えば、標準薬、ならびにテストを行うための指示書を含み得る。

【0162】

好ましい実施態様では、本発明のペプチド（またはフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体）は、患者においてTリンパ球がマイコバクテリア感染の抗原性成分に既に曝露されているTリンパ球の存在を検出するための診断アッセイに使用される。

【0163】

より詳細には、特定の抗原に既に曝露されているTリンパ球は、同じ抗原によるその後の10
チャレンジで活性化される。この活性化は、マイコバクテリア感染の陽性診断を同定するための手段を提供する。逆に、同じ活性化は、特定の抗原にまだ曝露されていないTリンパ球によっては達成されない。

【0164】

Tリンパ球の上記の「活性化」は、時々、「再現応答」といい、そして例えば、活性化したTリンパ球からのインターフェロン（例えば、IFN- γ ）の放出を測定することによって測定され得る。したがって、患者におけるマイコバクテリア感染の存在は、本発明のペプチド（またはフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体）でのTリンパ球のインビトロチャレンジ後の所定の時間後の、Tリンパ球からの最小濃度のインターフェロンの放出によって決定され得る。20

【0165】

使用する場合、Tリンパ球を含む生物学的試料は患者から採取され、次いで本発明のペプチド（またはそのフラグメントもしくは改変体もしくは誘導体）でチャレンジされる。

【0166】

上記Tリンパ球診断アッセイは、問題の患者によって発現される少なくとも1つの主要組織適合複合体（MHC）クラスII分子を発現する抗原提示細胞（APC）を含み得る。APCは、生物学的試料中に元から提供され得、または外因的に添加され得る。1つの実施態様では、Tリンパ球は、CD4⁺Tリンパ球である。

【実施例】

【0167】

実施例1—マイコバクテリアの連続培養

材料および方法

株

M. tuberculosisの代表的な株である、M. tuberculosis H37Rv株（NCTCカタログ番号7416）を用いて研究を行った。ストック培養物を、 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ にて3週間、Middlebrook 7H10+OADC中で増殖し、回収し、そして脱イオン水中の高密度懸濁液として -70°C にて保存した。

【0168】

培養培地

化学的に定義された培養培地を開発し、そしてCAMRマイコバクテリア培地と命名した（WO 40
00/52139を参照のこと）。Millepore水精製システムで得た高品質水を用いて培地を調製し、そして $0.07\mu\text{m}$ 孔サイズの酢酸セルロースメンブランフィルターカプセル（Sartorius Ltd.）を通過させて濾過滅菌した。Middlebrook 7H10+OADC寒天を用いて、種菌培養物を調製し、ケモスタット試料中の培養可能な細菌の数を計数し、そして培養純度を評価した。

【0169】

培養装置

培養実験を、1リットルのガラス容器中で行い、500mlの使用容量で操作した。容器の下に配置したマグネチックスターラーに連動する培養容器中のマグネチックバーによって、培養物を攪拌した。トッププレート中の密封部分を通して培養液中に挿入したセンサープ 50

ローブと連結したAnglicon Microlab Fermentation System (Brighton Systems, Newhaven) を用いて、培養条件を連続的にモニターおよび制御した。酸素濃度を、ガルバーニ酸素電極 (Uniprobe, Cardiff) によってモニターし、そして攪拌速度のフィードバック制御によって制御した。温度を、Anglicon温度プローブによってモニターし、そして培養容器の下に配置した加熱パッドによって維持した。培養 pH を、Ingold pH 電極 (Mettler-Toledo, Leicester) を用いて測定し、そして水酸化ナトリウム (0.5M) または硫酸 (0.5M) のいずれかの自動添加によって制御した。連続培養のために、培養システムを、培地貯蔵器からの栄養添加を制御することによって操作し、そして定常培養容量を、容器の側面に取り付けたオーバーフローチューブによって維持した。

【0170】

10

接種および培養

容器を350mlの滅菌培養培地で満たし、そしてパラメータを、 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}6.9 \pm 0.2$ 、および約70%空気飽和の溶存酸素圧で安定化させた。 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ にて3週間増殖させたMiddlebrook寒天培地培養物を滅菌脱イオン水に再懸濁させることによって、高密度接種懸濁液を調製した。種菌を、培養容器に無菌的に植菌して、540nmで約0.25の初期培養濁度とした。接種後、培養を約50時間継続した。培養が対数増殖に入った時、さらに100mlの培地を添加し、そしてバッチ増殖を、光学密度および可視カウント測定によってモニターした。

【0171】

連続培養のために、培養物を接種し、そして詳述のように約50時間継続した。次いで、培養が対数増殖期に入って24時間後、培養物を培地添加 (約100ml) で48時間流加バッチ様式で操作した。次いで、連続培養を、0.03/時間の希釈率で開始した [24時間の平均生成時間 (MGT) に等価]。培養パラメータを、「高」溶存酸素培養条件については $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ および $\text{pH}6.9 \pm 0.2$ にて50% (v/v) 空気飽和の溶存酸素圧 (DOT) で、および「低」溶存酸素培養条件については $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ および $\text{pH}6.9 \pm 0.2$ にて1% (v/v) 空気飽和のDOTで維持した。増殖を、光学密度、乾燥重量、および可視カウント測定によってモニターした。

20

【0172】

連続培養

24時間のMGTでの定常状態増殖を、正常には、連続培養の開始の10日後に達成した。培養物は、約 5×10^8 cfu/mlを含む高密度懸濁液であり、そして約1.2g/lの細胞乾燥重量のバイオマス収量であった。細胞は、2~3 μm 長の短い桿菌であり、時々20細胞までの凝集塊を生じた。主な炭素源であるグリセロールは、定常状態増殖中に枯渇せず、残りの濃度は1.25g/lであった。Tween(登録商標)80は、0.1%の量で存在し、そして実質的に単一細胞から構成される均一懸濁液中でケモスタット培養に役立つ増殖速度でのM. tuberculosisの増殖を可能にした。Tween(登録商標)80の不在下で増殖した培養物は大きな凝集塊および表面菌膜を形成し、そして連続培養はできなかった。

30

【0173】

実施例2—ビルレンスデータ

50%のDOTで増殖した培養物は、モルモット感染モデルにおいてビルレントであったが、それは、エアロゾル送達後感染を引きおこし、肺で増殖し、脾臓に播種し、そして一次肺結核を示す組織変化を引き起こす能力によって決定した。

40

【0174】

播種性感染を引き起こす能力に基づいて培養試料のビルレンスを評価および比較するために、新しいビルレンスアッセイを開発した。このアッセイでは、16日目の脾臓において $3.0 \log_{10}$ cfu の播種性感染を生じさせるために、0日目に肺で必要とされる投与量を測定した。この値を、感染力インデックスと命名した。

【0175】

このアッセイを使用して、好氣的ケモスタット培養において増殖した細胞の感染力は、標準Middlebrook寒天上で増殖した細胞の感染力に匹敵した。これは、発明者らの培養シス

50

テムにおいて増殖した細胞がビルレントであり、そして発明者らの培養システムにおける増殖に関連するビルレンスの損失がないという、発明者らのこれまでの所見を支持する（表 1 を参照のこと）。

【 0 1 7 6 】

低酸素圧（1 % D O T）で増殖した細胞についての感染力インデックスは、好氣的細胞よりも著しく低く、これは、高酸素圧での増殖が、M. tuberculosisのビルレンスを増強すること、すなわち、匹敵する感染を生じさせるために非常に低用量を必要とすることを示す。

【 0 1 7 7 】

【表 1】

10

試料

感染力インデックス*

プレート	2. 0
好氣的ケモスタット(50%DOT)	2. 1、2. 2
低酸素ケモスタット(1%DOT)	1. 4、1. 5

* 値は、16日目の脾臓において3. 0 log₁₀の播種性感染を生じさせるために、0日目に肺で必要とされる投与量log₁₀である。

20

【 0 1 7 8 】

実施例 3 – マイクロアレイ分析のための M. tuberculosisからの R N A 抽出

材料および方法

Trizol (Life Technologies) – これは、フェノールおよびチオシアン酸グアニジンの処方物である。

【 0 1 7 9 】

G T C 溶解溶液 – これは、5 M のチオシアン酸グアニジン、0.5 % の N – ラウリルサルコシン、25mM のクエン酸 3 ナトリウム、0.1M の 2 – メルカプトエタノール、および 0.5 % の Tween (登録商標) 80 を含む。

30

【 0 1 8 0 】

クロロホルム

イソプロパノール

3 M 酢酸ナトリウム

70 % エタノール

マイクロ遠心機

リボライザー (ribolyser) 。

【 0 1 8 1 】

滅菌プラスチック製品 – Falcon チューブ、スクリューキャップ付きエッペンドルフ、ギルソンチップ – これらはすべて R N a s e を含まない。

40

【 0 1 8 2 】

ガラス製品 – 160°C にて少なくとも 16 時間焼いた。

【 0 1 8 3 】

方法

封じ込めレベル 3 で行われる工程；クラス III の微生物安全キャビネット内である。

【 0 1 8 4 】

10 または 20 ml の培養物 (10⁹ / ml) を取り出し、そしてこれをすぐにプラスチック試料ポット中の 4 容量の G T C 溶解緩衝液に添加する。ポットを確実に密封する。

50

【0185】

GTC溶解緩衝液中の細胞を室温にて1時間インキュベートする。5%のHycolinで5分間プラスチックポットの表面の汚染を除去する。試料をパスボックスに移し、そして密封可能な蓋を有するプラスチックの運搬用容器に入れる。容器を確実に閉じ、そしてこれを非毒性キャビネットであるCL3キャビネットに移す。

【0186】

溶解混合物をFalconチューブに等しく分配する。これらのチューブを遠心分離バケットに入れ、そしてバケットを確実に密封する。5%のHycolinで5分間バケットの表面の汚染を除去する。次いで、これらを遠心分離機（Baird and Tatlock Mark IV冷却ベンチトップ遠心分離機）に移す。チューブを3,000rpmにて30分間回転させる。

10

【0187】

未開封のバケットをキャビネットに戻す。遠心チューブを取り出し、そして上清をGTC溶解緩衝液用の廃棄瓶に注ぐ。

【0188】

各ペレットを1mlのTrizol（フェノールおよびGTCの処方物、カタログ番号15596-026）に再懸濁する。製造業者のガイドラインは、繰り返しのピペット操作によって細胞を溶解することを推奨する。この動作のみではM. tuberculosisを溶解しないが、Trizol中にペレットを完全に再懸濁させるためには重要である。

【0189】

1mlの細胞をFastRNAチューブに移し、そしてパワーセッティング6.5にて45秒間、細胞をリボライズ（ribolyse）する。

20

【0190】

チューブを室温にて5分間インキュベートする。

【0191】

チューブから水層を取り出し、そしてこれをスクリュウキャップ付きのエッペンドルフチューブ中の200μlのクロロホルムに添加する。各チューブを約15秒間激しく振盪する。室温にて2～3分間インキュベートする。

【0192】

チューブを13,000rpmにて15分間回転させる。遠心分離後、液体は、赤いフェノール／クロロホルム相、界面、および澄明な水相に分離する。

30

【0193】

水相を注意深く取り出し、そしてこれを500μlのクロロホルム／イソアミルアルコール（24：1）を含む新鮮なエッペンドルフチューブに移す。このチューブを、13,000rpmにて15分間回転させる。

【0194】

水相を、50μlの酢酸ナトリウムおよび500μlのイソプロパノールを含むエッペンドルフチューブに移す。

【0195】

エッペンドルフチューブを5%のHycolinで5分間表面の汚染を除去する。チューブをCL3研究室に取り出し、そして研究室157で手順を続ける。

40

【0196】

封じ込めレベル2で行われる工程：

RNAを-70℃にて少なくとも30分間沈殿させる—この工程は一晩行われ得る。

【0197】

沈殿したRNAを13,000rpmにて10分間回転させて落とす。上清を除去し、そしてペレットを70%エタノールで洗浄する。遠心分離を繰り返す。

【0198】

70%エタノールを除去し、そしてペレットを空気乾燥させる。ペレットを、RNAseを含まない水に溶解させる。

【0199】

50

R N A を -70°C にて凍結させて保存する。

【0200】

実施例 4 - c D N A 標識付け、ハイブリダイゼーション、および分析
アレイの調製

P C R 増幅した産物を、O R F 特異的プライマーを用いて M. tuberculosis ゲノム D N A から生成する。ゲノムの各遺伝子が提示される。これらを、標準的な顕微鏡ガラススライド上のグリッドに、BioRobotics microgrid ロボット (MWG Biotech) を用いて $4000 \text{ スポット} / \text{cm}^2$ より高い分解能でスポットする。

【0201】

蛍光標識した c D N A を、異なる環境条件下で増殖した細菌から単離された R N A から転写する。この c D N A を、C y 3 または C y 5 のいずれかで標識した d C T P (染料は、Amersham Pharmacia Biotech によって供給される) の組込みによって標識する。二重蛍光を用い、2 つの c D N A 試料の同時検出を行う。アレイの出力を、共焦点レーザースキャナー (MWG Biotech からの Affimetrix 428 スキャナー) を用いて読む。より詳細な情報は、ウェブサイト www.sghms.ac.uk/depts/medmicro/bugs; Mujumdar, R.B. (1993) Bioconjugate Chemistry, 4(2), 105-111 頁; Yu, H. (1994) Nucl. Acids Res. 22, 3226-3232 頁; および Zhu, Z. (1994) Nucl. Acids Res. 22, 3418-3422 頁に見られ得る。

【0202】

c D N A の標識付けおよびハイブリダイゼーション

1. C y 3 / C y 5 標識 c D N A

マイクロアレイスライド当たり、1 つの C y 3 および 1 つの C y 5 で標識した c D N A 試料を調製する。

【0203】

各試料: R N A $2 \sim 10 \mu\text{g}$
 ランダムプライマー ($3 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) $2 \mu\text{l}$
 水 $11 \mu\text{l}$ にする。

【0204】

95°C で 5 分間加熱し、氷上で急激に冷却し、そして短時間遠心分離する。

【0205】

それぞれに添加する: $5 \times \text{First Strand Buffer}$ $5 \mu\text{l}$
 D T T (100mM) $2.5 \mu\text{l}$
 d N T P (5mM dA/G/TTP, 2mM dCTP) . . . $2.3 \mu\text{l}$
 C y 3 または C y 5 d C T P $1.7 \mu\text{l}$
 SuperScript II ($200 \text{U} / \mu\text{l}$) $2.5 \mu\text{l}$ 。

【0206】

25°C にて 10 分間、次いで 42°C にて 90 分間インキュベートする。

【0207】

2. スライドのプレハイブリダイゼーション

コプリンジャー (coplin jar) 中でプレハイブリダイゼーション溶液を混合し、そして標識付け反応が平衡化する間、 60° にてインキュベートする。

【0208】

10

20

30

40

プレハイブリダイゼーション: 20×SSC 8.75ml (3.5×SSC)
20% SDS 250μl (0.1% SDS)
BSA (100mg/ml) 5ml (10mg/ml)
水. 50mlにする。

【0209】

マイクロアレイスライドを、予め加熱したプレハイブリダイゼーション溶液中で60℃にて20分間インキュベートする。スライドを、水中で1分間リンスし、次いでプロパン-2-オール中で1分間リンスし、そしてスライドを、50mlの遠心チューブ中で1500rpmにて5分間遠心分離して乾燥させる。スライドを、ハイブリダイゼーションまで保存する。 10

【0210】

3. Cy3/Cy5 標識 cDNA の精製

Cy3 および Cy5 標識した cDNA 試料を、1つのチューブと一緒に合わせる。

【0211】

添加する: 3M 酢酸ナトリウム pH4.8. 5μl (0.1容量)
プロパン-2-オール 40μl (0.8容量)。

【0212】

チューブをオイル中に包み、そして室温にて30分間インキュベートする。13000rpmにて20分間遠心分離し、そして上清を除去する。ペレットを100μlの70%エタノールでリンスし、そして13000rpmにて5分間遠心分離する。上清を除去し、そしてペレットを10分間空気乾燥する。ペレットを10.5μlの水に再懸濁する。 20

【0213】

4. スライドと Cy3/Cy5 標識 cDNA とのハイブリダイゼーション

プレハイブリダイズしたマイクロアレイスライドをハイブリダイゼーションカセット中に置き、そしてカセット中のウェルに水15μlアリコートをして2回添加する。再懸濁した Cy3/Cy5 標識した cDNA 試料を、ハイブリダイゼーション溶液と混合する。

【0214】

ハイブリダイゼーション: Cy3/Cy5 標識した cDNA 試料. . . 10.5μl 30
20×SSC 3.2μl (4×SSC)
2% SDS 2.3μl (0.3% SDS)。

【0215】

ハイブリダイゼーション溶液を95℃にて2分間加熱する。氷上で急激に冷却しないが、徐々に冷却し、短時間遠心分離する。気泡形成を避けながらスライド上のアレイした領域の端にハイブリダイゼーション溶液をピペットで載せる。ピンセットを用いて、カバーガラスの端をスライドの表面に沿って、アレイした領域の方へ、およびアレイの端のハイブリダイゼーション溶液中に、注意深くドラッグする。一旦決まった位置に置き、さらなる移動を避けながら、カバーガラスをアレイ上に注意深く下げる。ハイブリダイゼーションカセットを密封し、そして60℃の水浴中に16~20時間沈める。 40

【0216】

5. スライドの洗浄

ハイブリダイゼーションカセットからマイクロアレイスライドを取り出し、そして最初に Wash A の染色トラフ中でスライドを注意深く洗浄して、カバーガラスを除去する。一旦カバーガラスをスライドラック中のスライドの位置に移動し、そして Wash A 中でさらに2分間攪拌を続ける。

【0217】

Wash A : 20×SSC 20ml (1×SSC)
 20%SDS 1ml (0.05%SDS)
 水 400mlにする。

【0218】

スライドをクリーンなスライドラックに移し、そしてWash Bの第1のトラフ中で2分間攪拌する。Wash Bの第2のトラフ中で2分間攪拌しながら洗浄する。

【0219】

Wash B (×2) : 20×SSC 1.2ml (0.06×SSC)
 水 400mlにする。

10

【0220】

スライドを50mlの遠心チューブに入れ、そして1500rpmにて5分間遠心分離して、スライドを乾燥させる。

【0221】

6. スライドをスキャンする

ScanArray 3000二重レーザー共焦点スキャナーを用いてスライドをスキャンし、そしてデータを分析する。

【0222】

試薬

ランダムプライマー (3 µl/µl) [Life Technol., Cat# 48190-011]

dNTP (5 mM dATP、dGTP、dTTPおよび2 mM dCTP) [Life Technol., Cat# 10297-018]

Cy3 dCTP Fluorolink [Amersham Pharmacia Biotech, Cat# PA53021]

Cy5 dCTP Fluorolink [Amersham Pharmacia Biotech, Cat# PA55021]

SuperScript II逆転写酵素 (200U/µl) [Life Technol., Cat# 18064-014]

5×First Strand Buffer [Life Technol., Cat# 18064-014で供給される]

ジチオトレイトール (DTT) (100mM) [Life Technol., Cat# 18064-014で供給される]

ウシ血清アルブミン (BSA) Fraction V 96-99% (100mg/ml) [Sigma, Cat# A9418]。

【0223】

一般: 20×SSC

20%SDS

3M 酢酸ナトリウム pH4.8

プロパン-2-オール

70%エタノール

2%SDS。

20

30

【0224】

器具

マイクロアレイハイブリダイゼーションカセット [Telechem International (ArrayIt.com), Cat# AHC-1]

コプリン染色ジャー (Coplín staining jar) [Fisher Scientific, Cat# MNK-820-H]

3×スライド染色トラフ [Fisher Scientific, Cat# MNK-836-K]

2×スライド染色ラック [Fisher Scientific, Cat# MNK-841-K]

カバーガラス 22×22mm [BDH, Cat# 406/0187/33]。

【0225】

スキャンニングおよび分析

スライドを、Affymetrix 428スキャナーを用いてスキャンした。スキャナーから供給され

40

50

た生データを、最初にImaGeneとして公知のソフトウェアで分析した。次いで、スキャンしたイメージを、GeneSpringとして公知の他のソフトウェアパッケージに移した。これは非常に強力なツールであり、多くのデータベースから情報を得て、各遺伝子の発現の完全な分析を可能にする。

【0226】

結果

上記のプロトコルに従って、定常状態ケモスタット培養物からトータルRNAを抽出した。RNAマイクロアレイハイブリダイゼーションを、二連で行って、好気（50% DOT）および低酸素（1% DOT）環境で増殖した*M. tuberculosis*から抽出したRNAを比較した。

10

【0227】

2つの発現プロファイルを分析および比較した。低酸素条件下で少なくとも1.5倍アップレギュレートされたと思われる遺伝子を、同定のために選択した。

【0228】

転写開始部位から終止コドンまでの核酸配列を得る。

【0229】

実施例5－免疫原性を保持しながらそのビルレンスを減弱させるために*M. tuberculosis*からの1以上の遺伝子を欠失させる

同定されている1以上の遺伝子を、対立遺伝子交換を用いて破壊し得る。簡単に言えば、目的の遺伝子を、どちらかの側に隣接する1～2 kbのDNAでクローニングし、そしてコード領域の一部の欠失およびハイグロマイシンのような抗生物質耐性マーカーの挿入によって不活性化する。

20

【0230】

次いで、操作したフラグメントを、適切な自殺ベクター、例えば、pPR23に移し、そして*M. tuberculosis*の野生型の親株を形質転換する。変異体を、抗生物質耐性株について選択することによって回収する。遺伝子型分析（目的の遺伝子に特異的なフラグメントでのサザンブロッティング）を、選択された株について行って、遺伝子が破壊されていることを確認する。

【0231】

次いで、変異体株を研究して、表現型に対する遺伝子破壊の影響を決定する。これをワクチン候補物として使用するために、弱毒化ビルレンスを示すことが必要である。これは、モルモットまたはマウスのいずれかの感染モデルを用いて行われ得る。動物を、変異体株で感染させ、そして疾患の進行を、種々の器官、特に肺および脾臓において、感染後の特定の時点で、代表的には16週までに、細菌負荷量を決定することによってモニターする。

30

【0232】

種々の器官において非常に高い細菌負荷量を有する野生型株で感染した動物に対して、比較を行う。長期生存研究および組織病理学も、ビルレンスおよび病原性を評価するために使用され得る。

【0233】

一旦減弱化ビルレンスが樹立されると、防御および免疫原性研究を行い、ワクチンとしてのこの株の潜在力を評価し得る。対立遺伝子交換およびTB改変体の調製についての適切な参考文献は、McKinneyら、2000年およびPelicicら、1997年 [1,2] である。

40

【0234】

実施例6－免疫原性であるタンパク質をコードする1以上の遺伝子を選択し、そしてこれをBCGまたは*M. tuberculosis*の弱毒化株中に配置してその全体の免疫原性を増強する目的の遺伝子を、PCRによって*M. tuberculosis*ゲノムから増幅する。増幅した産物を精製し、そしてプラスミド（pMV306）にクローニングする。このプラスミドは、マイコバクテリアゲノムのマイコバクテリオファージL5の付着部位（attB）に部位特異的に組込まれる [3]。

【0235】

50

高電圧電気パルスで細胞エンベロープを傷つけてDNAの取り込みを生じさせるエレクトロポレーションを用いて、BCGをプラスミドで形質転換する。プラスミドを、attB部位でBCG染色体中に組み込み、安定な組換え体を生じさせる。組換え体を選択し、そしてPCRまたはサザンブロッティングによってチェックして、遺伝子が組み込まれていることを確認する。次いで、組換え株を防御研究に使用する。

【0236】

実施例7－弱毒化サルモネラおよびワクシニアウイルスのような組換えキャリアを使用してTB遺伝子を発現および提示する

このタイプのアプローチの最良の例の1つは、改変ワクシニアウイルスAnkara (MVA)の使用である[4]。目的の遺伝子を、ワクシニアウイルスシャトルベクター、例えば、pSC11にクローニングする。次いで、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞を、野生型MVAで感染させ、そして組換えシャトルベクターで形質転換する。次いで、組換えウイルスを、適切な選択マーカーを用いて選択し、そしてウイルスプラークを選択および精製した。

【0237】

組換えウイルスは、通常、初回ブースト方法の一部として送達され、そこでは動物を、最初に、構成的プロモーターの制御下で目的のTB遺伝子をコードするDNAワクチンでワクチン接種する。少なくとも2週間後に目的の遺伝子を有する組換えMVAを動物に投与することによって、免疫応答をブーストする。

【0238】

実施例8－単一ペプチド／タンパク質またはタンパク質の組み合わせを含むサブユニットワクチン

1以上のペプチドまたはタンパク質を有するサブユニットワクチンを調製するために、まず第1に、ワクチンを調製するためのタンパク質またはペプチドを得ることが必要である。現在まで、これは、主として、TB培養物から目的のタンパク質を精製することによってマイコバクテリア研究を行っている。しかし、目的の遺伝子をクローニングしそして組換えタンパク質を産生することがより一般的になっている。

【0239】

目的の遺伝子のコード配列を、PCRによってN末端およびC末端に挿入した制限部位とともに増幅して、pET-15bのようなタンパク質発現ベクター中へのインフレームでのクローニングを可能にする。遺伝子を、lacZのような誘導性プロモーターの下流に挿入する。次いで、ベクターを、培養により増殖するE. coliに形質転換する。組換えタンパク質を過剰発現させ、そして精製する。

【0240】

普通の精製方法の1つは、N末端のHisタグを有する組換えタンパク質を産生することである。次いで、タンパク質をNi-NTAカラム上で金属イオンに対するHisタグの親和性に基づいて精製し、その後Hisタグを切断する。次いで、精製したタンパク質を、適切なアジュバント中で動物に投与する[5]。

【0241】

実施例9－1以上の同定された遺伝子を有するプラスミドDNAワクチン

特定の遺伝子をコードするDNAを、PCRによって増幅し、精製し、そしてpVAX1のようなワクチン開発のために開発された特殊ベクターに挿入する。これらのベクターは、真核生物細胞において導入されたDNA(候補抗原をコードする)の強力な発現を指示するプロモーター配列(例えば、CMVまたはSV40プロモーター)、およびmRNA転写物を安定化するためのポリアデニル化シグナル(例えば、SV40またはウシ成長ホルモン)を含む。

【0242】

ベクターをE. coliに形質転換し、そして形質転換体を、プラスミドによってコードされるカナマイシン耐性のようなマーカーを用いて選択する。次いで、プラスミドを、形質転換したコロニーから回収し、そして配列決定して、目的の遺伝子が存在しそしてPCRで

生じた変異なく正確にコードされることをチェックする。

【0243】

次いで、大量のプラスミドをE. coliで産生し、そしてプラスミドを回収しそして市販のキット（例えば、Qiagen Endofree-plasmid preparation）を用いて精製する。次いで、ワクチンを、アジュバントの存在または不在下で、例えば、筋肉内注射によって、動物に投与する。

【0244】

実施例10-DNA発現ベクターの調製

DNAワクチンは、細菌プラスミドにクローニングした本発明の核酸配列からなる。DNAワクチンの調製には、通常、プラスミドベクターpVAX1を使用する。このベクターは、E. coliにおける高コピー数複製、およびほとんどの哺乳動物細胞における目的のペプチドの高レベル一過性発現を容易にするように設計される（詳細については、pVAX1についての製造業者のプロトコルを参照のこと（カタログ番号V260-20、www.invitrogen.com））。

【0245】

ベクターは、以下のエレメントを含む：

- * 種々の哺乳動物細胞における高レベル発現のためのヒトサイトメガロウイルス前初期（CMV）プロモーター
- * センス配向でのインビトロ転写および挿入物全体の配列決定を可能にするT7プロモーター／プライミング部位
- * 有効な転写終止およびmRNAのポリアダニル化のためのウシ成長ホルモン（BGH）ポリアダニル化シグナル
- * E. coliにおける選択のためのカナマイシン耐性遺伝子
- * マルチクローニング部位
- * E. coliにおける高コピー数複製および増殖のためのpUC起点
- * 挿入物全体の配列決定を可能にするためのBGH逆プライミング部位。

【0246】

ベクターは、標準的な組換え技法を用いて調製され得、これは当該技術分野で公知であり、例えば、Sambrookら（1989）である。ワクチンの調製において重要な段階は、以下のとおりである：

- * 目的の遺伝子をマルチクローニング部位の1つによってpVAX1にライゲートする
- * 次いで、ライゲーション混合物をコンピテントE. coli株（例えば、TOP10）に形質転換し、そして50 µg/mlのカナマイシンを含むLBプレートを用いて形質転換体を選択する。
- * クローンを選択し、そして配列決定して目的の遺伝子の存在および配向を確認する。
- * 一旦遺伝子の存在が確認されると、ベクターを用いて、タンパク質発現についてチェックするために哺乳動物細胞株をトランスフェクトし得る。トランスフェクションのための方法は当該技術分野で公知であり、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、およびリポフェクションが挙げられる。
- * 一旦ペプチド発現が確認されると、適切な細胞宿主、例えば、E. coliで大量のベクターを産生し、そして精製し得る。

【0247】

pVAX1は、宿主染色体に組込まれない。組込みの可能性を最小にするためにすべての非必須配列が除去されている。特定のベクターを構築する場合、真核生物細胞内で発現される場合にコードされたタンパク質の分泌を指示するために、リーダー配列が含まれ得る。

【0248】

使用されている他のベクターの例は、V1Jns.tPAおよびpCMV4である（Lefevreら、2000およびVordermeierら、2000）。

【0249】

宿主のゲノムに組込まれる発現ベクターが使用され得るが、組み込まれないベクターを使用することが、より通常でありそしてより好ましい。pVAX1の例は組込まれない。組込み

10

20

30

40

50

は、他の問題を生じる遺伝学的に改変された宿主を生成する。

【0250】

実施例11－RNAワクチン

米国特許第5,783,386号の15頁に記載のように、1つのアプローチは、宿主に直接RNAを導入することである。

【0251】

したがって、ベクター構築物（実施例10）は、インビトロでRNAを生成し、次いで精製されたRNAを宿主に注入するために使用され得る。次いで、RNAは、宿主細胞における翻訳のテンプレートとして用いる。組込みは起こらない。

【0252】

他の選択肢は、目的の遺伝子に対応するRNAを有するレトロウイルスゲノムのような感染性因子を使用することである。ここでは、宿主ゲノムへの組込みが起こる。

【0253】

他の選択肢は、シンドビスウイルスまたはセムリキ森林熱ウイルスのようなウイルスベクターに由来し得るRNAレプリコンワクチンの使用である。これらのワクチンは、自己複製および自己制限しており、そしてRNAまたはDNAのいずれかとして投与されて、次いでインビボでRNAレプリコンに転写される。ベクターは、最終的には、トランスフェクトされた細胞の溶解を引き起こし、それによって宿主ゲノムへの組込みの可能性を減少させる。RNAワクチン構築についてのプロトコルは、Chengら（2001）に詳述される。

【0254】

実施例12－T細胞応答の評価に基づく診断アッセイ

T細胞応答の評価に基づく診断アッセイのために、患者からの血液の試料を得ることが必要である。単核細胞（単球、TおよびBリンパ球）は、Ficollグラジエントのような密度グラジエントを用いて血液から分離され得る。

【0255】

単球とBリンパ球は両方とも、抗原を提示し得るが、樹状細胞のような専門の抗原提示細胞（APC）よりも効率が劣る。後者は、リンパ様組織により局在する。

【0256】

最も単純なアプローチは、分離した単核細胞に抗原を添加し、そして1週間インキュベートし、次いで増殖の量を評価することである。個体が感染によって既に抗原に曝露されているならば、抗原に特異的なT細胞クローズは、試料中により広がっているべきであり、そして応答すべきである。

【0257】

異なる細胞集団を分離することも可能であり、T細胞対APCの比を制御することが所望される。

【0258】

このタイプのアッセイの他のバリエーションは、応答の尺度として応答性リンパ球によるサイトカインの産生を測定することである。以下の実施例13に記載のELISPOTアッセイは、このバリエーションの適切な例である。

【0259】

実施例13－潜伏性マイコバクテリアの検出

結核の制御についての主な問題は、結核菌に感染した無症候性個体が多く存在することである。停止期桿菌は、第一線の薬物に対してより抵抗性である。

【0260】

潜伏性マイコバクテリア関連抗原の存在は、血液試料中の抗原特異的抗体またはT細胞のいずれかを検出することによって間接的に検出され得る。

【0261】

以下の方法は、Lalvaniら（2001）に記載の方法に基づき、ここでは、分泌された抗原ESA T-6を、M. tuberculosis複合体のメンバーによって発現されると同定したが、M. bovis BCGワクチン株およびほとんどの環境中のマイコバクテリアからは不在である。60～80%の

10

20

30

40

50

患者も、EAST-6に対して強力な細胞免疫応答を有する。エキスビボELISPOTアッセイを用いて、ESAT-6特異的T細胞を検出した。

【0262】

本発明に適用した場合：

96ウェルプレートを、サイトカイン（例えば、インターフェロン γ 、IL-2）特異的抗体でコーティングする。次いで、末梢血単球を患者の全血から単離し、そしてウェルに塗布する。

【0263】

抗原（すなわち、本発明のペプチド、フラグメント、誘導体、または改変体の1つ）を添加して、存在し得る特異的T細胞を刺激し、そしてプレートを24時間インキュベートする。抗原は、サイトカイン産生を刺激し、次いで特異的抗体に結合する。 10

【0264】

プレートを洗浄して、抗原特異的T細胞が存在するプットプリントを残した。

【0265】

次いで、適切な検出システム（例えば、酵素）とカップリングさせた第2抗体を添加し、そして適切な基質を添加した後スポットの数を計数する。

【0266】

単一の抗原特異的なT細胞にそれぞれ対応するスポットの数は、最初に添加された細胞の総数に関連する。

【0267】

上記の実施例も、TB感染した個体をBCGワクチン接種した個体と区別するために使用され得る抗原の使用を記載する。これは、より区別的な診断アッセイで使用され得る。 20

【0268】

実施例14 トランスクリプトミクス分析のための代替プロトコル

a) 実験設計

RNAを好気（50% DOT）および低酸素（1% DOT）培養物から抽出し、そして蛍光標識したcDNAを、RNAの各試料から転写した。蛍光標識したcDNAもまた、M. tuberculosisから抽出したゲノムDNAから転写した。

【0269】

各マイクロアッセイ実験において、全ゲノムアレイを、1つの培養試料からのRNAから生成した標識cDNAの試料とハイブリダイズした（テスト試料）。各アレイも、ゲノムDNAから調製したコントロールcDNAとハイブリダイズした（コントロール試料）。テストおよびコントロールのcDNAを、それぞれ異なるcy染料で標識した。 30

【0270】

9つの別々のアレイを好氣的試料について行い、そして7つの低酸素アレイを行った。各アレイを、Affymetric 428アレイスキャナーを用いて、各染料の励起最大に対応する2つの異なる波長でスキャンした。発光強度を記録し、そしてデータを、GeneSpringソフトウェアを用いて分析した。

【0271】

各チップにおけるテスト試料データを、コントロールデータに対して標準化し、次いで、50番目の百分位数を用いたメジアン強度値について、チップ当たりで標準化し、そして最後にアレイすべてにわたって遺伝子当たりで標準化した。この場合、好氣的培養物に対して低酸素条件下で少なくとも1.5倍高く発現される遺伝子を、同定のために選択した。 40

【0272】

b) マイクロアレイ分析のためのM. tuberculosisからのRNA抽出

材料および方法

Trizol (Life Technologies) — これは、フェノールおよびチオシアン酸グアニジンの処方物である。

【0273】

GTC溶解溶液 — これは、5Mのチオシアン酸グアニジン、0.5%のN-ラウリルサルコシ 50

ン、25mMのクエン酸 3 ナトリウム、0.1Mの 2 -メルカプトエタノール、および0.5%のTween (登録商標) 80を含む。

【0274】

クロロホルム、イソプロパノール

3 M 酢酸ナトリウム

70% エタノール

マイクロ遠心機、リボライザー (ribolyser)

滅菌プラスチック製品—Falconチューブ、スクリューキャップ付きエッペンドルフ、ギルソンチップ—これらはすべてRNaseを含まない

ガラス製品—160°Cにて少なくとも16時間焼いた。

10

【0275】

方法

封じ込めレベル3で行われる工程；クラスIIIの微生物安全キャビネット内である。

【0276】

* 10または20mlの培養物 (10^9 /ml) を取り出し、そしてこれをすぐにプラスチック試料ポット中の4容量のGTC溶解緩衝液に添加する。ポットを確実に密封する。

【0277】

* GTC溶解緩衝液中の細胞を室温にて1時間インキュベートする。5%のHycolinで5分間プラスチックポットの表面の汚染を除去する。試料をパスボックスに移し、そして密封可能な蓋を有するプラスチックの運搬用容器に入れる。容器を確実に閉じ、そしてこれを非毒性キャビネットであるCL3キャビネットに移す。

20

【0278】

* 溶解混合物をFalconチューブに等しく分配する。これらのチューブを遠心分離バケットに入れ、そしてバケットを強く密封する。5%のHycolinで5分間バケットの表面の汚染を除去する。次いで、これらを遠心分離機 (Baird and Tatlock Mark IV冷却ベンチトップ遠心分離機) に移す。チューブを3,000rpmにて30分間回転させる。

【0279】

* 未開封のバケットをキャビネットに戻す。遠心チューブを取り出し、そして上清をGTC溶解緩衝液用の廃棄瓶に注ぐ。

【0280】

* 各ペレットを1mlのTrizol (フェノールおよびGTCの処方物、カタログ番号15596-026) に再懸濁する。製造業者のガイドラインは、繰り返しのピペット操作によって細胞を溶解することを推奨する。この動作のみではM. tuberculosisを溶解しないが、Trizol中にペレットを完全に再懸濁させるためには重要である。

30

【0281】

* 1mlの細胞を各FastRNAチューブに移し、そしてパワーセッティング6.5にて45秒間、細胞をリボライズ (ribolyse) する。

【0282】

* チューブを室温にて5分間インキュベートさせる。

【0283】

* 各チューブから水層を取り出し、そしてこれをスクリューキャップ付きのエッペンドルフチューブ中の200μlのクロロホルムに添加する。各チューブを約15秒間激しく振盪する。室温にて2～3分間インキュベートする。

40

【0284】

* チューブを13,000rpmにて15分間回転させる。遠心分離後、液体は、赤いフェノール/クロロホルム相、界面、および澄明な水相に分離する。

【0285】

* 水相を注意深く取り出し、そしてこれを500μlのクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を含む新鮮なエッペンドルフチューブに移す。このチューブを、13,000rpmにて15分間回転させる。

50

【0286】

* 水相を、50 μ lの酢酸ナトリウムおよび500 μ lのイソプロパノールを含むエッペンドルフチューブに移す。

【0287】

* エッペンドルフチューブを5%のHycolinで5分間表面の汚染を除去する。チューブをCL3研究室から取り出し、そして研究室157で手順を続ける。

【0288】

封じ込めレベル2で行われる工程：

* RNAを-70℃にて少なくとも30分間沈殿させる—この工程は一晩行われ得る。

* 沈殿したRNAを13,000rpmにて10分間回転させて落とす。上清を除去し、そしてペレットを70%エタノールで洗浄する。遠心分離を繰り返す。 10

【0289】

* 70%エタノールを除去し、そしてペレットを空気乾燥させる。ペレットを、RNAseを含まない水に溶解させる。

* RNAを-70℃にて凍結させて保存する。

【0290】

* RNAをDNAse1で処理してゲノムDNAを除去し、次いでRNeasyミニカラム（Qiagen）を用いて精製した。両方法とも、製造業者のガイドラインに従って行った。

【0291】

c) ケモスタット培養物中で増殖したM. tuberculosisからのゲノムDNAの単離 20
次いで、DNAを用いてCy3またはCy5標識したDNAを生成し、マイクロアレイ実験におけるコントロールとして使用する。

【0292】

材料および方法

0.5mmの直径のビーズ

ビーズビーター

ベンチトップ遠心分離機

プラットホームロッカー

熱ブロック

Falcon 50ml遠心チューブ 30

Sorvall RC-5C遠心分離機

250mlポリプロピレン遠心分離ポット

スクリーキャップ付きのエッペンドルフチューブ

1ml、200 μ l、10ml、5mlのピペット。

【0293】

破壊緩衝液

50mM Tris HCL pH8.0

10mM EDTA

100mM NaCl。

【0294】

手順 40

Mtb細胞の機械的破壊

* 150mlのケモスタット細胞（540nmで2.5のO.D.）を、遠心分離機Sorvall RC-5Cを用いて250mlポリプロピレンポット中で15,000rpmにて15分間回転させて落とす。

* 上清を捨てる。

* 細胞を、50ml Falconチューブ中の5mlの破壊緩衝液に再懸濁し、そして15,000rpmにてさらに15分間遠心分離する。

* 上清を除去し、そしてさらなる破壊緩衝液を5mlの容量で添加する。ビーズを用いて細胞を破碎する。これらは、1mlの細胞に対して1mlのビーズ量で使用される。試料を適切なサイズのチャンバー中に置く。ビーズビーター中に置き、そして（氷を含む）外側の 50

ユニットを確実にし、そして所望のスピードで30秒間処理する。

* ビーズを10分間沈殿させ、そして細胞ライセートを50mlのFalcon遠心チューブに移す。

* ビーズ上で洗浄緩衝液をピペットで上下させることによって、2～5 mlの破壊緩衝液でビーズを洗浄する。

* この洗浄溶液を、Falconチューブ中のライセートに添加する。

【0295】

タンパク質および細胞成分の除去。

* 0.1容量の10% SDSおよび0.01容量のプロテイナーゼ K を添加する。

* 反転によって混合し、そして熱ブロック中で55℃にて2～3時間加熱する。

* 得られる混合物は均一かつ粘性であるべきである。そうでないならば、0.2%までの濃度になるようにさらに SDS を添加する。

* 25/24/1の比のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコールの等容量を添加する。

* プラットホームロッカー上で均一になるまで穏やかに混合する。

* 3,000rpmにて20分間回転して落とす。

* 水相を取り出し、そして新鮮なチューブに入れる。

* 水相を等容量のクロロホルムで抽出して、ごく少量の細胞破砕物およびフェノールを除去する。クロロホルム抽出物は、すべての破砕物を除去するまで繰り返す必要があり得る。

* 0.3M酢酸ナトリウムおよび等容量のイソプロパノールで DNA を沈殿させる。

* ガラス棒でできるだけ多くの DNA を巻き取る。

* 巻き取った DNA を70%エタノール、次いで100%エタノールで洗浄する。

* 空気乾燥させる。

* 滅菌脱イオン水 (500 μl) に DNA を溶解する。

* DNA を4℃にて約16時間溶解させる。

* 溶解した DNA に RNase 1 (500U) を添加する。

* 37℃にて1時間インキュベートする。

* 等容量のフェノール／クロロホルムで再抽出し、次いでクロロホルム抽出物および沈殿物を上記のように処理する。

* 13,000rpmにて DNA を回転して落とす。

* 上清を除去し、そして70%エタノールでペレットを洗浄する。

* 空気乾燥させる。

* 200～500 μlの滅菌水に溶解する。

【0296】

d) DNAからの Cy 3 または Cy 5 で標識された DNA の調製

マイクロアレイスライド当たり1つの Cy 3 または1つの Cy 5 で標識された DNA 試料を調製する。

各試料について：

DNA	2～5 μg
ランダムプライマー	(3 μg/μl) 1 μl
水	41.5 μlにする。

【0297】

95℃にて5分間加熱し、氷上で急激に冷却し、そして短時間遠心分離する。

【0298】

それぞれに以下のものを加える：

10×REact 2緩衝液	5 μl
dNTP (5 mM dA/G/TTP、2 mM dCTP)	1 μl
Cy 3 または Cy 5 dCTP	1.5 μl
クレノウ (5 U/l)	1 μl

10

20

30

40

50

暗所で37℃にて90分間インキュベートする。

【0299】

スライドをプレハイブリダイズする

コプリンジャー (Coplin jar) 中でプレハイブリダイゼーション溶液を混合し、そして標識付け反応が平衡化する間、65℃にてインキュベートする。

【0300】

プレハイブリダイゼーション：20× S S C	8.75ml (3.5× S S C)
20% S D S	250 μ l (0.1% S D S)
B S A (100mg/ml)	5 ml (10mg/ml)
水	50mlにする。

10

【0301】

マイクロアレイスライドを、予め加熱したプレハイブリダイゼーション溶液中で65℃にて20分間インキュベートする。スライドを、400mlの水中で1分間全体的にリンスし、次いで400mlのプロパン-2-オール中で1分間リンスし、そしてスライドを、50mlの遠心チューブ中で1,500rpmにて5分間遠心分離して乾燥させる。スライドを暗所の無塵ボックスでハイブリダイゼーションまで保存する (1時間未満)。

【0302】

C y 3 / C y 5 標識した D N A を精製する - Qiagen MinElute Purification

* C y 3 および C y 5 で標識した D N A 試料を1つのチューブに合わせ、そして500 μ l の緩衝液 P B を添加する。

20

* コレクションチューブ中でMinEluteカラムにかけ、そして13,000rpmにて1分間遠心分離する。

* フロースルーを捨て、そして同じコレクションチューブ中にMinEluteカラムを戻して配置する。

* MinEluteカラムに500 μ l の緩衝液 P E を添加し、そして13,000rpmにて1分間遠心分離する。

* フロースルーを捨て、そして同じコレクションチューブ中にMinEluteカラムを戻して配置する。

* MinEluteカラムに250 μ l の緩衝液 P E を添加し、そして13,000rpmにて1分間遠心分離する。

30

* フロースルーを捨て、そして同じコレクションチューブ中にMinEluteカラムを戻して配置する。

* 13,000rpmにてさらに1分間遠心分離して、残りのエタノールを取り出す。

* 新鮮な1.5mlチューブ中にMinEluteカラムを配置する。

* メンブランの中心に10.5 μ l の水を添加し、そして1分間放置する。

* 13,000rpmにて1分間遠心分離する。

【0303】

e) R N A から の C y 3 または C y 5 で 標 識 さ れ た c D N A の 調 製

マイクロアレイスライド当たり1つのC y 3 または1つのC y 5 で標識されたc D N A 試料を調製する。

40

各試料について：

D N A	2 ~ 10 μ g
ランダムプライマー (3 μ g / μ l)	1 μ l
水	11 μ l にする。

【0304】

95℃にて5分間加熱し、氷上で急激に冷却し、そして短時間遠心分離する。

それぞれに以下のものを加える：

5×First Strand Buffer	5 μ l
D T T (100mM)	2.5 μ l
d N T P (5 mM d A / G / T T P , 2 mM d C T P)	2.3 μ l

50

Cy 3 または Cy 5 dCTP 1.7 μ l
 SuperScript II (200U/ μ l) 2.5 μ l。

【0305】

暗所で25℃にて10分間、次いで暗所で42℃にて90分間インキュベートする。

【0306】

スライドをプレハイブリダイズする

コプリンジャー (Coplín jar) 中でプレハイブリダイゼーション溶液を混合し、そして標識付け反応が平衡化する間、65℃にてインキュベートする。

プレハイブリダイゼーション: 20×SSC 8.75ml (3.5×SSC)

20% SDS 250 μ l (0.1% SDS) 10

B SA (100mg/ml) 5 ml (10mg/ml)

水 50mlにする。

【0307】

マイクロアレイスライドを、予め加熱したプレハイブリダイゼーション溶液中で65℃にて20分間インキュベートする。スライドを、400mlの水中で1分間全体的にリンスし、次いで400mlのプロパン-2-オール中で1分間リンスし、そしてスライドを、50mlの遠心チューブ中で1500rpmにて5分間遠心分離して乾燥させる。スライドを暗所の無塵ボックスでハイブリダイゼーションまで保存する (1時間未満)。

【0308】

Cy 3 / Cy 5 標識した cDNA を精製する - Qiagen MinElute Purification 20

* Cy 3 および Cy 5 で標識した DNA 試料を1つのチューブに合わせ、そして250 μ l の緩衝液 PE を添加する。

* コレクションチューブ中でMinEluteカラムにかけ、そして13,000rpmにて1分間遠心分離する。

* フロースルーを捨て、そして同じコレクションチューブ中にMinEluteカラムを戻して配置する。

* MinEluteカラムに500 μ lの緩衝液 PE を添加し、そして13,000rpmにて1分間遠心分離する。

* フロースルーを捨て、そして同じコレクションチューブ中にMinEluteカラムを戻して配置する。 30

* MinEluteカラムに250 μ lの緩衝液 PE を添加し、そして13,000rpmにて1分間遠心分離する。

* フロースルーを捨て、そして同じコレクションチューブ中にMinEluteカラムを戻して配置する。

* 13,000rpmにてさらに1分間遠心分離して、残りのエタノールを取り出す。

* 新鮮な1.5mlチューブ中にMinEluteカラムを配置する。

* メンブランの中心に10.5 μ lの水を添加し、そして1分間放置する。

* 13,000rpmにて1分間遠心分離する。

【0309】

f) スライドを Cy 3 / Cy 5 で標識された cDNA / DNA とハイブリダイズする 40

プレハイブリダイズしたマイクロアレイスライドをハイブリダイゼーションカセット中に置き、そしてカセット中のウェルに水の15 μ lアリコートをして2回添加する。再懸濁した Cy 3 / Cy 5 標識した cDNA 試料を、ハイブリダイゼーション溶液と混合する。

【0310】

ハイブリダイゼーション:

Cy 3 / Cy 5 標識した cDNA 試料 10.5 μ l

20×SSC 3.2 μ l (4×SSC)

2% SDS 2.3 μ l (0.3% SDS)。

【0311】

ハイブリダイゼーション溶液を95℃にて2分間加熱する。氷上で急激に冷却しないが、徐 50

々に冷却し、短時間遠心分離する。気泡形成を避けながらスライド上のアレイした領域の端にハイブリダイゼーション溶液をピペットで載せる。ピンセットを用いて、カバーガラスの端をスライドの表面に沿って、アレイした領域の方へ、およびアレイの端のハイブリダイゼーション溶液中に、注意深くドラッグする。一旦決まった位置に置くとさらなる移動を避けながら、カバーガラスをアレイ上に注意深く下げる。ハイブリダイゼーションカセットを密封し、そして60℃の水浴中に16～20時間沈める。

【0312】

スライドを洗浄する

ハイブリダイゼーションカセットからマイクロアレイスライドを取り出し、そして最初に、予め65℃まで加熱したWash Aの染色トラフ中でスライドを注意深く洗浄して、カバーガラスを除去する。一旦カバーガラスをスライドラック中のスライドの位置に移動し、そしてWash A中でさらに2分間攪拌を続ける。 10

【0313】

Wash A:

20×SSC	20ml (1×SSC)
20% SDS	1 ml (0.05% SDS)
水	400mlにする。

【0314】

スライドをクリーンなスライドラックに移し、そしてWash Bの第1のトラフ中で2分間攪拌する。Wash Bの第2のトラフ中で2分間攪拌しながら洗浄する。 20

【0315】

Wash B (×2) :

20×SSC	1.2ml (0.06×SSC)
水	400mlにする。

【0316】

スライドを50mlの遠心チューブに入れ、そして1500rpmにて5分間遠心分離して、スライドを乾燥させ、次いでマイクロアレイスライドスキャナーを用いて蛍光をスキャンする。スライドを、Affymetrix 428スキャナーを用いてスキャンした。生データを、ImaGeneおよびGeneSpringソフトウェアの組み合わせを用いて分析した。

【0317】

30

g) アレイの調製

M. tuberculosisゲノム全体のアレイを、ORF特異的プライマーを用いて、M. tuberculosisゲノムDNAから調製した。各ORFに対応するPCR産物を、標準的な顕微鏡ガラススライド上のグリッドに、BioRobotics microgridロボット (MWG Biotech) を用いて4000スポット/cm²より高い分解能でスポットした。

【0318】

結果

低DOT連続培養条件下でアップレギュレートされるM. tuberculosisのDNAをコードする配列のトランスクリプトミクス分析は、以下の配列番号を同定した (表2を参照のこと)。配列番号のカラムを参照すると、第1の同定した数字はアミノ酸配列であり、そして第2の同定した数字は対応するDNA配列である。 40

【0319】

【表2A】

遺伝子	割り当てられた機能	配列番号
Rv 1344	アシルキリヤアタンパク質	1, 2
Rv0283		3, 4
Rv3402c	多糖生成におけるアミノトランスフェラーゼ	5, 6
Rv3049c	モノオキシゲナーゼ	7, 8
Rv2382c (mbtC)	マイコバクチン生成に関連する	9, 10
Rv2381c (mbtD)	マイコバクチン生成に関連する	11, 12
Rv2379c (mbtF)	マイコバクチン生成に関連する	13, 14
Rv1994c	例えば、おそらく水銀耐性オペロンであるMERRIに類似する、転写レギュレーター	15, 16
Rv0251c (hsp)	HSP20ファミリーに属する熱ショックタンパク質	17, 18
Rv3174	酸化還元酵素	19, 20
fadE14 (Rv1346)	アシルCoAデヒドロゲナーゼ	21, 22
LipK (Rv2385)	エステラーゼ/アセチルヒドロラーゼ	23, 24
appC (Rv1623c)	シクロムD	25, 26
Rv0725c		27, 28
Rv3639c		29, 30
Rv0560c	メチルトランスフェラーゼ	31, 32

10

20

30

40

【 0 3 2 0 】

【 表 2 B 】

遺伝子	割り当てられた機能	配列番号
Rv2053c		33, 34
IpqS (Rv0847)	シグナルペプチドを含むリポタンパク質	35, 36
Rv3767c	おそらくN末端シグナルペプチドを有するタンパク質	37, 38
Rv3812		39, 40
Rv2210c (ilvE)	分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ	41, 42
Rv2516c	ヘリックスターナーヘリックスモチーフを有するタンパク質	43, 44
Rv0870c	疎水性タンパク質	45, 46
Rv1168c	PPEタンパク質	47, 48
Rv2448c (valS)	バリル-tRNAシンセターゼ	49, 50
Rv2378c (mbtG)	マイコバクチン合成に関連する。リジンヒドロキシラーゼ	51, 52
Rv2377c (mbtH)	マイコバクチン合成に関連する	53, 54
Rv0135c	転写レギュレーター	55, 56
Rv2025c		57, 58
Rv0985c (mscL)		59, 60
Rv0938		61, 62
Rv2554c		63, 64
Rv1342c	膜タンパク質	65, 66

【 0 3 2 1 】

【 表 2 C 】

10

20

30

40

遺伝子	割り当てられた機能	配列番号
Rv0397		67, 68
Rv1389 (gmk)	グアニル酸キナーゼ	69, 70
Rv0123		71, 72
Rv3001c (iivC)	ケトール酸レダクトイソメラーゼ	73, 74
Rv3839		75, 76
Rv2164c	プロリンリッチタンパク質	77, 78
Rv2017	転写レギュレーター	79, 80
Rv1982c		81, 82
Rv3758c (proV)	ABCトランスポーター。ATP結合タンパク質	83, 84
Rv3697c		85, 86
Rv1228 (lpqX)	シグナルペプチドを含むタンパク質	87, 88
Rv3000		89, 90
Rv3037c		91, 92
Rv1634	多くの抗生物質耐性(流出)タンパク質に類似する、主要ファシリテーター スーパーファミリーの膜タンパク質	93, 94
Rv1300 (hemK)	プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ	95, 96
Rv2327	未知	97, 98
Rv1221 (sigE)	σ 因子	99, 100

10

20

30

40

【 0 3 2 2 】

【 表 2 D 】

遺伝子	割り当てられた機能	配列番号
Rv1617 (pykA)	ピルビン酸キナーゼ	101, 102
Rv0792c	多くのGntRファミリー、例えば、Bacillus subtilisに類似する、転写レギュレーター	103, 104
Rv1509		105, 106
Rv3081	PS0 0850を含む	107, 108
Rv0347	Rv0831cに類似する	109, 110
Rv0573c		111, 112
Rv2019		113, 114

10

20

30

40

【0323】

実施例15—タンパク質抽出および特徴付けのためのプロトコル

M. tuberculosis H37Rvを、好気（50% D O T）および低酸素（1% D O T）条件下で連続培養で増殖し、そして試料を定常期中に収集した（実施例1を参照のこと）。

【0324】

培養細胞ペレットの採集

* 300～350mlの培養物を、氷上で一晚収集する。

50

* 培養物を、Sorvall RC5B遠心分離機を用いてドライスピチュープ中で 4℃で15,000 rpmにて10分間遠心分離する。

* 上清をデカントし、そして細胞ペレットをチューブ中に収集し、そして-40℃にて凍結保存する。

【0325】

細胞ペレットからのタンパク質抽出物の調製

* 3つの好気および2つの低酸素のケモスタット培養物のそれぞれからの定常期細胞ペレットの1つの試料を、フリーザーから取り出し、そして室温で1時間解凍した。

* 各ペレットを、40mlのTris-HCL緩衝液 [40ml当たり、40mM Tris、1 mM EDTA (pH6.9)]、および200 μlのプロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma、P8645) に再懸濁し、そして12,000rpmにて4℃での遠心分離により再ペレット化する。 10

* 次いで、各細胞ペレットを、約1mlの緩衝液と再懸濁する。

* 細菌懸濁液の0.5mlアリコート、別々のリボライザー (ribolyser) チューブ (Anac hem) 中に分散する。

* 各チューブを、3×90秒サイクル (最大出力セッティング6.5) で、各サイクル間は氷上で5分間でリボライズする。

* リボライズ後、各試料のタンパク質調製物をプールし、そして以下の化学物質を添加した：

3.2 g	尿素	
64.8mg	D T T	20
300 μl	両性電解質 (servalyte 2-4 serva 電気泳動)	
0.24 g	C H A P S。	

【0326】

* 各化学物質を、次の添加前に溶解する。

* 試料を、室温にて30分間インキュベートする。

* 試料を、エッペンドルフチューブ中に分散し、そして12,000rpmにて5分間遠心分離する。

* 次いで、澄明な可溶性タンパク質調製物を取り出し、そして0.2 μmの酢酸セルロースフィルターメンブランを通して二重濾過する。

* Bioradアッセイを用いる試料のタンパク質定量を、ウシ血清アルブミン標準曲線を用いて行い、そして試料が6~8.5mg/mlのタンパク質を含むことを見出した。 30

【0327】

2D電気泳動を用いるプロテオミクス分析

低酸素および好気ケモスタット培養物の代表的なタンパク質試料を、2D電気泳動分析のために、the Wittman Institute of Technology and Analysis of Biomolecules (WITA), Berlinに送付した。

【0328】

* 2D電気泳動による各試料のタンパク質分離 (Jungblutら、Infect Immun 2001年9月; 69(9):5905-7) を、それぞれ70 μlおよび25 μlのタンパク質試料を用いて生成したクーマシーブリリアントブルーおよび銀染色ゲルの両方で行った。 40

【0329】

タンパク質同定

* クーマシーの低酸素ゲル上の最も多いタンパク質スポットを切り出し、そしてタンパク質同定のためにRobin Wait (Jungblutら、Infect Immun 2001年9月; 69(9):5905-7) による質量分析決定に送付した。

【0330】

以下のタンパク質を同定し、そして表3に (それらの対応するDNAコード配列と一緒に) 挙げる。

【0331】

【表3】

遺伝子	割り当てられた機能	配列番号
Rv3040	31.5kDaタンパク質	115, 116
Rv1288	抗原85B-前駆体	117, 118
Rv0649	マロニルCoA-アシルキヤリアタンパク質トランスアシラーゼ	119, 120
Rv1357c	29.8および31.7 kDaタンパク質	121, 122
Rv2230c	39.6 kDaタンパク質	123, 124
Rv2468c		125, 126
Rv3011c	グルタミル-tRNA (Gln) アミドトランスフェラーゼサブユニット/ ATPB MYCTU ATPシンターゼβ鎖	127, 128
Rv2868c	GcpEタンパク質ホモログ	129, 130
Rv0718	30Sリボソームタンパク質S8	131, 132
Rv1267c	AFSR_STRCO P25941に類似する、応答レギュレーター	133, 134
Rv1294	ホモセリンデヒドロゲナーゼ	135, 136
Rv0844c	硝酸/亜硝酸応答レギュレーター (NARL)	137, 138

10

20

30

40

50

【0332】

参考文献：

1. McKinney, J.D., ら、Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase [コメントを参照の

こと]. Nature, 2000. 406(6797): 735-8頁。

2. Pelicic, V.ら、Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(20): 10955-60頁。

3. Lee, M.H.ら、Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(8): 3111-5頁。

4. McShane, H.ら、Enhanced immunogenicity of CD4(+) t-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. Infect Immun, 2001. 69(2): 681-6頁。

5. Movahedzadeh, F., M.J. Colston, および E.O. Davis, Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* LexA: recognition of a Cheo (Bacillus-type SOS) box. Microbiology, 1997. 143(Pt 3): 929-36頁。 10

【0333】

その他の参考文献：

Sambrook, J., E. F. Fritsch, および T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 第2版. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N. Y.。

Lefever, P., O. Denis, L. De Wit, A. Tanghe, P. Vandebussche, J. Content, および K. Huygen, 2000. Cloning of the gene encoding a 22-kilodalton cell surface antigen of *Mycobacterium bovis* BCG and analysis of its potential for DNA vaccination against tuberculosis. Infection and Immunity. 68:1040-1047。 20

Vordermeire, H. M., P. J. Cockle, A. O. Whelan, S. Rhodes, M. A. Chambers, D. Clifford, K. Huygen, R. Tascon, D. Lowrie, M. J. Colston, および R. G. Hewinson, 2000. Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test. Vaccine. 19:1246-1255。

Cheng, W., C. Hung, C. Chai, K. Hsu, L. He, C. Rice, M. Ling, および T. Wu, 2001. Enhancement of Sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 gene to an antigen. J. Immunol. 166:6218-6226。 30

Lalvani, A.ら、2001. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. The Lancet 357:2017-2021。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000721 A2(51) International Patent Classification: **C07K 14/195**

(74) Agents: MACLEAN, Martin, Robert et al.; Mathys & Squire, 100 Gray's Inn Road, London WC1X 8AL, (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/02845

(22) International Filing Date: 21 June 2002 (21.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0115365.9 22 June 2001 (22.06.2001) GB
0121780.1 7 September 2001 (07.09.2001) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): MICROBIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY [GB/GB]; CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PT, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): JAMES, Brian, William [GB/GB]; Microbiological Research Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (GB). BACON, Joanna [US/US]; Microbiological Research Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (US). MARSH, Philip [GB/GB]; Microbiological Research Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (GB).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/000721 A2

(54) Title: MYCOBACTERIAL ANTIGENS EXPRESSED UNDER LOW OXYGEN TENSION

(57) Abstract: A method is provided for identifying mycobacterial genes that are induced or up-regulated under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C. Said induced or up-regulated genes form the basis of nucleic acid vaccines, or provide targets to allow preparation of attenuated mycobacteria for vaccines against mycobacterial infections. Similarly, peptides encoded by said induced or up-regulated genes are employed in vaccines. In a further embodiment, the identified genes/peptides provide the means for identifying the presence of a mycobacterial infection in a clinical sample by nucleic acid probe or antibody detection.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

MYCOBACTERIAL ANTIGENS EXPRESSED UNDER LOW OXYGEN TENSION

The present invention relates to a method of identifying a gene in mycobacteria the expression of which gene is induced or up-regulated during continuous culture of mycobacteria under growth conditions defined by a low dissolved oxygen tension, to the isolated peptide products, variants, derivatives or fragments thereof, to antibodies that bind to said peptides, variants, derivatives or fragments, to DNA and RNA vectors that express said peptides, variants, derivatives or fragment, to attenuated mycobacteria in which the activity of at least one of said induced or up-regulated genes has been modified, to vaccines against mycobacterial infections, and to methods of detecting a mycobacterial infection.

Many microorganisms are capable of forming intracellular infections. These include: infections caused by species of *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Chlamydia* and *Mycobacteria*. Some of these infections are exclusively intracellular, others contain both intracellular and extracellular components. However, it is the intracellular survival cycle of bacterial infection which is suspected as a main supportive factor for disease progression.

Generally, these microorganisms do not circulate freely in the body, for example, in the bloodstream, and are often not amenable to drug treatment regimes. Where drugs are available, this problem has been exacerbated by the development of multiple drug resistant microorganisms.

A number of factors have contributed to the problem of microbial resistance. One is the accumulation of mutations over time and the subsequent horizontal and vertical transfer of the mutated genes to other organisms. Thus, for a given pathogen, entire classes of antibiotics have been rendered inactive. A further factor has been the absence of a new class of antibiotics in recent years. The emergence of multiple drug-resistant pathogenic bacteria represents a serious threat to public health and new forms of therapy are urgently required.

For similar reasons, vaccine therapies have not proved effective against such intracellular microorganisms. Also, increased systemic concentration of antibiotics to improve bioavailability within cells may result in severe side effects.

Mycobacterium tuberculosis and closely related species make up a small group

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-2-

of mycobacteria known as the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). This group comprises four species *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis* and *M. africanum* which are the causative agent in the majority of tuberculosis (TB) cases throughout the world.

5

M. tuberculosis is responsible for more than three million deaths a year world-wide. Other mycobacteria are also pathogenic in man and animals, for example *M. avium* subsp. *paratuberculosis* which causes Johne's disease in ruminants, *M. bovis* which causes tuberculosis in cattle, *M. avium* and *M. intracellulare* which cause tuberculosis in immunocompromised patients (eg. AIDS patients, and bone marrow transplant patients) and *M. leprae* which causes leprosy in humans. Another important mycobacterial species is *M. vaccae*.

10

M. tuberculosis infects macrophage cells within the body. Soon after macrophage infection, most *M. tuberculosis* bacteria enter, persist and replicate within cellular phagosome vesicles, where the bacteria are sequestered from host defences and extracellular factors.

15

It is the intracellular survival and multiplication or replication of bacterial infection which is suspected as a main supportive factor for mycobacterial disease progression.

20

A number of drug therapy regimens have been proposed for combatting *M. tuberculosis* infections, and currently combination therapy including the drug isoniazid has proved most effective. However, one problem with such treatment regimes is that they are long-term, and failure to complete such treatment can promote the development of multiple drug resistant microorganisms.

25

A further problem is that of providing an adequate bioavailability of the drug within the cells to be treated. Whilst it is possible to increase the systemic concentration of a drug (eg. by administering a higher dosage) this may result in severe side effects caused by the increased drug concentration.

30

The effectiveness of vaccine prevention against *M. tuberculosis* has varied widely. The current *M. tuberculosis* vaccine, BCG, is an attenuated strain of *M. bovis*. It is effective against severe complications of TB in children, but it varies greatly in its effectiveness in adults particularly across ethnic groups. BCG

35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-3-

vaccination has been used to prevent tuberculous meningitis and helps prevent the spread of *M. tuberculosis* to extra-pulmonary sites, but does not prevent infection.

- 5 The limited efficacy of BCG and the global prevalence of TB has led to an international effort to generate new, more effective vaccines. The current paradigm is that protection will be mediated by the stimulation of a Th1 immune response.
- 10 BCG vaccination in man was given orally when originally introduced, but that route was discontinued because of loss of viable BCG during gastric passage and of frequent cervical adenopathy. In experimental animal species, aerosol or intra-tracheal delivery of BCG has been achieved without adverse effects, but has varied in efficacy from superior protection than parenteral inoculation in
- 15 primates, mice and guinea pigs to no apparent advantage over the subcutaneous route in other studies.

- Conventional mycobacterial culture systems for analysing gene and protein expression profiles have been based on simple batch-type systems, such as
- 20 those described in:- Sherman, D.R. *et al* (2001) PNAS, vol. 98, no.13, pp. 7534-7539; Boon, C. *et al* (2001) J. Bacteriol, vol. 183, no.8, pp. 2672-2676; Cunningham, A.F. *et al* (1998) J. Bacteriol, vol. 180, no.4, pp. 801-808; and Murugasu-Oei, B. *et al* (1999) Mol. Gen. Genet, vol. 262, pp. 677-682. In these batch-type systems, mycobacterial growth follows a typical sigmoid
- 25 growth curve involving an exponential growth phase and a stationary phase. The transition from exponential phase to stationary phase involves rapid and transient switches in terms of gene and protein expression, which switches are initiated by a complex set of undefined or poorly defined interactive stimuli as the mycobacteria become starved of essential nutrients.

- 30 There is therefore a need for an improved and/or alternative vaccine or therapeutic agent for combatting mycobacterial infections.

- According to a first aspect of the invention there is provided an isolated
- 35 mycobacterial peptide or a fragment, derivative or variant thereof, wherein the peptide is encoded by a gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-4-

by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C.

- 5 The continuous culture methods employed by the present invention are particularly advantageous when compared with batch culture methods. This is because continuous culture permits strict control of growth culture parameters such as pH, available nutrients, constant growth rate, and dissolved oxygen tension.
- 10 Thus, in use of the present invention it is possible to ensure that the principal, preferably the only mycobacterial virulence induction parameter is that of a low dissolved oxygen tension. This means that the accidental induction or up-regulation of genes that are solely responsive to environmental switches other than to a low dissolved oxygen tension may be substantially prevented.
- 15 Accordingly, false-positive identification of genes whose induction or up-regulation is unrelated to a low dissolved oxygen tension may be substantially avoided.
- 20 Mycobacterial batch culture systems involve a variety of interactive stimuli as the mycobacteria become starved of essential nutrients. As a result, the mycobacteria are exposed to a complex range of starvation stimuli, which stimuli may obscure or modify the cellular effects associated with a single rapid or transient stimulus in isolation. In contrast, the present invention concerns
- 25 the principal stimulus of oxygen limitation.
- A further distinction between the continuous culture conditions of the present invention and batch-type systems is that the present invention employs oxygen limitation as the principal stimulus and does not involve oxygen starvation.
- 30 During oxygen limitation, the mycobacteria are capable of growth and reproduction, and the present invention therefore maintains mycobacterial growth under carefully controlled environmental conditions. In contrast, mycobacteria do not substantially grow and reproduce when exposed to starvation stimuli such as those experienced with batch-type culture systems.
- 35 Such starvation stimuli are typically associated with stress-type environmental conditions, and invoke mycobacterial cellular responses that are different from those associated with nutrient limitation.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-5-

The dissolved oxygen tension parameter is calculated by means of an oxygen electrode and conventional laboratory techniques. Thus, 100 % air saturation corresponds to a solution that is saturated with air, whereas 0% corresponds to a solution that has been thoroughly purged with an inert gas such as nitrogen. Calibration is performed under standard atmospheric pressure conditions, and with conventional air comprising approximately 21 % oxygen.

The low oxygen tension induction conditions of the present invention are culture conditions which are conducive for a mycobacterium to express at least one gene which would be normally expressed *in vivo* during infection of the mycobacterium's natural target cell, which the present inventors believe to involve a low oxygen environment.

The terms "isolated," "substantially pure," and "substantially homogenous" are used interchangeably to describe a peptide which has been separated from components which naturally accompany it. A peptide is substantially pure when at least about 60 to 75% of a sample exhibits a single peptide sequence. A substantially pure peptide will typically comprise about 60 to 90% w/w of a protein sample, more usually about 95%, and preferably will be over about 99% pure. Peptide purity or homogeneity may be indicated by, for example, polyacrylamide gel electrophoresis of a protein sample, followed by visualizing a single polypeptide band upon staining the gel. Alternatively, higher resolution may be provided by using, for example, HPLC.

A peptide is considered to be isolated when it is separated from the contaminants which accompany it in its natural state. Thus, a peptide which is chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the cell from which it naturally originates will be substantially free from its naturally associated components.

The present invention provides peptides which may be purified from mycobacteria as well as from other types of cells transformed with recombinant nucleic acids encoding these peptides.

If desirable, the amino acid sequence of the proteins of the present invention may be determined by protein sequencing methods.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-6-

The terms "peptide", "oligopeptide", "polypeptide", and "protein" are used interchangeably and do not refer to a specific length of the product. These terms embrace post-translational modifications such as glycosylation, acetylation, and phosphorylation.

5

The term "fragment" means a peptide having at least five, preferably at least ten, more preferably at least twenty, and most preferably at least thirty-five amino acid residues of the peptide which is the gene product of the induced or up-regulated gene in question. The fragment preferably includes an epitope of the gene product in question.

10

The term "variant" means a peptide or peptide "fragment" having at least seventy, preferably at least eighty, more preferably at least ninety percent amino acid sequence homology with the peptide which is the gene product of the induced or up-regulated gene in question. An example of a "variant" is a peptide or peptide fragment of an induced/up-regulated gene which contains one or more analogs of an amino acid (eg. an unnatural amino acid), or a substituted linkage. The terms "homology" and "identity" are considered synonymous in this specification. In a further embodiment, a "variant" may be a mimic of the peptide or peptide fragment, which mimic reproduces at least one epitope of the peptide or peptide fragment. The mimic may be, for example, a nucleic acid mimic, preferably a DNA mimic.

15

20

For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences may be compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequent coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percentage sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters.

25

30

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted, for example, by the local homology alignment algorithm of Smith and Waterman [Adv. Appl. Math. 2: 484 (1981)], by the algorithm of Needleman & Wunsch [J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)] by the search for similarity method of Pearson & Lipman [Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)], by computer implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA -

35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-7-

Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), or by visual inspection [see Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausbel et al, eds, Current Protocols, a joint venture
5 between Greene Publishing Associates, Inc. And John Wiley & Sons, Inc. (1995 Supplement) Ausubel].

Examples of algorithms suitable for determining percent sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms [see Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:
10 pp. 403-410; and "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/" of the National Center for Biotechnology Information].

In a preferred homology comparison, the identity exists over a region of the sequences that is at least 50 nucleotides in length.

15 The term "derivative" means a peptide comprising the peptide (or fragment, or variant thereof) which is the gene product of the induced or up-regulated gene in question. Thus, a derivative may include the peptide in question, and a further peptide sequence which may introduce one or more additional epitopes.
20 The further peptide sequence should preferably not interfere with the basic folding and thus conformational structure of the peptide in question. Examples of a "derivative" are a fusion protein, a conjugate, and a graft. Thus, two or more peptides (or fragments, or variants) may be joined together to form a derivative. Alternatively, a peptide (or fragment, or variant) may be joined to an
25 unrelated molecule (eg. a peptide). Derivatives may be chemically synthesized, but will be typically prepared by recombinant nucleic acid methods. Additional components such as lipid, and/or polysaccharide, and/or polyketide components may be included.

30 All of the molecules "fragment", "variant" and "derivative" have a common antigenic cross-reactivity and/or substantially the same *in vivo* biological activity as the gene product of the induced or up-regulated gene in question from which they are derived. For example, an antibody capable of binding to a fragment, variant or derivative would be also capable of binding to the gene
35 product of the induced or up-regulated gene in question. It is a preferred feature that the fragment, variant and derivative each possess the active site of the peptide which is the induced or up-regulated peptide in question. Alternatively,

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-8-

all of the above embodiments of a peptide of the present invention share a common ability to induce a "recall response" of a T-lymphocyte which has been previously exposed to an antigenic component of a mycobacterial infection.

- 5 In a preferred embodiment, the peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, and 137.

15 According to a second aspect of the present invention there is provided a method of identifying a mycobacterial gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C, said method comprising:-

20 culturing a first mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C;

culturing a second mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C;

25 obtaining first and second mRNA populations from said first and second mycobacteria, respectively;

preparing first and second cDNA populations from said first and second mRNA populations, respectively, during which cDNA preparation a detectable label is introduced into the cDNA molecules of the first and second cDNA populations;

30 isolating corresponding first and second cDNA molecules from the first and second cDNA populations, respectively;

comparing relative amounts of label or corresponding signal emitted from the label present in the isolated first and second cDNA molecules;

35 identifying a greater amount of label or signal provided by the isolated first cDNA molecule than that provided by the isolated second cDNA molecule; and

identifying the first cDNA and the corresponding mycobacterial gene

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-9-

which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C.

- 5 Reference to gene throughout this specification embraces open reading frames (ORFs).

The various embodiments described for the first aspect of the present invention apply equally for the second and subsequent aspects of the present invention.

10

"Corresponding first and second cDNA molecules from the first and second cDNA populations" refers to cDNAs having substantially the same nucleotide sequence. Thus, by isolating the cDNA copies relating to a given gene under each culture condition (ie. high oxygen, and low oxygen), it is possible to

15 quantify the relative copy number of cDNA for that gene for each culture condition. Since each cDNA copy has been produced from an mRNA molecule, the cDNA copy number reflects the corresponding mRNA copy number for each culture condition, and thus it is possible to identify induced or up-regulated genes.

20

The mycobacterium is selected from the species *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. africanum*, *M. caneti*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. genavense*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. haemophilum*, *M. asiaticum*, *M. malmoense*, *M. vaccae* and *M. shimoidei*. Of particular interest are members of the MTC, preferably *M. tuberculosis*. Similarly, all embodiments of the present invention may be based on the above-identified mycobacterial sources.

25

- 30 Suitable media for culturing mycobacteria are described in Wayne, L.G. (1994) [*In Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control* published by the American Society for Microbiology, pp. 73-83]. These include Middlebrook 7H9 Medium [see Barker, L.P., *et al.* (1998) *Molec. Microbiol.*, vol. 29(5), pp. 1167-1177], and WO00/52139 in the name of the present Applicant.

35

In one embodiment, the first and second cDNA molecules are isolated from the corresponding cDNA populations by hybridisation to an array containing

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-10-

immobilised DNA sequences that are representative of each known gene (or ORF) within a particular mycobacterial species' genome. Thus, a first cDNA may be considered "corresponding" to a second cDNA if both cDNAs hybridise to the same immobilised DNA sequence. Alternatively, representative DNA sequences from a particular mycobacterial strain, or from a number of different species and/or strains may be employed in the array.

In another embodiment, the first and second cDNAs are prepared by incorporation of a fluorescent label. The first and second cDNAs may incorporate labels which fluoresce at different wavelengths, thereby permitting dual fluorescence and simultaneous detection of two cDNA samples.

The type of label employed naturally determines how the output of the detection method is read. When using fluorescent labels, a confocal laser scanner is preferably employed.

In use, it is preferred that those genes (ie. as represented by cDNAs in the detection assay) which are up-regulated by at least 1.5-fold under low oxygen culture conditions *vis-a-vis* high oxygen culture conditions are selected. In more preferred embodiments, the corresponding up-regulation selection criterium is at least 2-fold, more preferably 3-fold, most preferably 4-fold. In further embodiments up-regulation levels of at least 10-fold, preferably 50-fold may be employed.

The preferred nucleic acid and peptide sequences of the present invention are those that are up-regulated by the above-identified levels.

According to one embodiment, fluorescently labelled cDNA sequences from low and high oxygen cultured systems were allowed to hybridise with a whole mycobacterial genome array. The first cDNA population was labelled with fluorescent label A, and the second cDNA population was labelled with fluorescent label B. The array was scanned at two different wavelengths corresponding to the excitable maxima of each dye and the intensity of the emitted light was recorded. Multiple arrays were prepared for each cDNA and a mean intensity value was calculated across the two cDNA populations for each spot with each dye, against which relative induction or up-regulation was quantified.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-11-

In addition to the above mRNA isolation and cDNA preparation and labelling, genomic DNA may be isolated from the first and second mycobacteria. Thus, in a preferred embodiment, labelled DNA is also prepared from the isolated DNA. The labelled DNA may be then included on each array as a control.

5

As an alternative to the above-described transcriptomics based method for identifying up-regulated or induced genes, identification may be performed at the protein level rather than at the mRNA level. In more detail, protein samples may be removed from the first and second mycobacteria, and then exposed to conventional separation techniques such as SDS-PAGE or non-denaturation electrophoresis prior to conventional analysis such as by densitometer analysis. By comparing the relative amounts of a particular protein from each of the first and second mycobacteria, those proteins the production of which is up-regulated or induced under oxygen limitation may be identified.

15

The preferred maximum dissolved oxygen tension threshold defining the low oxygen culture condition is up to 5 % air saturation measured at 37 °C, more preferably up to 2 % air saturation measured at 37 °C, and most preferably up to 1 % air saturation measured at 37 °C. The corresponding minimum DOT is typically at least 0.5 % air saturation measured at 37 °C, preferably at least 1 % air saturation measured at 37 °C.

20

Similarly, the preferred minimum dissolved oxygen tension threshold defining the high oxygen culture condition is 45 % air saturation measured at 37 °C, and more preferably 50 % air saturation measured at 37 °C.

25

The pH of the culture medium is preferably maintained between pH 6 and 8, more preferably between pH 6.5 and 7.5, most preferably at about pH 6.9.

30

Preferred nucleic acid and peptide sequences of the present invention are those that are up-regulated under the above-identified DOT and pH conditions.

According to a third aspect of the present invention, there is provided an inhibitor of a mycobacterial peptide, wherein the peptide is encoded by a gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when

35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-12-

compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C, and wherein the inhibitor is capable of preventing or inhibiting the mycobacterial peptide from exerting its native biological effect.

- 5 Inhibition of the mycobacterial peptide may be effected at the nucleic acid level (ie. DNA, or RNA), or at the peptide level.

10 In one embodiment, the inhibitor is capable of inhibiting one or more of acyl carrier protein, monooxygenase, mycobactin synthesis protein, transcription regulator, oxidoreductase, acyl CoA dehydrogenase, esterase/acetyl hydrolase, cytochrome D, methyl transferase, transaminase, PPE protein, valyl-tRNA synthetase, guanylate kinase, ketol acid reductoisomerase, ABC transporter, ATP-binding protein, protoporphyrinogen oxidase, sigma factor, pyruvate kinase, heat shock protein, and aminotransferase.

15 In a further embodiment, the inhibitor may be an antibiotic capable of targeting the induced or up-regulated mycobacterial gene identifiable by the present invention, or the gene product thereof. The antibiotic is preferably specific for the gene and/or gene product.

20 Inhibitors of the present invention may be prepared utilizing the sequence information of provided herein. For example, this may be performed by overexpressing the peptide, purifying the peptide, and then performing X-ray crystallography on the purified peptide to obtain its molecular structure. Next, 25 compounds are created which have similar molecular structures to all or portions of the polypeptide or its substrate. The compounds may be then combined with the peptide and attached thereto so as to block one or more of its biological activities.

30 Also included within the invention are isolated or recombinant polynucleotides that bind to the regions of the mycobacterial chromosome containing sequences that are associated with induction/up-regulation under low oxygen tension (ie. virulence), including antisense and triplex-forming polynucleotides. As used herein, the term "binding" refers to an interaction or complexation 35 between an oligonucleotide and a target nucleotide sequence, mediated through hydrogen bonding or other molecular forces. The term "binding" more specifically refers to two types of internucleotide binding mediated through

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-13-

base-base hydrogen bonding. The first type of binding is "Watson-Crick-type" binding interactions in which adenine-thymine (or adenine-uracil) and guanine-cytosine base-pairs are formed through hydrogen bonding between the bases. An example of this type of binding is the binding traditionally associated with the DNA double helix and in RNA-DNA hybrids; this type of binding is normally detected by hybridization procedures.

The second type of binding is "triplex binding". In general, triplex binding refers to any type of base-base hydrogen bonding of a third polynucleotide strand with a duplex DNA (or DNA-RNA hybrid) that is already paired in a Watson-Crick manner.

In a preferred embodiment, the inhibitor may be an antisense nucleic acid sequence which is complementary to at least part of the inducible or up-regulatable gene.

The inhibitor, when in the form of a nucleic acid sequence, in use, comprises at least 15 nucleotides, preferably at least 20 nucleotides, more preferably at least 30 nucleotides, and most preferably at least 50 nucleotides.

According to a fourth aspect of the invention, there is provided an antibody which binds to a peptide encoded by a gene, or to a fragment or variant or derivative of said peptide, the expression of which gene is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C.

The antibody preferably has specificity for the peptide in question, and following binding thereto may initiate coating of the mycobacterium. Coating of the bacterium preferably leads to opsonization thereof. This, in turn, leads to the bacterium being destroyed. It is preferred that the antibody is specific for the mycobacterium (eg. species and/or strain) which is to be targeted.

Opsonization by antibodies may influence cellular entry and spread of mycobacteria in phagocytic and non-phagocytic cells by preventing or modulating receptor-mediated entry and replication in macrophages.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-14-

- The peptides, fragments, variants or derivatives of the present invention may be used to produce antibodies, including polyclonal and monoclonal. If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal (eg. mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunized with an immunogenic polypeptide. Serum from the immunized animal is collected and treated according to known procedures. If serum containing polyclonal antibodies to a desired mycobacterial epitope contains antibodies to other antigens, the polyclonal antibodies may be purified by immunoaffinity chromatography.
- Alternatively, general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas involving, for example, preparation of immortal antibody-producing cell lines by cell fusion, or other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus may be employed.
- The antibody employed in this aspect of the invention may belong to any antibody isotype family, or may be a derivative or mimic thereof. Reference to antibody throughout this specification embraces recombinantly produced antibody, and any part of an antibody which is capable of binding to a mycobacterial antigen.
- In one embodiment the antibody belongs to the IgG, IgM or IgA isotype families.
- In a preferred embodiment, the antibody belongs to the IgA isotype family. Reference to the IgA isotype throughout this specification includes the secretory form of this antibody (ie. sIgA). The secretory component (SC) of sIgA may be added *in vitro* or *in vivo*. In the latter case, the use of a patient's natural SC labelling machinery may be employed.
- In one embodiment, the antibody may be raised against a peptide from a member of the MTC, preferably against *M. tuberculosis*.
- In a preferred embodiment, the antibody is capable of binding to a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91,

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-15-

93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, and 137 (or fragment, variant, of derivative thereof).

- 5 In a further embodiment, the antigen is an exposed component of a mycobacterial bacillus. In another embodiment, the antigen is a cell surface component of a mycobacterial bacillus.

- 10 The antibody of the present invention may be polyclonal, but is preferably monoclonal.

- Without being bound by any theory, it is possible that following mycobacterial infection of a macrophage, the macrophage is killed and the bacilli are released. It is at this stage that the mycobacteria are considered to be most vulnerable to antibody attack. Thus, it is possible that the antibodies of the present invention act on released bacilli following macrophage death, and thereby exert a post-infection effect.
- 15

- It is possible that the passive protection aspect (ie. delivery of antibodies) of the present invention is facilitated by enhanced accessibility of the antibodies of the present invention to antigens on mycobacterial bacilli harboured by the infected macrophages. Indeed, *acr* expression is low during logarithmic growth, but increases at the stationary or oxygen limiting stage, and particularly in organisms which replicate within macrophages. As *acr* expression appears to be necessary for mycobacterial infectivity, it is possible that antibody binding may block macrophage infection by steric hindrance or disruption of its oligomeric structure. Thus, antibodies acting on mycobacterial bacilli released from killed, infected macrophages may interfere with the spread of re-infection to fresh macrophages. This hypothesis involves a synergistic action between antibodies and cytotoxic T cells, acting early after infection, eg. $\gamma\delta$ and NK T cells, but could later involve also CD8 and CD4 cytotoxic T cells.
- 20
- 25
- 30

- According to a fifth aspect of the invention, there is provided an attenuated mycobacterium in which a gene has been modified thereby rendering the mycobacterium substantially non-pathogenic, wherein said gene is a gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved
- 35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-16-

oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C.

- 5 The term "modified" refers to any genetic manipulation such as a nucleic acid or nucleic acid sequence replacement, a deletion, or an insertion which renders the mycobacterium substantially non-pathogenic. In one embodiment the entire inducible or up-regulatable gene may be deleted.
- 10 In a preferred embodiment, the gene to be modified has a wild-type coding sequence corresponding to one of the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114,
- 15 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, and 138.

It will be appreciated that the wild-type sequences may include minor variations depending on the Database employed.

- 20 According to a sixth aspect of the invention there is provided an attenuated microbial carrier, comprising a peptide encoded by a gene, or a fragment or variant or derivative of said peptide, the expression of which gene is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation
- 25 measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C.

- In use, the peptide (or fragment, variant or derivative) is either at least partially exposed at the surface of the carrier, or the carrier becomes degraded *in vivo*
- 30 so that at least part of the peptide (or fragment, variant or derivative) is otherwise exposed to a host's immune system.

- In one embodiment, the attenuated microbial carrier is selected from the group consisting of attenuated salmonella, attenuated vaccinia virus, attenuated fowlpox virus, or attenuated *M. bovis* (eg. BCG strain).
- 35

In a preferred embodiment, the peptide is selected from the group consisting

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-17-

of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135 and
 5 137 (or fragment, variant, of derivative thereof).

According to a seventh aspect of the invention, there is provided a DNA plasmid comprising a promoter, a polyadenylation signal, and a DNA sequence that encodes a gene or a fragment or variant or derivative of said gene, the
 10 expression of which gene is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C, wherein the promoter and polyadenylation signal are
 15 operably linked to the DNA sequence.

The term DNA "fragment" used in this invention will usually comprise at least about 5 codons (15 nucleotides), more usually at least about 7 to 15 codons, and most preferably at least about 35 codons. This number of nucleotides is
 20 usually about the minimal length required for a successful probe that would hybridize specifically with such a sequence.

In preferred embodiments, the DNA "fragment" has a nucleotide length which is at least 50%, preferably at least 70%, and more preferably at least 80% that
 25 of the coding sequence of the corresponding induced/up-regulated gene.

The term DNA "variant" means a DNA sequence which has substantial homology or substantial similarity to the coding sequence (or a fragment thereof) of an induced/up-regulated gene. A nucleic acid or fragment thereof is
 30 "substantially homologous" (or "substantially similar") to another if, when optimally aligned (with appropriate nucleotide insertions or deletions) with the other nucleic acid (or its complementary strand), there is nucleotide sequence identity in at least about 60% of the nucleotide bases, usually at least about
 35 70%, more usually at least about 80%, preferably at least about 90%, and more preferably at least about 95 to 98% of the nucleotide bases. Homology determination is performed as described *supra* for peptides.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-18-

Alternatively, a DNA "variant" is substantially homologous (or substantially similar) with the coding sequence (or a fragment thereof) of an induced/up-regulated gene when they are capable of hybridizing under selective hybridization conditions. Selectivity of hybridization exists when hybridization occurs which is substantially more selective than total lack of specificity. Typically, selective hybridization will occur when there is at least about 65% homology over a stretch of at least about 14 nucleotides, preferably at least about 70%, more preferably at least about 75%, and most preferably at least about 90%. See, Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12:203-213. The length of homology comparison, as described, may be over longer stretches, and in certain embodiments will often be over a stretch of at least about 17 nucleotides, usually at least about 20 nucleotides, more usually at least about 24 nucleotides, typically at least about 28 nucleotides, more typically at least about 32 nucleotides, and preferably at least about 36 or more nucleotides.

Nucleic acid hybridization will be affected by such conditions as salt concentration (eg. NaCl), temperature, or organic solvents, in addition to the base composition, length of the complementary strands, and the number of nucleotide base mismatches between the hybridizing nucleic acids, as will be readily appreciated by those skilled in the art. Stringent temperature conditions are preferably employed, and generally include temperatures in excess of 30°C, typically in excess of 37°C and preferably in excess of 45°C. Stringent salt conditions will ordinarily be less than 1000 mM, typically less than 500 mM, and preferably less than 200 mM. The pH is typically between 7.0 and 8.3. However, the combination of parameters is much more important than the measure of any single parameter. See, eg., Wetmur and Davidson (1968) J. Mol. Biol. 31:349-370.

The term DNA "derivative" means a DNA polynucleotide which comprises a DNA sequence (or a fragment, or variant thereof) corresponding to the coding sequence of the induced/up-regulated gene and an additional DNA sequence which is not naturally associated with the DNA sequence corresponding to the coding sequence. The comments on peptide derivative *supra* also apply to DNA "derivative". A "derivative" may, for example, include two or more coding sequences of a mycobacterial operon that is induced during oxygen limitation. Thus, depending on the presence or absence of a non-coding region between the coding sequences, the expression product/s of such a "derivative" may be

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-19-

a fusion protein, or separate peptide products encoded by the individual coding regions.

5 The above terms DNA "fragment", "variant", and "derivative" have in common with each other that the resulting peptide products have cross-reactive antigenic properties which are substantially the same as those of the corresponding wild-type peptide. Preferably all of the peptide products of the above DNA molecule embodiments of the present invention bind to an antibody which also binds to the wild-type peptide. Alternatively, all of the above peptide
10 products are capable of inducing a "recall response" of a T lymphocyte which has been previously exposed to an antigenic component of a mycobacterial infection.

15 The promoter and polyadenylation signal are preferably selected so as to ensure that the gene is expressed in a eukaryotic cell. Strong promoters and polyadenylation signals are preferred.

In a related aspect, the present invention provides an isolated RNA molecule which is encoded by a DNA sequence of the present invention, or a fragment
20 or variant or derivative of said DNA sequence.

An "isolated" RNA is an RNA which is substantially separated from other mycobacterial components that naturally accompany the sequences of interest, eg., ribosomes, polymerases, and other mycobacterial polynucleotides such as
25 DNA and other chromosomal sequences.

The above RNA molecule may be introduced directly into a host cell as, for example, a component of a vaccine.

30 Alternatively the RNA molecule may be incorporated into an RNA vector prior to administration.

The polynucleotide sequences (DNA and RNA) of the present invention include a nucleic acid sequence which has been removed from its naturally occurring
35 environment, and recombinant or cloned DNA isolates and chemically synthesized analogues or analogues biologically synthesized by heterologous systems.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-20-

The term "recombinant" as used herein intends a polynucleotide of genomic, cDNA, semisynthetic, or synthetic origin which, by virtue of its origin or manipulation: (1) is not associated with all or a portion of a polynucleotide with which it is associated in nature; or (2) is linked to a polynucleotide other than that to which it is linked in nature; and (3) does not occur in nature. This artificial combination is often accomplished by either chemical synthesis means, or by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, eg., by genetic engineering techniques. Such is usually done to replace a codon with a redundant codon encoding the same or a conservative amino acid, while typically introducing or removing a sequence recognition site. Alternatively, it is performed to join together nucleic acid segments of desired functions to generate a desired combination of functions.

In embodiments of the invention the polynucleotides may encode a peptide which is induced or up-regulated under low oxygen tension. A nucleic acid is said to "encode" a peptide if, in its native state or when manipulated, it can be transcribed and/or translated to produce the peptide or a fragment or variant or derivative thereof. The anti-sense strand of such a nucleic acid is also said to encode the sequence.

Also contemplated within the invention are expression vectors comprising the polynucleotide of interest. Expression vectors generally are replicable polynucleotide constructs that encode a peptide operably linked to suitable transcriptional and translational regulatory elements. Examples of regulatory elements usually included in expression vectors are promoters, enhancers, ribosomal binding sites, and transcription and translation initiation and termination sequences. These regulatory elements are operably linked to the sequence to be translated. A nucleic acid sequence is operably linked when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects its transcription or expression. Generally, operably linked means that the DNA sequences being linked are contiguous and, where necessary to join two protein coding regions, contiguous and in reading frame. The regulatory elements employed in the expression vectors containing a polynucleotide encoding a virulence factor are functional in the host cell used for expression.

The polynucleotides of the present invention may be prepared by any means

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-21-

- known in the art. For example, large amounts of the polynucleotides may be produced by replication in a suitable host cell. The natural or synthetic DNA fragments coding for a desired fragment will be incorporated into recombinant nucleic acid constructs, typically DNA constructs, capable of introduction into and replication in a prokaryotic or eukaryotic cell. Usually the DNA constructs will be suitable for autonomous replication in a unicellular host, such as yeast or bacteria, but may also be intended for introduction to and integration within the genome of a cultured insect, mammalian, plant or other eukaryotic cell lines.
- The polynucleotides of the present invention may also be produced by chemical synthesis, e.g., by the phosphoramidite method or the triester method, and may be performed on commercial automated oligonucleotide synthesizers. A double-stranded fragment may be obtained from the single stranded product of chemical synthesis either by synthesizing the complementary strand and annealing the strand together under appropriate conditions or by adding the complementary strand using DNA polymerase with an appropriate primer sequence.
- DNA constructs prepared for introduction into a prokaryotic or eukaryotic host will typically comprise a replication system recognized by the host, including the intended DNA fragment encoding the desired peptide, and will preferably also include transcription and translational initiation regulatory sequences operably linked to the polypeptide encoding segment. Expression vectors may include, for example, an origin of replication or autonomously replicating sequence (ARS) and expression control sequences, a promoter, an enhancer and necessary processing information sites, such as ribosome-binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, transcriptional terminator sequences, and mRNA stabilizing sequences. Secretion signals from polypeptides secreted from the host cell of choice may also be included where appropriate, thus allowing the protein to cross and/or lodge in cell membranes, and thus attain its functional topology or be secreted from the cell.
- Appropriate promoter and other necessary vector sequences are selected so as to be functional in the host, and may, when appropriate, include those naturally associated with mycobacterial genes. Promoters such as the trp, lac and phage promoters, tRNA promoters and glycolytic enzyme promoters may be used in

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-22-

prokaryotic hosts. Useful yeast promoters include the promoter regions for metallothionein, 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes such as enolase or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enzymes responsible for maltose and galactose utilization, and others.

5

Appropriate non-native mammalian promoters may include the early and late promoters from SV40 or promoters derived from murine moloney leukemia virus, mouse mammary tumour virus, avian sarcoma viruses, adenovirus II, bovine papilloma virus or polyoma. In addition, the construct may be joined to

10

an amplifiable gene (e.g., DHFR) so that multiple copies of the gene may be made.

While such expression vectors may replicate autonomously, they may less preferably replicate by being inserted into the genome of the host cell.

15

Expression and cloning vectors will likely contain a selectable marker, a gene encoding a protein necessary for the survival or growth of a host cell transformed with the vector. The presence of this gene ensures the growth of only those host cells which express the inserts. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxic substances, e.g. ampicillin, neomycin, methotrexate, etc.; (b) complement auxotrophic deficiencies; or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g. the gene encoding D-alanine racemase for Bacilli. The choice of appropriate selectable marker will depend on the host cell.

20

25

The vectors containing the nucleic acids of interest can be transcribed *in vitro* and the resulting RNA introduced into the host cell (e.g., by injection), or the vectors can be introduced directly into host cells by methods which vary depending on the type of cellular host, including electroporation; transfection employing calcium chloride, rubidium chloride, calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances; microprojectile bombardment; lipofection; infection (where the vector is an infectious agent, such as a retroviral genome). The cells into which have been introduced nucleic acids described above are meant to also include the progeny of such cells.

30

35

Large quantities of the nucleic acids and peptides of the present invention may be prepared by expressing the nucleic acids or portions thereof in vectors or other expression vehicles in compatible prokaryotic or eukaryotic host cells. The

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-23-

most commonly used prokaryotic hosts are strains of *Escherichia coli*, although other prokaryotes, such as *Bacillus subtilis* or *Pseudomonas* may also be used.

5 Mammalian or other eukaryotic host cells, such as those of yeast, filamentous fungi, plant, insect, amphibian or avian species, may also be useful for production of the proteins of the present invention. Propagation of mammalian cells in culture is *per se* well known. Examples of commonly used mammalian host cell lines are VERO and HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, and WI38, BHK, and COS cell lines, although other cell lines may be
10 appropriate, e.g., to provide higher expression, desirable glycosylation patterns.

Clones are selected by using markers depending on the mode of the vector construction. The marker may be on the same or a different DNA molecule, preferably the same DNA molecule. The transformant may be screened or,
15 preferably, selected by any of the means well known in the art, e.g., by resistance to such antibiotics as ampicillin, tetracycline.

The polynucleotides of the invention may be inserted into the host cell by any means known in the art, including for example, transformation, transduction, and electroporation. As used herein, "recombinant host cells", "host cells",
20 "cells", "cell lines", "cell cultures", and other such terms denoting microorganisms or higher eukaryotic cell lines cultured as unicellular entities refer to cells which can be, or have been, used as recipients for recombinant vector or other transfer DNA, and include the progeny of the original cell which
25 has been transformed. It is understood that the progeny of a single parental cell may not necessarily be completely identical in morphology or in genomic or total DNA complement as the original parent, due to natural, accidental, or deliberate mutation. "Transformation", as used herein, refers to the insertion of an exogenous polynucleotide into a host cell, irrespective of the method used
30 for the insertion, for example, direct uptake, transduction, *f*-mating or electroporation. The exogenous polynucleotide may be maintained as a non-integrated vector, for example, a plasmid, or alternatively, may be integrated into the host cell genome.

35 In one embodiment, a DNA plasmid or RNA vector may encode a component of the immune system which is specific to an immune response following challenge with a peptide, wherein said peptide is encoded by a mycobacterial

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-24-

gene which is induced or up-regulated during oxygen limitation of mycobacterial growth.

5 An example of such a component is an antibody to the peptide product of an induced or up-regulated gene. Thus, in one embodiment, the nucleic acid sequence (eg. DNA plasmid or RNA vector) encodes the antibody in question.

10 An eighth aspect provides use of a peptide, an inhibitor, an antibody, an attenuated mycobacterium, an attenuated microbial carrier, a DNA sequence corresponding to the coding sequence of an induced or up-regulated gene or a fragment or variant or derivative of said DNA sequence, a DNA plasmid comprising said DNA sequence or said fragment or variant or derivative, an RNA sequence encoded by said DNA sequence or said fragment or variant or derivative, and/or an RNA vector comprising said RNA sequence according to
15 the present invention, in the manufacture of a medicament for treating or preventing a mycobacterial infection.

20 The term "preventing" includes reducing the severity/intensity of, or initiation of, a mycobacterial infection.

The term "treating" includes post-infection therapy and amelioration of a mycobacterial infection.

25 In a related aspect, there is provided a method of treating or preventing a mycobacterial infection, comprising administration of a medicament selected from the group consisting of a peptide, an inhibitor, an antibody, an attenuated mycobacterium, an attenuated microbial carrier, a DNA sequence corresponding to the coding sequence of an induced or up-regulated gene or a fragment or variant or derivative of said DNA sequence, a DNA plasmid comprising said
30 DNA sequence or said fragment or variant or derivative, an RNA sequence encoded by said DNA sequence or said fragment or variant or derivative, and/or an RNA vector comprising said RNA sequence according to the present invention, to a patient.

35 The medicament may be administered by conventional routes, eg. intravenous, intraperitoneal, intranasal routes.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-25-

The immunogenicity of the epitopes of the peptides of the invention may be enhanced by preparing them in mammalian or yeast systems fused with or assembled with particle-forming proteins such as, for example, that associated with hepatitis B surface antigen. Vaccines may be prepared from one or more immunogenic peptides of the present invention.

Typically, such vaccines are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection may also be prepared. The preparation may also be emulsified, or the peptide encapsulated in liposomes. The active immunogenic ingredients are often mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, or the like and combinations thereof. In addition, if desired, the vaccine may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, and/or adjuvants which enhance the effectiveness of the vaccine. Examples of adjuvants which may be effective include but are not limited to: aluminum hydroxide, N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (CGP 11637, referred to as nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine (CGP 19835A, referred to as MTP-PE), and RIBI, which contains three components extracted from bacteria, monophosphoryl lipid A, trehalose dimycolate and cell wall skeleton (MPL + TDM + CWS) in a 2% squalene/Tween 80 emulsion.

The vaccines are conventionally administered parenterally, by injection, for example, either subcutaneously or intramuscularly. Additional formulations which are suitable for other modes of administration include suppositories and, in some cases, oral formulations or formulations suitable for distribution as aerosols. For suppositories, traditional binders and carriers may include, for example, polyalkylene glycols or triglycerides; such suppositories may be formed from mixtures containing the active ingredient in the range of 0.5% to 10%, preferably 1%-2%. Oral formulations include such normally employed excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, and the like. These compositions take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations or powders and contain

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-26-

10%-95% of active ingredient, preferably 25%-70%.

5 The peptides may be formulated into the vaccine as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with free amino groups of the peptide) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or with organic acids such as acetic, oxalic, tartaric, maleic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups may also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, and the like.

15 The vaccines are administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in such amount as will be prophylactically and/or therapeutically effective. The quantity to be administered, which is generally in the range of 5 micrograms to 250 micrograms of antigen per dose, depends on the subject to be treated, capacity of the subject's immune system to synthesize antibodies, and the degree of protection desired. Precise amounts of active ingredient required to be administered may depend on the judgment of the practitioner and may be peculiar to each subject.

25 The vaccine may be given in a single dose schedule, or preferably in a multiple dose schedule. A multiple dose schedule is one in which a primary course of vaccination may be with 1-10 separate doses, followed by other doses given at subsequent time intervals required to maintain and or re-enforce the immune response, for example, at 1-4 months for a second dose, and if needed, a subsequent dose(s) after several months. The dosage regimen will also, at least in part, be determined by the need of the individual and be dependent upon the judgment of the practitioner.

30 In addition, the vaccine containing the immunogenic mycobacterial antigen(s) may be administered in conjunction with other immunoregulatory agents, for example, immunoglobulins, as well as antibiotics.

35 The outcome of administering antibody-containing compositions may depend on the efficiency of transmission of antibodies to the site of infection. In the case of a mycobacterial respiratory infection (eg. a *M. tuberculosis* infection),

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-27-

this may be facilitated by efficient transmission of antibodies to the lungs.

5 In one embodiment the medicament may be administered intranasally (i.n.). This mode of delivery corresponds to the route of delivery of a *M. tuberculosis* infection and, in the case of antibody delivery, ensures that antibodies are present at the site of infection to combat the bacterium before it becomes intracellular and also during the period when it spreads between cells.

10 An intranasal composition may be administered in droplet form having approximate diameters in the range of 100-5000µm, preferably 500-4000µm, more preferably 1000-3000µm. Alternatively, in terms of volume, the droplets would be in the approximate range of 0.001-100µl, preferably 0.1-50µl, more preferably 1.0-25µl.

15 Intranasal administration may be achieved by way of applying nasal droplets or via a nasal spray.

20 In the case of nasal droplets, the droplets may typically have a diameter of approximately 1000-3000 µm and/or a volume of 1-25 µl.

In the case of a nasal spray, the droplets may typically have a diameter of approximately 100-1000 µm and/or a volume of 0.001-1 µl.

25 It is possible that, following i.n. delivery of antibodies, their passage to the lungs is facilitated by a reverse flow of mucosal secretions, although mucociliary action in the respiratory tract is thought to take particles within the mucus out of the lungs. The relatively long persistence in the lungs' lavage, fast clearance from the bile and lack of transport to the saliva of some antibodies suggest the role of mucosal site specific mechanisms.

30 In a different embodiment, the medicament may be delivered in an aerosol formulation. The aerosol formulation may take the form of a powder, suspension or solution.

35 The size of aerosol particles is one factor relevant to the delivery capability of an aerosol. Thus, smaller particles may travel further down the respiratory airway towards the alveoli than would larger particles. In one embodiment, the

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-28-

aerosol particles have a diameter distribution to facilitate delivery along the entire length of the bronchi, bronchioles, and alveoli. Alternatively, the particle size distribution may be selected to target a particular section of the respiratory airway, for example the alveoli.

5

The aerosol particles may be delivered by way of a nebulizer or nasal spray.

In the case of aerosol delivery of the medicament, the particles may have diameters in the approximate range of 0.1-50 μ m, preferably 1-25 μ m, more preferably 1-5 μ m.

10

The aerosol formulation of the medicament of the present invention may optionally contain a propellant and/or surfactant.

By controlling the size of the droplets which are to be administered to a patient to within the defined range of the present invention, it is possible to avoid/minimise inadvertent antigen delivery to the alveoli and thus avoid alveoli-associated pathological problems such as inflammation and fibrotic scarring of the lungs.

20

I.n. vaccination engages both T and B cell mediated effector mechanisms in nasal and bronchus associated mucosal tissues, which differ from other mucosae-associated lymphoid tissues.

The protective mechanisms invoked by the intranasal route of administration may include: the activation of T lymphocytes with preferential lung homing; upregulation of co-stimulatory molecules, eg. B7.2; and/or activation of macrophages or secretory IgA antibodies.

Intranasal delivery of antigens may facilitate a mucosal antibody response is invoked which is favoured by a shift in the T cell response toward the Th2 phenotype which helps antibody production. A mucosal response is characterised by enhanced IgA production, and a Th2 response is characterised by enhanced IL-4 production.

30

Intranasal delivery of mycobacterial antigens allows targeting of the antigens to submucosal B cells of the respiratory system. These B cells are the major

35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-29-

local IgA-producing cells in mammals and intranasal delivery facilitates a rapid increase in IgA production by these cells against the mycobacterial antigens.

5 In one embodiment administration of the medicament comprising a mycobacterial antigen stimulates IgA antibody production, and the IgA antibody binds to the mycobacterial antigen. In another embodiment, a mucosal and/or Th2 immune response is stimulated.

10 In another embodiment monoclonal antibodies, in particular, may be used to raise anti-idiotypic antibodies. Anti-idiotypic antibodies are immunoglobulins which carry an "internal image" of the antigen of the infectious agent against which protection is desired. These anti-idiotypic antibodies may also be useful for treatment, vaccination and/or diagnosis of mycobacterial infections.

15 According to a ninth embodiment, the peptides of the present invention and antibodies to them are useful in immunoassays to detect the presence of antibodies to mycobacteria, or the presence of the virulence associated antigens in biological samples. Design of the immunoassays is subject to a great deal of variation, and many formats are known in the art. The immunoassay may utilize at least one epitope derived from a peptide of the present invention. In one embodiment, the immunoassay uses a combination of such epitopes. These epitopes may be derived from the same or from different bacterial peptides, and may be in separate recombinant or natural peptides, or together in the same recombinant peptides.

20
25 An immunoassay may use, for example, a monoclonal antibody directed towards a virulence associated peptide epitope(s), a combination of monoclonal antibodies directed towards epitopes of one mycobacterial antigen, monoclonal antibodies directed towards epitopes of different mycobacterial antigens, polyclonal antibodies directed towards the same antigen, or polyclonal antibodies directed towards different antigens. Protocols may be based, for example, upon competition, or direct reaction, or sandwich type assays. Protocols may also, for example, use solid supports, or may be by immunoprecipitation. Most assays involve the use of labelled antibody or polypeptide; the labels may be, for example, enzymatic, fluorescent, chemiluminescent, radioactive, or dye molecules. Assays which amplify the signals from the probe are also known; examples of which are assays which

30
35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-30-

utilize biotin and avidin, and enzyme-labelled and mediated immunoassays, such as ELISA assays.

Typically, an immunoassay for an antibody(s) to a peptide, will involve selecting and preparing the test sample suspected of containing the antibodies, such as a biological sample, then incubating it with an antigenic (i.e., epitope-containing) peptide(s) under conditions that allow antigen-antibody complexes to form, and then detecting the formation of such complexes. The immunoassay may be of a standard or competitive type.

The peptide is typically bound to a solid support to facilitate separation of the sample from the peptide after incubation. Examples of solid supports that can be used are nitrocellulose (e.g., in membrane or microtiter well form), polyvinyl chloride (e.g., in sheets or microtiter wells), polystyrene latex (e.g., in beads or microtiter plates, polyvinylidene fluoride (known as Immulon), diazotized paper, nylon membranes, activated beads, and Protein A beads. For example, Dynatech Immulon microtiter plates or 60 mm diameter polystyrene beads (Precision Plastic Ball) may be used. The solid support containing the antigenic peptide is typically washed after separating it from the test sample, and prior to detection of bound antibodies.

Complexes formed comprising antibody (or, in the case of competitive assays, the amount of competing antibody) are detected by any of a number of known techniques, depending on the format. For example, unlabelled antibodies in the complex may be detected using a conjugate of antixenogeneic Ig complexed with a label, (e.g., an enzyme label).

In immunoassays where the peptides are the analyte, the test sample, typically a biological sample, is incubated with antibodies directed against the peptide under conditions that allow the formation of antigen-antibody complexes. It may be desirable to treat the biological sample to release putative bacterial components prior to testing. Various formats can be employed. For example, a "sandwich assay" may be employed, where antibody bound to a solid support is incubated with the test sample; washed; incubated with a second, labelled antibody to the analyte, and the support is washed again. Analyte is detected by determining if the second antibody is bound to the support. In a competitive format, a test sample is usually incubated with antibody and a labelled,

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-31-

competing antigen is also incubated, either sequentially or simultaneously. Also included as an embodiment of the invention is an immunoassay kit comprised of one or more peptides of the invention, or one or more antibodies to said peptides, and a buffer, packaged in suitable containers.

5

As used herein, a "biological sample" refers to a sample of tissue or fluid isolated from an individual, including but not limited to, for example, plasma, serum, spinal fluid, lymph fluid, the external sections of the skin, respiratory, intestinal, and genitourinary tracts, tears, saliva, milk, blood cells, tumours, organs, and also samples of in vitro cell culture constituents (including but not limited to conditioned medium resulting from the growth of cells in cell culture medium, putatively virally infected cells, recombinant cells, and cell components).

10

15 In a related diagnostic assay, the present invention provides nucleic acid probes for detecting a mycobacterial infection.

Using the polynucleotides of the present invention as a basis, oligomers of approximately 8 nucleotides or more can be prepared, either by excision from recombinant polynucleotides or synthetically, which hybridize with the mycobacterial sequences, and are useful in identification of mycobacteria. The probes are a length which allows the detection of the induced or up-regulated sequences by hybridization. While 6-8 nucleotides may be a workable length, sequences of 10-12 nucleotides are preferred, and at least about 20 nucleotides appears optimal. These probes can be prepared using routine methods, including automated oligonucleotide synthetic methods. For use as probes, complete complementarity is desirable, though it may be unnecessary as the length of the fragment is increased.

20

25

30 For use of such probes as diagnostics, the biological sample to be analyzed, such as blood or serum, may be treated, if desired, to extract the nucleic acids contained therein. The resulting nucleic acid from the sample may be subjected to gel electrophoresis or other size separation techniques; alternatively, the nucleic acid sample may be dot blotted without size separation. The probes are usually labeled. Suitable labels, and methods for labeling probes are known in the art, and include, for example, radioactive labels incorporated by nick translation or kinasing, biotin, fluorescent probes, and chemiluminescent

35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-32-

probes. The nucleic acids extracted from the sample are then treated with the labeled probe under hybridization conditions of suitable stringencies.

5 The probes may be made completely complementary to the virulence encoding polynucleotide. Therefore, usually high stringency conditions are desirable in order to prevent false positives. The stringency of hybridization is determined by a number of factors during hybridization and during the washing procedure, including temperature, ionic strength, length of time, and concentration of formamide.

10 It may be desirable to use amplification techniques in hybridization assays. Such techniques are known in the art and include, for example, the polymerase chain reaction (PCR) technique.

15 The probes may be packaged into diagnostic kits. Diagnostic kits include the probe DNA, which may be labeled; alternatively, the probe DNA may be unlabeled and the ingredients for labeling may be included in the kit in separate containers. The kit may also contain other suitably packaged reagents and materials needed for the particular hybridization protocol, for example, standards, as well as instructions for conducting the test.

20 In a preferred embodiment, a peptide (or fragment or variant or derivative) of the present invention is used in a diagnostic assay to detect the presence of a T-lymphocyte which T lymphocyte has been previously exposed to an antigenic component of a mycobacterial infection in a patient.

25 In more detail, a T-lymphocyte which has been previously exposed to a particular antigen will be activated on subsequent challenge by the same antigen. This activation provides a means for identifying a positive diagnosis of mycobacterial infection. In contrast, the same activation is not achieved by a
30 T-lymphocyte which has not been previously exposed to the particular antigen.

The above "activation" of a T-lymphocyte is sometimes referred to as a "recall response" and may be measured, for example, by determining the release of interferon (eg. IFN- γ) from the activated T-lymphocyte. Thus, the presence of
35 a mycobacterial infection in a patient may be determined by the release of a minimum concentration of interferon from a T-lymphocyte after a defined time period following *in vitro* challenge of the T-lymphocyte with a peptide (or

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-33-

fragment or variant or derivative) of the present invention.

5 In use, a biological sample containing T-lymphocytes is taken from a patient, and then challenged with a peptide (or fragment, variant, or derivative thereof) of the present invention.

10 The above T-lymphocyte diagnostic assay may include an antigen presenting cell (APC) expressing at least one major histocompatibility complex (MHC) class II molecule expressed by the patient in question. The APC may be inherently provided in the biological sample, or may be added exogenously. In one embodiment, the T-lymphocyte is a CD4 T-lymphocyte.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-34-

Example 1 - continuous culture of mycobacteria**Materials and Methods****5 Strain**

Studies were performed with *M. tuberculosis* strain H37Rv (NCTC cat. no. 7416) - a representative strain of *M. tuberculosis*. Stock cultures were grown on Middlebrook 7H10 + OADC for 3 weeks at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ harvested and stored at -70°C as a dense suspension in deionised water.

Culture Medium

A chemically defined culture medium was developed, and was designated CAMR Mycobacterial Medium (see WO00/52139). The medium was prepared with high quality water from a Milipore water purification system and filter sterilised by passage through a $0.07 \mu\text{m}$ pore size cellulose acetate membrane filter capsule (Sartorius Ltd). Middlebrook 7H10 + OADC agar was used to prepare inoculum cultures, enumerate the number of culturable bacteria in chemostat samples, and to assess culture purity.

Culture apparatus

Culture experiments were performed in a one litre glass vessel operated at a working volume of 500 ml. The culture was agitated by a magnetic bar placed in the culture vessel coupled to a magnetic stirrer positioned beneath the vessel. Culture conditions were continuously monitored and controlled by an Anglicon Microlab Fermentation System (Brighton Systems, Newhaven), linked to sensor probes inserted into the culture through sealed ports in the top plate. The oxygen concentration was monitored with a galvanic oxygen electrode (Uniprobe, Cardiff) and was controlled through feedback control of the agitation rate. Temperature was monitored by an Anglicon temperature probe, and maintained by a heating pad positioned beneath the culture vessel. Culture pH was measured using an Ingold pH electrode (Mettler-Toledo, Leicester) and controlled by automatic addition of either sodium hydroxide (0.5 M) or sulphuric acid (0.5 M). For continuous culture, the culture system was operated by controlling nutrient addition from the medium reservoir and a constant culture

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-35-

volume was maintained by an overflow tube fitted to the side of the vessel.

Inoculation and culture

5 The vessel was filled with 350 ml of sterile culture medium and parameters were allowed to stabilise at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 6.9 ± 0.2 and a dissolved oxygen tension of approximately 70% air saturation. A dense inoculum suspension was prepared by resuspending Middlebrook agar cultures, grown at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 3 weeks, in sterile deionised water. The inoculum was aseptically transferred to the culture vessel, to provide an initial culture turbidity of approximately 0.25 at 540 nm. After inoculation the culture was allowed to establish for approximately 50 h. As the culture entered exponential growth, a further 100 ml medium was added and batch growth was monitored by optical density and viable count determination.

15 For continuous culture, the culture was inoculated and allowed to establish for approximately 50 h as detailed. The culture was then operated in fed batch mode for 48 h with medium addition (approx. 100 ml) as the culture entered exponential growth and 24 h later. Continuous culture was then initiated at a dilution rate of 0.03 h^{-1} [equivalent to a mean generation time (MGT) of 24 h]. Culture parameters were maintained at a dissolved oxygen tension (DOT) of 50 % (v/v) air saturation at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and pH 6.9 ± 0.2 for "high" dissolved oxygen culture conditions, and a DOT of 1 % (v/v) air saturation at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and pH 6.9 ± 0.2 for "low" dissolved oxygen culture conditions. Growth was monitored by optical density, dry weight and viable count determination.

Continuous culture

Steady-state growth, at a MGT of 24 h, was normally reached 10 days after initiation of continuous culture. Cultures were dense suspensions containing approximately $5 \times 10^8 \text{ cfu ml}^{-1}$ and a biomass yield of approximately 1.2 g l^{-1} cell dry weight. Cells were short rods 2 to 3 μm long with occasional clumps of up to 20 cells. Glycerol, the principal carbon source was not depleted during steady state growth, with a residual concentration of 1.25 g l^{-1} . Tween[®] 80 was present in an amount of 0.1% and enabled the growth of *M. tuberculosis* in a homogeneous suspension made up substantially of single cells at a growth rate conducive to chemostat culture. Cultures grown in the absence of Tween[®] 80

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-36-

formed large clumps and surface pellicles and continuous culture was not possible.

Example 2 - virulence data

5

Cultures grown at a DOT of 50 % were virulent in the guinea pig model of infection as determined by their ability to establish infection after aerosol delivery, proliferate in the lung, disseminate to the spleen and cause histopathology indicative of primary pulmonary tuberculosis.

10

A new virulence assay has developed to assess and compare the virulence of culture samples based on their ability to cause a disseminated infection. The assay determined the dose required in the lung at day 0 in order to produce a disseminated infection with 3.0 log₁₀ cfu in the spleen at day 16. This value was termed the infectivity index.

15

Using this assay, the infectivity of cells grown in aerobic chemostat culture was comparable to that of cells grown on standard Middlebrook agar. This supports our previous finding that cells grown in our culture system are virulent and there is no loss in virulence associated with growth in our culture system (see Table 1).

20

The infectivity index for cells grown at low oxygen tension (1% DOT) was significantly lower than that for aerobic cells indicating that growth at low oxygen tension enhances the virulence of *M. tuberculosis* i.e. a significantly lower dose is required in order to produce a comparable infection.

25

Table 1

30

<u>Sample</u>	<u>Infectivity Index*</u>
Plate	2.0
Aerobic chemostat (50 % DOT)	2.1, 2.2
Low oxygen chemostat (1 % DOT)	1.4, 1.5

35

* Values are the dose log₁₀ required in the lung at day 0 in order to produce a disseminated infection with 3.0 log₁₀ in the spleen at day 16.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-37-

Example 3 - RNA extraction from *M. tuberculosis* for microarray analysis**Materials and Methods**

- 5 Trizol (Life Technologies)- formulation of phenol and guanidine thiocyanate.
- GTC lysis solution containing: 5M guanidine thiocyanate, 0.5% N-lauryl sarcosine, 25mM tri-sodium citrate, 0.1M 2-mercaptoethanol, and 0.5% Tween 80.
- 10 Chloroform
Isopropanol
3M sodium acetate
70% Ethanol
- 15 microfuge
ribolyser
- Sterile plasticware-Falcon tubes, screw capped eppendorfs, gilson tips –all RNase free
- 20 Glassware – baked at 160 °C for at least 16 hours

Method

- 25 Steps performed at Containment level 3; within a Class III microbiological safety cabinet.
- Remove 10 or 20 ml of culture (10^8 /ml) and immediately add this to 4 volumes of GTC lysis buffer in a plastic specimen pot. Seal the pot tightly.
- 30 Incubate the cells in GTC lysis buffer for 1 hour at room temperature. Surface decontaminate the plastic pot with 5% Hycolin for 5 minutes. Transfer the sample to the pass box and place it into a plastic carry tin with a sealable lid. Close the container securely and transport it to a non-toxic cabinet CL3 cabinet.
- 35 Equally distribute the lysis mixture between Falcon tubes. Place these tubes into centrifuge buckets and seal the buckets tightly. Surface-decontaminate the

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-38-

buckets for 5 minutes with 5% Hyclon. Then transfer them to the centrifuge (Baird and Tatlock Mark IV refrigerated bench-top centrifuge). Spin the tubes at 3,000 rpm for 30 minutes.

- 5 Return the unopened buckets to the cabinet. Remove the centrifuge tubes and pour the supernatant into a waste bottle for GTC lysis buffer.

- 10 Resuspend each pellet in 1 ml of Trizol (formulation of phenol and GTC cat no. 15596-026). The manufacturers guidelines recommend lysing cells by repetitive pipetting. Although this action alone will not lyse *M. tuberculosis*, it is important to completely resuspend the pellet in Trizol.

- 15 Transfer 1 ml of cells into a FastRNA tube and ribolyse it at power setting 6.5 for 45 seconds.

Leave the tube to incubate at room temperature for 5 minutes.

- 20 Remove the aqueous layer from the tube and add this to 200 μ l of chloroform in a screw-capped eppendorf tube. Shake each tube vigorously for about 15 seconds. Incubate for 2-3 minutes at room temperature.

- 25 Spin the tube at 13,000 rpm for 15 minutes. Following centrifugation, the liquid separates into red phenol/chloroform phase, an interface, and a clear aqueous phase.

Carefully remove the aqueous phase and transfer it to a fresh eppendorf tube containing 500 μ l of chloroform/isoamyl alcohol (24:1). Spin the tubes at 13,000 rpm for 15 minutes.

- 30 Transfer the aqueous phase to an eppendorf tube containing 50 μ l of sodium acetate and 500 μ l of isopropanol.

- 35 Surface decontaminate the eppendorf tube with 5% Hyclon for 5 minutes. Remove the tube from the CL3 laboratory and continue with the procedure in laboratory 157.

Steps performed at Containment level 2:

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-39-

Precipitate the RNA at -70 °C for at least 30 minutes-can do this step overnight.

Spin the precipitated RNA down at 13,000 rpm for 10 minutes. Remove the supernatant and wash the pellet in 70% ethanol. Repeat centrifugation.

5

Remove the 70% ethanol and air-dry the pellet. Dissolve the pellet in RNase free water.

Freeze the RNA at -70 °C to store it.

10

Example 4 - cDNA labelling, hybridisation, and analysis

Preparation of the arrays

15 PCR-amplified products are generated from *M. tuberculosis* genomic DNA using ORF-specific primers. Each gene of the genome is represented. These are spotted in a grid onto a standard glass microscope slide using a BioRobotics microgrid robot (MWG Biotech) at a resolution of > 4000 spots/cm².

20 Fluorescently-labelled cDNA is transcribed from RNA which has been isolated from bacteria grown under different environmental conditions. The cDNA is labelled by incorporation of either Cy3 or Cy5 labelled dCTP (Dyes are supplied by Amersham Pharmacia Biotech). Dual fluorescence is used, allowing simultaneous detection of two cDNA samples. The output of the arrays is read using a confocal laser scanner (Affymetrix 428 scanner from MWG Biotech). More detailed information can be found web site www.sghms.ac.uk/depts/medmicro/bugs; Mujumdar, R.B. (1993) Bioconjugate Chemistry, 4(2), pp.105-111; Yu, H. (1994) Nucl. Acids Res. 22, pp.3226-3232; and Zhu, Z. (1994) Nucl. Acids Res. 22, pp. 3418-3422.

30 Labelling and hybridisation of the cDNA

1. Cy3/Cy5 label cDNA

Prepare one Cy3 and one Cy5 labelled cDNA sample per microarray slide.

35

Each sample:	RNA.....	2-10µg
	Random primers (3µg/µl).....	2µl

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-40-

H₂O.....to 11µl

Heat at 95 °C for 5min, snap cool on ice and briefly centrifuge.

- 5 Add to each: 5xFirst Strand Buffer.....5µl
 DTT (100mM).....2.5µl
 dNTPs (5mM dA/G/TTP, 2mM dCTP).....2.3µl
 Cy3 OR Cy5 dCTP.....1.7µl
 SuperScript II (200U/µl).....2.5µl

10

Incubate at 25 °C for 10min followed by 42 °C for 90min.

2. Prehybridise slide

- 15 Mix the prehybridisation solution in a coplin jar and incubate at 60° during the labelling reaction to equilibrate.

Prehybridisation: 20xSSC.....8.75ml (3.5xSSC)
 20% SDS.....250µl (0.1% SDS)
 BSA (100mg/ml).....5ml (10mg/ml)
 H₂O.....to 50ml

20

Incubate the microarray slide in the pre-heated prehybridisation solution at 60 °C for 20min. Rinse slide in H₂O for 1min followed by rinse in propan-2-ol for 1min and centrifuge slide in 50ml centrifuge tube at 1500rpm for 5min to dry. Store slide until hybridisation.

25

3. Purify Cy3/Cy5 labelled cDNA

- 30 Combine the Cy3 and Cy5 labelled cDNA samples together in a single tube.

Add: 3M sodium acetate pH4.8.....5µl (0.1 volume)
 Propan-2-ol.....40µl (0.8 volume)

35

Wrap the tube in foil and incubate at room temperature for 30min. Centrifuge at 13000rpm for 20min and remove supernatant. Rinse pellet with 100µl 70% ethanol and centrifuge at 13000rpm for 5min. Remove the

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-41-

supernatant and air dry the pellet for 10min. Resuspend the pellet in 10.5µl H₂O.

5 4. Hybridise slide with Cy3/Cy5 labelled cDNA

Place the prehybridise microarray slide in the hybridisation cassette and add two 15µl aliquots of H₂O to the wells in the cassette. Mix resuspended Cy3/Cy5 labelled cDNA sample with hybridisation solution.

10

Hybridisation: Cy3/Cy5 labelled cDNA sample.....10.5µl
 20xSSC 3.2µl (4xSSC)
 2% SDS.....2.3µl (0.3% SDS)

15

Heat hybridisation solution at 95 °C for 2min. Do NOT snap cool on ice but allow to cool slightly and briefly centrifuge. Pipette the hybridisation solution onto the slide at the edge of the arrayed area avoiding bubble formation. Using forceps carefully drag the edge of a cover slip along the surface of the slide towards the arrayed area and into the hybridisation solution at the edge of the array. Carefully lower the cover slip down over the array avoiding any additional movement once in place. Seal the hybridisation cassette and submerge in a water bath at 60 °C for 16-20h.

20

5. Wash slide

25

Remove microarray slide from hybridisation cassette and initially wash slide carefully in staining trough of Wash A to remove cover slip. Once cover slip is displaced place slide(s) in slide rack and continue agitating in Wash A for a further 2min.

30

Wash A: 20xSSC.....20ml (1xSSC)
 20% SDS.....1ml (0.05% SDS)
 H₂O.....to 400ml

35

Transfer slide(s) to a clean slide rack and agitate in first trough of Wash B for 2min. Wash in second trough of Wash B with agitation for 2min.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-42-

Wash B (x2): 20xSSC.....1.2ml (0.06xSSC)
 H₂O.....to 400ml

5 Place slide into a 50ml centrifuge tube and centrifuge at 1500rpm for 5mins to dry slide.

6. Scan slide

10 Scan slide using a ScanArray 3000 dual-laser confocal scanner and analyse data.

Reagents

Random primers (3µl/µl) [Life Technol., Cat# 48190-011]
 15 dNTPs (5mM dATP, dGTP, dTTP, & 2mM dCTP) [Life Technol., Cat# 10297-018]
 Cy3 dCTP Fluorolink [Amersham Pharmacia Biotech, Cat# PA53021]
 Cy5 dCTP Fluorolink [Amersham Pharmacia Biotech, Cat# PA55021]
 SuperScript II Reverse Transcriptase (200U/µl) [Life Technol., Cat# 18064-014]
 5xFirst Strand Buffer [Life Technol., supplied with Cat# 18064-014]
 20 Dithiothreitol (DTT) (100mM) [Life Technol., supplied with Cat# 18064-014]
 Bovine serum albumin (BSA) Fraction V 96-99% (100mg/ml) [Sigma, Cat# A9418]

General: 20xSSC
 25 20% SDS
 3M sodium acetate pH4.8
 Propan-2-ol
 70% ethanol
 2% SDS
 30

Equipment

Microarray hybridisation cassette [Telechem International (ArrayIt.com), Cat# AHC-1]
 35 Coplin staining jar [Fisher Scientific, Cat# MNK-820-H]
 3x slide staining troughs [Fisher Scientific, Cat# MNK-836-K]
 2x slide staining racks [Fisher Scientific, Cat# MNK-841-K]

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-43-

Glass cover slips 22x22mm [BDH, Cat# 406/0187/33].

Scanning and Analysis

- 5 The slides were scanned using an Affymetrix 428 scanner. The raw data were initially analysed in software known as ImaGene, which was supplied with the scanner. The scanned images were then transferred to another software package known as GeneSpring. This is a very powerful tool, which draws information from many databases allowing the complete analysis of the expression of each gene.

10

Results

- 15 Total RNA was extracted from steady state chemostat culture according to the protocol described above. RNA microarray hybridisation was performed in duplicate to compare RNA extracted from *M. tuberculosis* grown in aerobic (50% DOT) and low oxygen environments (1% DOT).

- 20 The two expression profiles were analysed and compared. Genes that appeared to be up regulated at least 1.5-fold under low oxygen conditions were selected for identification.

Nucleic acid sequences are given from the transcription start site to the stop codon.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-44-

Example 5 - Delete one or more of the genes from *M. tuberculosis* in order to attenuate its virulence while retaining immunogenicity

- 5 One or more genes that are identified may be disrupted using allelic exchange. In brief, the gene of interest is cloned with 1-2kb of flanking DNA either side and is inactivated by deletion of part of the coding region and insertion of an antibiotic resistance marker, such as hygromycin.
- 10 The manipulated fragment is then transferred to a suitable suicide vector e.g. pPR23 and is transformed into the wild-type parent strain of *M. tuberculosis*. Mutants are recovered by selecting for antibiotic resistant strains. Genotypic analysis (Southern Blotting with a fragment specific to the gene of interest) is performed on the selected strains to confirm that the gene has been disrupted.
- 15 The mutant strain is then studied to determine the effect of the gene disruption on the phenotype. In order to use it as a vaccine candidate it would be necessary to demonstrate attenuated virulence. This can be done using either a guinea pig or mouse model of infection. Animals are infected with the mutant strain and the progression of disease is monitored by determining the bacterial load in different organs, in particular the lung and spleen, at specific time points post infection, typically up to 16 weeks.
- 20 Comparison is made to animals infected with the wild-type strain which should have a significantly higher bacterial load in the different organs. Long-term survival studies and histopathology can also be used to assess virulence and pathogenicity.
- Once attenuated virulence has been established, protection and immunogenicity studies can be performed to assess the potential of the strain as a vaccine.
- 30 Suitable references for allelic exchange and preparation of TB mutants are McKinney et al., 2000 and Pelicic et al., 1997, [1, 2].

- Example 6 - Select one or more of our genes, which encode proteins that are immunogenic, and put them into BCG or an attenuated strain of *M. tuberculosis* to enhance its overall immunogenicity**
- 35

The gene of interest is amplified from the *M. tuberculosis* genome by PCR. The

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-45-

amplified product is purified and cloned into a plasmid (pMV306) that integrates site specifically into the mycobacterial genome at the attachment site (attB) for mycobacteriophage L5 [3].

- 5 BCG is transformed with the plasmid by electroporation, which involves damaging the cell envelope with high voltage electrical pulses, resulting in uptake of the DNA. The plasmid integrates into the BCG chromosome at the attB site generating stable recombinants. Recombinants are selected and are checked by PCR or Southern blotting to ensure that the gene has been integrated. The recombinant
- 10 strain is then used for protection studies.

Example 7 - Use recombinant carriers such as attenuated salmonella and the Vaccinia virus to express and present TB genes.

- 15 One of the best examples of this type of approach is the use of Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) [4]. The gene of interest is cloned into a vaccinia virus shuttle vector, e.g. pSC11. Baby Hamster Kidney (BHK) cells are then infected with wild-type MVA and are transfected with the recombinant shuttle vector. Recombinant virus is then selected using a suitable selection marker and viral
- 20 plaques, selected and purified.

- Recombinant virus is normally delivered as part of a prime-boost regime where animals are vaccinated initially with a DNA vaccine encoding the TB genes of interest under the control of a constitutive promoter. The immune response is
- 25 boosted by administering recombinant MVA carrying the genes of interest to the animals at least 2 weeks later.

Example 8 - Sub-unit vaccines containing a single peptide/protein or a combination of proteins

- 30 To prepare sub-unit vaccines with one or more peptides or proteins it is first of all necessary to obtain a supply of protein or peptide to prepare the vaccine. Up to now, this has mainly been achieved in mycobacterial studies by purifying proteins of interest from TB culture. However, it is becoming more common to clone the gene of interest and produce a recombinant protein.
- 35

The coding sequence for the gene of interest is amplified by PCR with restriction

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-46-

sites inserted at the N terminus and C terminus to permit cloning in-frame into a protein expression vector such as pET-15b. The gene is inserted behind an inducible promoter such as lacZ. The vector is then transformed into *E. coli* which is grown in culture. The recombinant protein is over-expressed and is purified.

5

One of the common purification methods is to produce a recombinant protein with an N-terminal His-tag. The protein can then be purified on the basis of the affinity of the His-tag for metal ions on a Ni-NTA column after which the His-tag is cleaved. The purified protein is then administered to animals in a suitable adjuvant [5].

10

Example 9 - Plasmid DNA vaccines carrying one or more of the identified genes

DNA encoding a specific gene is amplified by PCR, purified and inserted into specialised vectors developed for vaccine development, such as pVAX1. These vectors contain promoter sequences, which direct strong expression of the introduced DNA (encoding candidate antigens) in eukaryotic cells (e.g. CMV or SV40 promoters), and polyadenylation signals (e.g. SV40 or bovine growth hormone) to stabilise the mRNA transcript.

20

The vector is transformed into *E. coli* and transformants are selected using a marker, such as kanamycin resistance, encoded by the plasmid. The plasmid is then recovered from transformed colonies and is sequenced to check that the gene of interest is present and encoded properly without PCR generated mutations.

25

Large quantities of the plasmid is then produced in *E. coli* and the plasmid is recovered and purified using commercially available kits (e.g. Qiagen Endofree-plasmid preparation). The vaccine is then administered to animals for example by intramuscular injection in the presence or absence of an adjuvant.

30

Example 10 - Preparation of DNA expression vectors

DNA vaccines consist of a nucleic acid sequence of the present invention cloned into a bacterial plasmid. The plasmid vector pVAX1 is commonly used in the preparation of DNA vaccines. The vector is designed to facilitate high copy number replication in *E. coli* and high level transient expression of the peptide of interest in most mammalian cells (for details see manufacturers protocol for pVAX1)

35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-47-

catalog no. V260-20 www.invitrogen.com) .

The vector contains the following elements

- 5 * Human cytomegalovirus immediate-early (CMV) promoter for high-level expression in a variety of mammalian cells
- * T7 promoter/priming site to allow *in vitro* transcription in the sense orientation and sequencing through the insert
- * Bovine growth hormone (BGH) polyadenylation signal for efficient transcription
- 10 termination and polyadenylation of mRNA
- * Kanamycin resistance gene for selection in *E. coli*
- * A multiple cloning site
- * pUC origin for high-copy number replication and growth in *E. coli*
- * BGH reverse priming site to permit sequencing through the insert

15

Vectors may be prepared by means of standard recombinant techniques which are known in the art, for example Sambrook *et al.*, (1989). Key stages in preparing the vaccine are as follows:

- 20 * The gene of interest is ligated into pVAX1 via one of the multiple cloning sites
- * The ligation mixture is then transformed into a competent *E. coli* strain (e.g. TOP10) and LB plates containing 50µg/ml kanamycin are used to select transformants.
- * Clones are selected and may be sequenced to confirm the presence and
- 25 orientation of the gene of interest.
- * Once the presence of the gene has been verified, the vector can be used to transfect a mammalian cell line to check for protein expression. Methods for transfection are known in the art and include, for example, electroporation, calcium phosphate, and lipofection.
- 30 * Once peptide expression has been confirmed, large quantities of the vector can be produced and purified from the appropriate cell host, e.g. *E. coli*.

pVAX1 does not integrate into the host chromosome. All non-essential sequences have been removed to minimise the possibility of integration. When constructing

35

a specific vector, a leader sequence may be included to direct secretion of the encoded protein when expressed inside the eukaryotic cell.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-48-

Other examples of vectors that have been used are V1Jns.tPA and pCMV4 (Lefevre *et al.*, 2000 and Vordermeier *et al.*, 2000).

5 Expression vectors may be used that integrate into the genome of the host, however, it is more common and more preferable to use a vector that does not integrate. The example provided, pVAX1, does not integrate. Integration would lead to the generation of a genetically modified host which raises other issues.

Example 11 - RNA vaccine

10

As discussed on page 15 of US patent US5,783,386, one approach is to introduce RNA directly into the host.

15 Thus, the vector construct (Example 10) may be used to generate RNA *in vitro* and the purified RNA then injected into the host. The RNA would then serve as a template for translation in the host cell. Integration would not occur.

20 Another option is to use an infectious agent such as the retroviral genome carrying RNA corresponding to the gene of interest. Here you will get integration into the host genome

25 Another option is the use of RNA replicon vaccines which can be derived from virus vectors such as Sindbis virus or Semliki Forest virus. These vaccines are self-replicating and self-limiting and may be administered as either RNA or DNA which is then transcribed into RNA replicons *in vivo*. The vector eventually causes lysis of the transfected cells thereby reducing concerns about integration into the host genome. Protocols for RNA vaccine construction are detailed in Cheng *et al.*, (2001).

30 Example 12 - Diagnostic assays based on assessing T cell responses

For a diagnostic assay based on assessing T cell responses it would be sufficient to obtain a sample of blood from the patient. Mononuclear cells (monocytes, T and B lymphocytes) can be separated from the blood using density gradients such as Ficoll gradients.

35

Both monocytes and B-lymphocytes are both able to present antigen, although less

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-49-

efficiently than professional antigen presenting cells (APCs) such as dendritic cells. The latter are more localised in lymphoid tissue.

5 The simplest approach would be to add antigen to the separated mononuclear cells and incubate for a week and then assess the amount of proliferation. If the individual had been exposed to the antigen previously through infection, then T-cell clones specific to the antigen should be more prevalent in the sample and should respond.

10 It is also possible to separate the different cellular populations should it be desired to control the ratio of T cells to APC's.

Another variation of this type of assay is to measure cytokine production by the responding lymphocytes as a measure of response. The ELISPOT assay described below in Example 13 is a suitable example of this variation.

15

Example 13 - detection of latent mycobacteria

20 A major problem for the control of tuberculosis is the presence of a large reservoir of asymptomatic individuals infected with tubercle bacilli. Dormant bacilli are more resistant to front-line drugs.

The presence of latent mycobacteria-associated antigen may be detected indirectly either by detecting antigen specific antibody or T-cells in blood samples.

25

The following method is based on the method described in Lalvani *et al.* (2001) in which a secreted antigen, ESAT-6, was identified as being expressed by members of the *M. tuberculosis* complex but is absent from *M. bovis* BCG vaccine strains and most environmental mycobacteria. 60 - 80% of patients also have a strong cellular immune response to ESAT-6. An *ex-vivo* ELISPOT assay was used to detect ESAT-6 specific T cells.

30

As applied to the present invention:

35 A 96 well plate is coated with cytokine (e.g. interferon- γ , IL-2) -specific antibody. Peripheral blood monocytes are then isolated from patient whole blood and are applied to the wells.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-50-

Antigen (ie. one of the peptides, fragments, derivatives or variants of the present invention) is added to stimulate specific T cells that may be present and the plates are incubated for 24h. The antigen stimulates cytokine production which then binds to the specific antibody.

5

The plates are washed leaving a footprint where antigen-specific T cells were present.

10

A second antibody coupled with a suitable detection system, e.g. enzyme, is then added and the number of spots are enumerated after the appropriate substrate has been added.

The number of spots, each corresponding to a single antigen-specific T cell, is related to the total number of cells originally added.

15

The above Example also describes use of an antigen that may be used to distinguish TB infected individuals from BCG vaccinated individuals. This could be used in a more discriminative diagnostic assay.

20 Example 14 - Alternative protocol for transcriptomics analysis

a) Experimental design

25 RNA was extracted from aerobic (50% DOT) and low-oxygen (1% DOT) cultures and fluorescently labelled cDNA was transcribed from each sample of RNA. Fluorescently labelled cDNA was also transcribed from genomic DNA which had been extracted from *M. tuberculosis*.

30 In each microarray experiment a whole genome array was hybridised with a sample of labelled cDNA generated from RNA from one culture sample (Test sample). Each array was also hybridised with control cDNA prepared from genomic DNA (Control sample). The test and control cDNAs were each labelled with a different cy dye.

35 Nine separate arrays were performed for aerobic samples and seven low-oxygen arrays were performed. Each array was scanned at two different wavelengths corresponding to the excitation maxima of each dye using an Affymetric 428 array

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-51-

scanner. The intensity of the emitted light was recorded and the data was analysed using GeneSpring software.

5 The test sample data on each chip was normalised against the control data followed by per chip normalisation about the median intensity value, using the 50th percentile, and finally per gene normalisation across all the arrays. In this instance those genes which were expressed at least 1.5-fold higher under low-oxygen conditions relative to aerobic culture were selected for identification.

10 b) RNA extraction from *M. tuberculosis* for microarray analysis

Materials and Methods

Trizol (Life Technologies) - formulation of phenol and guanidine thiocyanate.

15 GTC lysis solution containing: 5M guanidine thiocyanate, 0.5% N-lauryl sarcosine, 25mM tri-sodium citrate, 0.1M 2-mercaptoethanol, and 0.5% Tween 80.

Chloroform, Isopropanol

3M sodium acetate

20 70% Ethanol

microfuge, ribolyser

Sterile plasticware-Falcon tubes, screw capped eppendorfs, gilson tips - all RNase free

Glassware - baked at 160 °C for at least 16 hours

25

Method

Steps performed at Containment level 3; within a Class III microbiological safety cabinet.

30 * Remove 10 or 20 ml of culture (10^9 /ml) and immediately add this to 4 volumes of GTC lysis buffer in a plastic specimen pot. Seal the pot tightly.

* Incubate the cells in GTC lysis buffer for 1 hour at room temperature. Surface decontaminate the plastic pot with 5% Hycolin for 5 minutes. Transfer the sample to the pass box and place it into a plastic carry tin with a sealable lid. Close the container securely and transport it to a non-toxic cabinet CL3 cabinet.

35

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-52-

- * Equally distribute the lysis mixture between Falcon tubes. Place these tubes into centrifuge buckets and seal the buckets tightly. Surface-decontaminate the buckets for 5 minutes with 5% Hycolin. Then transfer them to the centrifuge (Baird and Tatlock Mark IV refrigerated bench-top centrifuge). Spin the tubes at 3,000 rpm for 30 minutes.
- 5
- * Return the unopened buckets to the cabinet. Remove the centrifuge tubes and pour the supernatant into a waste bottle for GTC lysis buffer.
- 10
- * Resuspend each pellet in 1 ml of Trizol (formulation of phenol and GTC cat no. 15596-026). The manufacturers guidelines recommend lysing cells by repetitive pipetting. Although this action alone will not lyse *M. tuberculosis*, it is important to completely resuspend the pellet in Trizol.
- 15
- * Transfer 1 ml of cells into each FastRNA tube and ribolyse them at power setting 6.5 for 45 seconds.
- * Leave the tubes to incubate at room temperature for 5 minutes.
- 20
- * Remove the aqueous layer from each tube and add this to 200 µl of chloroform in a screw-capped eppendorf tube. Shake each tube vigorously for about 15 seconds. Incubate for 2-3 minutes at room temperature.
- * Spin the tubes at 13,000 rpm for 15 minutes. Following centrifugation, the liquid separates into red phenol/chloroform phase, an interface, and a clear aqueous phase.
- 25
- * Carefully remove the aqueous phase and transfer it to fresh eppendorf tubes containing 500 µl of chloroform/isoamyl alcohol (24:1). Spin the tubes at 13,000 rpm for 15 minutes.
- 30
- * Transfer the aqueous phase to eppendorf tubes containing 50 µl of sodium acetate and 500 µl of isopropanol.
- 35
- * Surface decontaminate the eppendorf tubes with 5% Hycolin for 5 minutes. Remove the tubes from the CL3 laboratory and continue with the procedure in laboratory 157.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-53-

Steps performed at Containment level 2:

- * Precipitate the RNA at -70 °C for at least 30 minutes-can do this step overnight.
- * Spin the precipitated RNA down at 13,000 rpm for 10 minutes. Remove the supernatant and wash the pellet in 70% ethanol. Repeat centrifugation.

5

- * Remove the 70% ethanol and air-dry the pellet. Dissolve the pellet in RNase free water.
- * Freeze the RNA at -70 °C to store it.

- 10 * The RNA was treated with DNase1 to remove genomic DNA and was then purified using RNeasy mini columns (Qiagen). Both methods were performed according to the manufacturers guidelines.

c) Isolation of genomic DNA from *M. tuberculosis* grown in chemostat culture

15

DNA is then used to generate Cy3 or Cy5 labelled DNA for use as a control in microarray experiments

Materials and Methods

20

Beads 0.5 mm in diameter

Bead beater

Bench top centrifuge

Platform rocker

Heat block

25

Falcon 50 ml centrifuge tubes

Sorvall RC-5C centrifuge

250 ml polypropylene centrifuge pots.

Screw capped eppendorf tubes

Pipettes 1ml, 200µl, 10ml, 5ml

30

Breaking buffer -

50 mM Tris HCL pH 8.0

10 mM EDTA

100 mM NaCl

35

Procedure

Mechanical disruption of Mtb cells

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-54-

- * 150 ml of chemostat cells (O.D of 2.5 at 540 nm) are spun down at 15,000 rpm for 15 minutes in 250 ml polypropylene pots using centrifuge Sorvall RC-5C.
- * The supernatant is discarded.
- * Cells are re-suspended in 5 ml of breaking buffer in a 50 ml Falcon tube and centrifuged at 15,000 rpm for a further 15 minutes.
- * The supernatant is removed and additional breaking buffer is added at a volume of 5 ml. Beads are used to disrupt the cells. These are used at a quantity of 1ml of beads for 1 ml of cells. Place the sample into the appropriate sized chamber. Place in the bead beater and secure the outer unit (containing ice) and process at the desired speed for 30 seconds.
- * Allow the beads to settle for 10 minutes and transfer cell lysate to a 50 ml Falcon centrifuge tube
- * Wash beads with 2-5 ml of breaking buffer by pipetting washing buffer up and down over the beads.
- * Add this washing solution to the lysate in the falcon tube

Removal of proteins and cellular components.

- * Add 0.1 volumes of 10% SDS and 0.01 volumes of proteinase K.
- * Mix by inversion and heat at 55 °C in a heat block for 2-3 hours
- * The resulting mix should be homogenous and viscous. If it isn't then add more SDS to bring the concentration up to 0.2%
- * Add an equal volume of phenol/chloroform/Isoamyl alcohol in the ratio: 25/24/1.
- * Gently mix on a platform rocker until homogenous
- * Spin down at 3,000 rpm for 20 minutes
- * Remove the aqueous phase and place in a fresh tube
- * Extract the aqueous phase with an equal volume of chloroform to remove traces of cell debris and phenol. Chloroform extractions may need to be repeated to remove all the debris.
- * Precipitate the DNA with 0.3 M sodium acetate and an equal volume of isopropanol.
- * Spool as much DNA as you can with a glass rod
- * Wash the spooled DNA in 70% ethanol followed by 100 % ethanol
- * Leave to air dry
- * Dissolve the DNA in sterile deionised water (500 µl)
- * Allow DNA to dissolve at 4 °C for approximately 16 hours.
- * Add RNase 1 (500U) to the dissolved DNA

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-55-

- * Incubate for 1 hour at 37 °C.
- * Re-extract with an equal volume of phenol/chloroform followed by a chloroform extraction and precipitate as before
- * Spin down the DNA at 13,000 rpm
- 5 * Remove the supernatant and wash the pellet in 70% ethanol
- * Air dry
- * Dissolve in 200-500 µl of sterile water.

d) Preparation of Cy3 or Cy5 labelled DNA from DNA

10

Prepare one Cy3 or one Cy5 labelled DNA sample per microarray slide.

For each sample:

DNA	2-5 µg
Random primers	(3 µg/µl) 1 µl
15 H ₂ O	to 41.5 µl

Heat at 95 °C for 5min, snap cool on ice and briefly centrifuge.

Add to each:

20 10xReact 2 buffer	5 µl
dNTPs (5mM dA/G/TTP, 2mM dCTP)	1 µl
Cy3 OR Cy5 dCTP	1.5 µl
Klenow (5U/µl)	1 µl

Incubate at 37 °C in dark for 90min.

25

Prehybridise slide

Mix the prehybridisation solution in a Coplin jar and incubate at 65 °C during the labelling reaction to equilibrate.

30 Prehybridisation: 20xSSC	8.75 ml (3.5xSSC)
20% SDS	250 µl (0.1% SDS)
BSA (100mg/ml)	5ml (10mg/ml)
H ₂ O	to 50ml

- 35 Incubate the microarray slide in the pre-heated prehybridisation solution at 65 °C for 20min. Rinse slide thoroughly in 400ml H₂O for 1min followed by rinse in 400ml propan-2-ol for 1min and centrifuge slide in 50ml centrifuge tube at

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-56-

1,500rpm for 5min to dry. Store slide in dark, dust-free box until hybridisation (<1h).

Purify Cy3/Cy5 labelled DNA - Qiagen MinElute Purification

- 5 * Combine Cy3 and Cy5 labelled DNA samples in single tube and add 500 µl Buffer PB.
- * Apply to MinElute column in collection tube and centrifuge at 13,000rpm for 1min.
- * Discard flow-through and place MinElute column back into same collection tube.
- 10 * Add 500 µl Buffer PE to MinElute column and centrifuge at 13,000rpm for 1min.
- * Discard flow-through and place MinElute column back into same collection tube.
- * Add 250 µl Buffer PE to MinElute column and centrifuge at 13,000rpm for 1min.
- * Discard flow-through and place MinElute column back into same collection tube.
- * Centrifuge at 13,000rpm for an additional 1min to remove residual ethanol.
- 15 * Place the MinElute column into a fresh 1.5ml tube.
- * Add 10.5 µl H₂O to the centre of the membrane and allow to stand for 1min.
- * Centrifuge at 13,000rpm for 1min.

e) Preparation of Cy3 or Cy5 label cDNA from RNA

- 20 Prepare one Cy3 and one Cy5 labelled cDNA sample per microarray slide.

For each sample:

RNA	2-10 µg
Random primers (3 µg/µl)	1 µl
25 H ₂ O	to 11 µl

Heat at 95 °C for 5min, snap cool on ice and briefly centrifuge.

Add to each:

5xFirst Strand Buffer	5 µl
30 DTT (100mM)	2.5 µl
dNTPs (5mM dA/G/TTP, 2mM dCTP)	2.3 µl
Cy3 OR Cy5 dCTP	1.7 µl
SuperScript II (200U/µl)	2.5 µl

- 35 Incubate at 25 °C in dark for 10min followed by 42 °C in dark for 90min.

Prehybridise slide

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-57-

Mix the prehybridisation solution in a Coplin jar and incubate at 65 °C during the labelling reaction to equilibrate.

	Prehybridisation: 20 xSSC	8.75 ml (3.5xSSC)
	20% SDS	250 µl (0.1% SDS)
5	BSA (100mg/ml)	5ml (10mg/ml)
	H ₂ O	to 50ml

- 10 Incubate the microarray slide in the pre-heated prehybridisation solution at 65 °C for 20min. Rinse slide thoroughly in 400ml H₂O for 1min followed by rinse in 400ml propan-2-ol for 1min and centrifuge slide in 50ml centrifuge tube at 1500rpm for 5min to dry. Store slide in dark, dust-free box until hybridisation (<1h).

- Purify Cy3/Cy5 labelled cDNA - Qiagen MinElute Purification
- 15 * Combine Cy3 and Cy5 labelled DNA samples in single tube and add 250 µl Buffer PB.
- * Apply to MinElute column in collection tube and centrifuge at 13,000rpm for 1min.
- * Discard flow-through and place MinElute column back into same collection tube.
- 20 * Add 500 µl Buffer PE to MinElute column and centrifuge at 13,000rpm for 1min.
- * Discard flow-through and place MinElute column back into same collection tube.
- * Add 250 µl Buffer PE to MinElute column and centrifuge at 13,000rpm for 1min.
- * Discard flow-through and place MinElute column back into same collection tube.
- * Centrifuge at 13,000rpm for an additional 1min to remove residual ethanol.
- 25 * Place the MinElute column into a fresh 1.5ml tube.
- * Add 10.5 µl H₂O to the centre of the membrane and allow to stand for 1min.
- * Centrifuge at 13,000rpm for 1min.

- f) Hybridise slide with Cy3/Cy5 labelled cDNA/DNA
- 30

Place the prehybridised microarray slide in the hybridisation cassette and add two 15 µl aliquots of H₂O to the wells in the cassette. Mix resuspended Cy3/Cy5 labelled cDNA sample with hybridisation solution.

- 35 Hybridisation:
- | | |
|------------------------------|----------------|
| Cy3/Cy5 labelled cDNA sample | 10.5 µl |
| 20xSSC | 3.2 µl (4xSSC) |

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-58-

2% SDS

2.3 μ l (0.3% SDS)

Heat hybridisation solution at 95°C for 2min. Do NOT snap cool on ice but allow to cool slightly and briefly centrifuge. Pipette the hybridisation solution onto the slide at the edge of the arrayed area avoiding bubble formation. Using forceps carefully drag the edge of a cover slip along the surface of the slide towards the arrayed area and into the hybridisation solution at the edge of the array. Carefully lower the cover slip down over the array avoiding any additional movement once in place. Seal the hybridisation cassette and submerge in a water bath at 60°C for 16-20h.

Wash slide

Remove microarray slide from hybridisation cassette and initially wash slide carefully in staining trough of Wash A, preheated to 65 °C, to remove cover slip. Once cover slip is displaced place slide(s) in slide rack and continue agitating in Wash A for a further 2min.

Wash A:

20 x SSC.....20ml (1xSSC)
20% SDS.....1ml (0.05% SDS)
H₂O.....to 400ml

Transfer slide(s) to a clean slide rack and agitate in first trough of Wash B for 2min. Wash in second trough of Wash B with agitation for 2min.

Wash B (x2):

20xSSC.....1.2ml (0.06xSSC)
H₂O.....to 400ml

Place slide into a 50ml centrifuge tube and centrifuge at 1500rpm for 5mins to dry the slide and then scan fluorescence using a microarray slide scanner. The slides were scanned using an Affymetrix 428 scanner. The raw data was analysed using a combination of ImaGene and GeneSpring software.

g) Preparation of the arrays

Whole *M. tuberculosis* genome arrays were prepared from *M. tuberculosis*

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-59-

genomic DNA using ORF-specific primers. PCR products corresponding to each ORF were spotted in a grid onto a standard glass microscope slide using a BioRobotics microgrid robot (MWG Biotech) at a resolution of >4000 spots/cm².

5 RESULTS

Transcriptomics analysis of *M. tuberculosis* DNA coding sequences that are up-regulated under low DOT continuous culture conditions has identified the following SEQ IDs (see Table 2). Referring to the SEQ. ID. NO. column, the first identified number is an amino acid sequence and the second identified number is the corresponding DNA sequence.

TABLE 2

Gene	Assigned function	SEQ ID NO.
Rv 1344	Acyl carrier protein	1, 2
Rv0283		3, 4
Rv3402c	Aminotransferase in polysaccharide biosynthesis	5, 6
Rv3049c	Monooxygenase	7, 8
Rv2382c (mbtC)	Involved in mycobactin biosynthesis	9, 10
Rv2381c (mbtD)	Involved in mycobactin biosynthesis	11, 12
Rv2379c (mbtF)	Involved in mycobactin biosynthesis	13, 14
Rv1994c	Transcription regulator, similar to eg MERR probable mercury resistance operon	15, 16
Rv0251c (hsp)	Heat shock protein belonging to HSP20 family	17, 18
Rv3174	Oxidoreductase	19, 20
fadE14 (Rv1346)	Acyl CoA dehydrogenase	21, 22
LipK (Rv2385)	Esterase/acetyl hydrolase	23, 24
appC (Rv1623c)	Cytochrome D	25, 26
Rv0725c		27, 28
Rv3639c		29, 30
Rv0560c	Methyltransferase	31, 32

5

10

15

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

61

Gene	Assigned function	SEQ. ID NO.
Rv2053c		33, 34
IpsS (Rv0847)	Lipoprotein containing a signal peptide	35, 36
Rv3767c	Protein with a probable N-terminal signal peptide	37, 38
Rv3812		39, 40
Rv2210c (IIV)	Branched chain amino acid transaminase	41, 42
Rv2516c	Protein containing a helix-turn-helix motif	43, 44
Rv0870c	Hydrophobic protein	45, 46
Rv1168c	PPE protein	47, 48
Rv2448c (valS)	Valyl-tRNA synthetase	49, 50
Rv2378c (mbtG)	Involved in mycobactin biosynthesis. Lysine hydroxylase	51, 52
Rv2377c (mbtH)	Involved in mycobactin biosynthesis	53, 54
Rv0135c	Transcriptional regulator	55, 56
Rv2025c		57, 58
Rv0985c (mscL)		59, 60
Rv0938		61, 62
Rv2554c		63, 64
Rv1342c	Membrane protein	65, 66

5

10

15

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

62

Gene	Assigned function	SEQ ID NO.
Rv0397		67, 68
Rv1389 (gmk)	Guanylate kinase	69, 70
Rv0123		71, 72
Rv3001c (ilvC)	Ketol acid reducto isomerase	73, 74
Rv3839		75, 76
Rv2164c	Proline rich protein	77, 78
Rv2017	Transcriptional regulator	79, 80
Rv1982c		81, 82
Rv3758c (proV)	ABC transporter. ATP binding protein	83, 84
Rv3697c		85, 86
Rv1228 (lpqX)	Protein containing a signal peptide	87, 88
Rv3000		89, 90
Rv3037c		91, 92
Rv1634	Membrane protein of major facilitator super family, similar to many antibiotic resistance (efflux) proteins	93, 94
Rv1300 (hemK)	Protoporphyrinogen oxidase	95, 96
Rv2327	unknown	97, 98
Rv1221 (sigE)	Sigma factor	99, 100

5

10

15

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

63

Gene	Assigned function	SEQ ID NO.
Rv1617 (pykA)	Pyruvate kinase	101, 102
Rv0792c	Transcriptional regulator, similar to many of GntR family e.g. <i>Bacillus subtilis</i>	103, 104
Rv1509		105, 106
Rv3081	Contains PS0 0850	107, 108
Rv0347	Similar to Rv0831c	109, 110
Rv0573c		111, 112
Rv2019		113, 114

5

10

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-64-

Example 15 - Protocol for Protein Extraction and Characterisation

M. tuberculosis H37Rv was grown in continuous culture under aerobic (50% DOT) and low oxygen (1% DOT) conditions and samples were collected during the steady-state (see Example 1).

Harvesting of culture cell pellets

* 300 - 350 ml of culture is collected overnight on ice.

* The culture is centrifuged for 10 minutes at 15,000 rpm in dry-spin tubes using a Sorvall RC5B centrifuge at 4 °C.

* The supernatant is decanted off and the cell pellets are collected in to tubes and stored frozen at -40 °C.

Preparation of protein extracts from cell pellets

* One sample of steady state cell pellets from each of 3 aerobic and 2 low oxygen chemostat cultures were removed from the freezer and allowed to thaw at room temperature for 1 hour.

* Each pellet is resuspended in 40 mls Tris-HCL buffer [40mM Tris, 1mM EDTA (pH 6.9) and 200 µl protease inhibitor cocktail (Sigma, P8645) per 40mls] and re-pelleted by centrifugation at 12,000 rpm at 4 °C.

* Each cell pellet is then resuspended with approximately 1ml of buffer.

* 0.5 ml aliquots of the bacterial suspensions are dispensed into separate ribolyser tubes (Anachem).

* Each tube is ribolysed for 3 x 90 seconds cycles (maximum power - setting 6.5) with 5 mins on ice between each cycle.

* After ribolysing the protein preparations for each sample were pooled and the following chemicals added:

3.2 g	Urea
64.8 mg	DTT
300 µl	Ampholytes (servalyte 2-4 serva electrophoresis)
0.24 g	CHAPS

* Each chemical is allowed to dissolve before adding the next.

* The samples are incubated for 30 minutes at room temperature.

* The samples were dispensed in to eppendorf tubes and centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-65-

* The clear soluble protein preparations are then removed and double filtered through a 0.2 μ m cellulose acetate filter membrane.

* Protein determinations of the samples using a Biorad assay was performed with a Bovine serum albumin standard curve and the samples found to contain between
5 6 - 8.5 mg/ml of protein.

Proteomics analysis using 2D Electrophoresis

Representative protein samples of the low-oxygen and aerobic chemostat cultures were sent away for 2D Electrophoresis analysis to the Wittman Institute of
10 Technology and Analysis of Biomolecules (WITA), Berlin.

* Protein separation of each sample by 2D electrophoresis (Jungblut et al., Infect Immun 2001 Sep; 69(9):5905-7) was carried out on both Coomassie brilliant blue and silver stained gels produced using 70 μ l and 25 μ l of protein samples
15 respectively.

Protein identification

* The most abundant protein spots on the Coomassie low oxygen gel were excised and sent for Mass spectrometry determination by Robin Wait (Jungblut et al., Infect Immun 2001 Sep; 69(9):5905-7) for protein identification.
20

The following proteins were identified, and are listed (together with their corresponding DNA coding sequences) in Table 3.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

66

TABLE 3

Gene	Assigned function	SEQ ID NO.
Rv3040	31.5kDa protein	115, 116
Rv1288	Antigen 85B-precursor	117, 118
Rv0649	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	119, 120
Rv1357c	29.8 and 31.7 kDa proteins	121, 122
Rv2230c	39.6 kDa protein	123, 124
Rv2488c		125, 126
Rv3011c	Glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase subunit/ ATPB MYCTU ATP synthase beta chain	127, 128
Rv2868c	GcpE protein homolog	129, 130
Rv0718	30S ribosomal protein S8	131, 132
Rv1267c	Response regulator, similar to AFSR_STRCO P25941	133, 134
Rv1294	Homoserine dehydrogenase	135, 136
Rv0844c	Nitrate/nitrite response regulator (NARL)	137, 138

5

10

15

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-67-

References:

1. McKinney, J.D., et al., Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase [see comments]. *Nature*, 2000. 406(6797): p. 735-8.
2. Pelicic, V., et al., Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(20): p. 10955-60.
3. Lee, M.H., et al., Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration- proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(8): p. 3111-5.
4. McShane, H., et al., Enhanced immunogenicity of CD4(+) t-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect Immun*, 2001. 69(2): p. 681-6.
5. Movahedzadeh, F., M.J. Colston, and E.O. Davis, Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* LexA: recognition of a Cheo (Bacillus-type SOS) box. *Microbiology*, 1997. 143(Pt 3): p. 929-36.

Additional References:

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N. Y.
- Lefever, P., O. Denis, L. De Wit, A. Tanghe, P. Vandenbussche, J. Content, and K. Huygen. 2000. Cloning of the gene encoding a 22-kilodalton cell surface antigen of *Mycobacterium bovis* BCG and analysis of its potential for DNA vaccination against tuberculosis. *Infection and Immunity*. 68:1040-1047.
- Vordermeire, H. M., P. J. Cockle, A. O. Whelan, S. Rhodes, M. A. Chambers, D. Clifford, K. Huygen, R. Tascon, D. Lowrie, M. J. Colston, and R. G. Hewinson. 2000. Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-68-

and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test. *Vaccine*, 19:1246-1255.

- Cheng, W., C. Hung, C. Chai, K. Hsu, L. He, C. Rice, M. Ling, and T. Wu. 2001. Enhancement of Sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 gene to an antigen. *J. Immunol.* 166:6218-6226.
- 5
- Lalvani, A. *et al.*, 2001. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *The Lancet* 357:2017-2021.
- 10

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-69-

Claims

1. An isolated mycobacterial peptide or a fragment or variant or derivative thereof, wherein the peptide is encoded by a gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C.
2. An isolated peptide according to Claim 1, or fragment or variant or derivative thereof, wherein the peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135 and 137.
3. A method of identifying a mycobacterial gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C, said method comprising:-
 - culturing a first mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C;
 - culturing a second mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C;
 - obtaining first and second mRNA populations from said first and second mycobacteria, respectively;
 - preparing first and second cDNA populations from said first and second mRNA populations, respectively, during which cDNA preparation a detectable label is introduced into the cDNA molecules of the first and second cDNA populations;
 - isolating corresponding first and second cDNA molecules from the first and second cDNA populations, respectively;
 - comparing relative amounts of label or corresponding signal emitted from the label present in the isolated first and second cDNA molecules;
 - identifying a greater amount of label or signal provided by the isolated first cDNA molecule than that provided by the isolated second cDNA molecule; and

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-70-

identifying the first cDNA and the corresponding mycobacterial gene which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C.

5

4. A method according to Claim 3, wherein the corresponding first and second cDNA molecules are isolated from the first and second cDNA populations, respectively, by hybridisation thereof to an array plate containing immobilised amplified DNA sequences which have been generated from mycobacterial genomic DNA, said immobilised sequences being representative of each known gene of the mycobacterial genome, and each representative sequence having been immobilised at an identified location on the plate.

5. A method according to Claim 3 or Claim 4, wherein the second mycobacterium is cultured under continuous culture conditions which are not substantially conducive to virulence of the second mycobacterium.

6. A method according to any of Claims 3-5, wherein the culture conditions are non-limiting in terms of available nutrients other than oxygen, and non-limiting in terms of growth factors, temperature, and pH to the growth of the mycobacterium.

7. A method according to any of Claim 3-6, wherein the first mycobacterium is cultured under continuous culture conditions, except for the dissolved oxygen tension, which are substantially identical to those for the second mycobacterium.

8. A method according to any of Claims 3-7, wherein a relative induction or up-regulation is identified by a relative 3-fold, preferably a relative 4-fold increase in the amount of label or signal provided by the isolated first cDNA molecule over that provided by the isolated second cDNA molecule.

9. An inhibitor of a mycobacterial peptide, wherein the peptide is encoded by a gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C, and wherein the inhibitor is capable of preventing or inhibiting the mycobacterial

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-71-

peptide from exerting its native biological effect.

10. An inhibitor according to Claim 9, wherein the inhibitor is capable of inhibiting a protein selected from the group consisting of:- acyl carrier protein, monooxygenase, mycobactin synthesis protein, transcription regulator, oxidoreductase, acyl CoA dehydrogenase, esterase/acetyl hydrolase, cytochrome D, methyl transferase, transaminase, PPE protein, valyl-tRNA synthetase, guanylate kinase, ketol acid reductoisomerase, ABC transporter, ATP-binding protein, protoporphyrinogen oxidase, sigma factor, pyruvate kinase, heat shock protein, and aminotransferase.

11. An inhibitor according to Claim 9, selected from the group consisting of:- an antibiotic capable of targeting the induced or up-regulated mycobacterial gene, or the gene product thereof; and an antisense or triplex-forming nucleic acid sequence which is complementary to at least part of the inducible or up-regulatable gene.

12. An antibody which binds to a peptide encoded by a gene, or to a fragment or variant or derivative of said peptide, the expression of which gene is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C.

13. An antibody according to Claim 12, wherein the peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, and 137.

14. An attenuated mycobacterium in which a gene has been modified thereby rendering the mycobacterium substantially non-pathogenic, wherein the gene is a gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-72-

15. An attenuated mycobacterium according to Claim 14, wherein said gene has a wild-type coding sequence corresponding to one of the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136 and 138.
16. An attenuated microbial carrier, comprising a peptide encoded by a gene, or a fragment or variant or derivative of said peptide, the expression of which gene is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C.
17. An attenuated microbial carrier according to Claim 16, wherein the peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135 and 137.
18. An attenuated microbial carrier according to Claim 16 or 17, wherein the attenuated microbial carrier is attenuated salmonella, attenuated vaccinia virus, attenuated fowlpox virus, or attenuated *M. bovis* (eg. BCG strain).
19. A DNA plasmid comprising a promoter, a polyadenylation signal and a DNA sequence which corresponds to the coding sequence of a gene, or a fragment or variant or derivative of said DNA sequence, the expression of which gene is induced or up-regulated during culture of a wild-type version of the mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C, wherein the promoter and polyadenylation signal are operably linked to the DNA sequence.
20. A DNA plasmid according to Claim 19, wherein the coding sequence of said gene is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54,

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-73-

56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136 and 138.

- 5 21. A DNA plasmid according to Claim 19 or 20, wherein the promoter is selected from the group consisting of CMV and SV40 promoters, and the polyadenylation signal is selected from SV40 and bovine growth hormone polyadenylation signals.
- 10 22. An isolated RNA sequence which is encoded by a DNA sequence or a fragment or variant or derivative of said DNA sequence, wherein the DNA sequence corresponds to the coding sequence of a gene which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10% air saturation measured at 37°C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40% air saturation measured at 37°C.
- 15 23. An RNA vector comprising the RNA sequence of Claim 22 and an integration site for a chromosome of a host cell.
- 20 24. Use of a peptide or fragment or variant or derivative according to Claim 1 or Claim 2, an inhibitor according to any of Claims 9-11, an antibody according to Claim 12 or 13, an attenuated mycobacterium according to Claim 14 or 15, an attenuated microbial carrier according to any of Claims 16-18, a DNA sequence corresponding to the coding sequence of a gene which is induced or up-regulated
- 25 during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10% air saturation measured at 37°C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40% air saturation measured at 37°C or a fragment or variant or derivative of said DNA sequence, a DNA plasmid according to any of Claims 19-21, an RNA sequence according to Claim
- 30 22, and/or an RNA vector according to Claim 23, in the manufacture of a medicament for treating or preventing a mycobacterial infection.
- 35 25. A method of treating or preventing a mycobacterial infection, by administering to a patient a peptide or fragment or variant or derivative according to Claim 1 or Claim 2, an inhibitor according to any of Claims 9-11, an antibody according to Claim 12 or 13, an attenuated mycobacterium according to Claim 14 or 15, an attenuated microbial carrier according to any of Claims 16-18, a DNA sequence

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-74-

corresponding to the coding sequence of a gene which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10% air saturation measured at 37°C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40% air saturation measured at 37°C or a fragment or variant or derivative of said DNA sequence, a DNA
5 plasmid according to any of Claims 19-21, an RNA sequence according to Claim 22, and/or an RNA vector according to Claim 23.

26. Use of a peptide or fragment or variant or derivative according to Claim 1 or
10 2, or an antibody according to Claim 12 or 13, or a polynucleotide probe comprising at least 8 nucleotides wherein said probe binds to at least part of a gene which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10% air saturation measured at 37°C when compared with a dissolved oxygen tension
15 of at least 40% air saturation measured at 37°C, in the manufacture of a diagnostic reagent for identifying a mycobacterial infection.

27. An isolated peptide, an inhibitor, an antibody, an attenuated mycobacterium, an attenuated microbial carrier, an isolated RNA molecule, an RNA vector, or a
20 DNA plasmid substantially as hereinbefore described with reference to the Examples.

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-1-

SEQUENCE LISTING

<110> Microbiological Research Authority

James, Brian

Bacon, Joanna

Marsh, Philip

<120> Mycobacterial antigens expressed under low oxygen tension

<130> GNS/MMM/23434

<150> GB 0115365.9

<151> 2001-06-01

<150> GB 0121780.1

<151> 2001-09-07

<160> 138

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 106

<212> FRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1

Met Trp Arg Tyr Pro Leu Ser Thr Arg Leu Ala Leu Pro Asn Thr Pro
1 5 10 15

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-2-

Gly Val Ala Ser Phe Ala Met Thr Ser Ser Pro Ser Thr Val Ser Thr
 20 25 30

Thr Leu Leu Ser Ile Leu Arg Asp Asp Leu Asn Ile Asp Leu Thr Arg
 35 40 45

Val Thr Pro Asp Ala Arg Leu Val Asp Asp Val Gly Leu Asp Ser Val
 50 55 60

Ala Phe Ala Val Gly Met Val Ala Ile Glu Glu Arg Leu Gly Val Ala
 65 70 75 80

Leu Ser Glu Glu Glu Leu Leu Thr Cys Asp Thr Val Gly Glu Leu Glu
 85 90 95

Ala Ala Ile Ala Ala Lys Tyr Arg Asp Glu
 100 105

<210> 2

<211> 318

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2
 atgtggcgat atccactaag tacaaggcta gccttgccata ataccccagg ttagcctcc 60
 ttgcgccatga cctcatcgcc gtccaccgtc agcactacgc tgetgagcat cctgcgcgac 120
 gacctcaaca ttgacctgac tcgagtcacg cctgatgcca ggttggtcga cgaatgtgga 180
 ctggattcgg tggccttcgc ggtcggatg gtggccatcg aggagcggct cggagtcgca 240
 ctgtccgaag aggagctctt gacgtgcgac acggtcggag aactggagga agcgatcgcg 300
 gccaaatacc gcgatgag 318

<210> 3

<211> 538

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-3-

<400> 3

```

Met Thr Asn Gln Gln His Asp His Asp Phe Asp His Asp Arg Arg Ser
1           5           10           15

Phe Ala Ser Arg Thr Pro Val Asn Asn Asn Pro Asp Lys Val Val Tyr
20           25           30

Arg Arg Gly Phe Val Thr Arg His Gln Val Thr Gly Trp Arg Phe Val
35           40           45

Met Arg Arg Ile Ala Ala Gly Ile Ala Leu His Asp Thr Arg Met Leu
50           55           60

Val Asp Pro Leu Arg Thr Gln Ser Arg Ala Val Leu Met Gly Val Leu
65           70           75           80

Ile Val Ile Thr Gly Leu Ile Gly Ser Phe Val Phe Ser Leu Ile Arg
85           90           95

Pro Asn Gly Gln Ala Gly Ser Asn Ala Val Leu Ala Asp Arg Ser Thr
100          105          110

Ala Ala Leu Tyr Val Arg Val Gly Glu Gln Leu His Pro Val Leu Asn
115          120          125

Leu Thr Ser Ala Arg Leu Ile Val Gly Arg Pro Val Ser Pro Thr Thr
130          135          140

Val Lys Ser Thr Glu Leu Asp Gln Phe Pro Arg Gly Asn Leu Ile Gly
145          150          155          160

Ile Pro Gly Ala Pro Glu Arg Met Val Gln Asn Thr Ser Thr Asp Ala
165          170          175

Asn Trp Thr Val Cys Asp Gly Leu Asn Ala Pro Ser Arg Gly Gly Ala
180          185          190

Asp Gly Val Gly Val Thr Val Ile Ala Gly Pro Leu Glu Asp Thr Gly
195          200          205

Ala Arg Ala Ala Ala Leu Gly Pro Gly Gln Ala Val Leu Val Asp Ser
210          215          220

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-4-

Gly Ala Gly Thr Trp Leu Leu Trp Asp Gly Lys Arg Ser Pro Ile Asp
 225 230 235 240
 Leu Ala Asp His Ala Val Thr Ser Gly Leu Gly Leu Gly Ala Asp Val
 245 250 255
 Pro Ala Pro Arg Ile Ile Ala Ser Gly Leu Phe Asn Ala Ile Pro Glu
 260 265 270
 Ala Pro Pro Leu Thr Ala Pro Ile Ile Pro Asp Ala Gly Asn Pro Ala
 275 280 285
 Ser Phe Gly Val Pro Ala Pro Ile Gly Ala Val Val Ser Ser Tyr Ala
 290 295 300
 Leu Lys Asp Ser Gly Lys Thr Ile Ser Asp Thr Val Gln Tyr Tyr Ala
 305 310 315 320
 Val Leu Pro Asp Gly Leu Gln Gln Ile Ser Pro Val Leu Ala Ala Ile
 325 330 335
 Leu Arg Asn Asn Asn Ser Tyr Gly Leu Gln Gln Pro Pro Arg Leu Gly
 340 345 350
 Ala Asp Glu Val Ala Lys Leu Pro Val Ser Arg Val Leu Asp Thr Arg
 355 360 365
 Arg Tyr Pro Ser Glu Pro Val Ser Leu Val Asp Val Thr Arg Asp Pro
 370 375 380
 Val Thr Cys Ala Tyr Trp Ser Lys Pro Val Gly Ala Ala Thr Ser Ser
 385 390 395 400
 Leu Thr Leu Leu Ala Gly Ser Ala Leu Pro Val Pro Asp Ala Val His
 405 410 415
 Thr Val Glu Leu Val Gly Ala Gly Asn Gly Gly Val Ala Thr Arg Val
 420 425 430
 Ala Leu Ala Ala Gly Thr Gly Tyr Phe Thr Gln Thr Val Gly Gly Gly
 435 440 445
 Pro Asp Ala Pro Gly Ala Gly Ser Leu Phe Trp Val Ser Asp Thr Gly
 450 455 460

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-5-

Val Arg Tyr Gly Ile Asp Asn Glu Pro Gln Gly Val Ala Gly Gly Gly
465 470 475 480

Lys Ala Val Glu Ala Leu Gly Leu Asn Pro Pro Pro Val Pro Ile Pro
485 490 495

Trp Ser Val Leu Ser Leu Phe Val Pro Gly Pro Thr Leu Ser Arg Ala
500 505 510

Asp Ala Leu Leu Ala His Asp Thr Leu Val Pro Asp Ser Arg Pro Ala
515 520 525

Arg Pro Val Ser Ala Glu Gly Gly Tyr Arg
530 535

<210> 4

<211> 1614

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4
atgacgaacc agcagcacga ccaacgacttc gaccacgacc gtcgctcggt cgcctccgga 60
accccggtca acaacaaccc cgacaagggt gtctaccgcc gcggcttcgt caccgcgat 120
caggtgacgg gctggcggtt cgtgatgcgc cgaatcgccg ccggaatcgc attgcacgac 180
accgcgatgc tggtcgaccc gttgcgcact cagtcacgcg cggtgctgat ggggtgctg 240
attgtgatea cgggggtgat cggctccttc gtattctcgt tgattcggcc caatgggcag 300
gcgggttagca acgcggtgct tgcgcaccgg tccacgcggc cgtgtatgt gcgggtgggc 360
gagcagctgc acccggtgct caacctgacc tcggcccgcc tgatcgtcgg ccggccggtg 420
agcccgacga cggtgaaaag tactgagttg gaccagtttc cgcgcggaaa cctgacggc 480
atcccggtg cgcgggagcg gatggtgcag aacacctcca ccgacgcgaa ctggacggtg 540
tgtgacggcc tcaacgcacc gtcgcggggc ggtgcggatg gcgtgggtgt gacggtgatt 600
gccggcccgcc tggaggacac cggcgacgcg gcggcccgcc tcgggcccgg gcaggcggtg 660
ctggtcgaca gcggcgccgg cacctggctg ttgtgggacg gcaagcgcag cccgattgat 720
ctggccgcat atcggtcac cagcggcctc ggcctggggc ccgacgtgac cgcgcgcggc 780

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-6-

```

atcatcgctt cggggctgtt caacgcgata ccgaagcac cgcactgac ggcgcgcatc 840
atccccgatg cgggcaaccc ggcgagcttc ggtgtgcgcg cgcgcatcgg cgcggtggtg 900
agttcctacg ccttgaaga ctcgggcaag accatatcgg acaccgtgca gtactacgcg 960
gtgctgcgcg acggtttgca gcagatttcg ccggtattgg cggcaatcct gcgcaacaac 1020
aactcctatg gtctgcagca gccgcctcgg ctgggggccc acgaggtcgc caagctgccc 1080
gtgtgcgccc tgttgacac cagcgcttat ccacgcgagc cggtaagtct cgtcgacgtt 1140
accgtgacc cgtcacctg cgcgtactgg agcaagccgg tgggtgcggc caccagctcg 1200
ttgactctgt tggcaggttc ggcgtgcgg gtgccagatg cgggtgcacac cgtcgagctg 1260
gtcggcgccc gcaacggttg tgtggcaacc cgagtggcgt tagcggcccg tactggctac 1320
ttccccaga cgggtgggccc cggcccgat gcgcgggccc cggggtcgtt gttctgggtg 1380
tcggataccg ggggtcggtta cggtatcgac aatgagcctc agggagtggc tggaggcggc 1440
aaagcgggtg aggcctcttg cctgaacccc ccccggtccc ccatcccggt gtcggtgctg 1500
tcgtgtttg tgcccggccc gacgtgtcg cgtgccgacg cgtgctggc acacgacacc 1560
ttggtgcccg acagcaggcc cgtcgtccg gtatcgccc agggagggtta ccgg 1614

```

<210> 5

<211> 412

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

```

Met Lys Ile Arg Thr Leu Ser Gly Ser Val Leu Glu Pro Pro Ser Ala
1           5           10           15

```

```

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

```

```

Ser Thr Ile Pro Lys Ile Pro Phe Ile Arg Pro Ser Phe Pro Gly Pro
35           40           45

```

```

Ala Glu Leu Ala Glu Asp Phe Val Gln Ile Ala Gln Ala Asn Trp Tyr
50           55           60

```

```

Thr Asn Phe Gly Pro Asn Glu Arg Arg Phe Ala Arg Ala Leu Arg Asp

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-7-

65 70 75 80

Tyr Leu Gly Pro His Leu His Val Ala Thr Leu Ala Asn Gly Thr Leu
85 90 95

Ala Leu Leu Ala Ala Leu His Val Ser Phe Gly Ala Gly Thr Arg Asp
100 105 110

Arg Tyr Leu Leu Met Pro Ser Phe Thr Phe Val Gly Val Ala Gln Ala
115 120 125

Ala Leu Trp Thr Gly Tyr Arg Pro Trp Phe Ile Asp Ile Asp Ala Asn
130 135 140

Thr Trp Gln Pro Cys Val His Ser Ala Arg Ala Val Ile Glu Arg Phe
145 150 155 160

Arg Asp Arg Ile Ala Gly Ile Leu Leu Ala Asn Val Phe Gly Val Gly
165 170 175

Asn Pro Gln Ile Ser Val Trp Glu Glu Leu Ala Ala Glu Trp Glu Leu
180 185 190

Pro Ile Val Leu Asp Ser Ala Ala Gly Phe Gly Ser Thr Tyr Ala Asp
195 200 205

Gly Glu Arg Leu Gly Gly Arg Gly Ala Cys Glu Ile Phe Ser Phe His
210 215 220

Ala Thr Lys Pro Phe Ala Val Gly Glu Gly Gly Ala Leu Val Ser Arg
225 230 235 240

Asp Pro Arg Leu Val Glu His Ala Tyr Lys Phe Gln Asn Phe Gly Leu
245 250 255

Val Gln Thr Arg Glu Ser Ile Gln Leu Gly Met Asn Gly Lys Leu Ser
260 265 270

Glu Ile Ser Ala Ala Ile Gly Leu Arg Gln Leu Val Gly Leu Asp Arg
275 280 285

Arg Leu Ala Ser Arg Arg Lys Val Leu Glu Cys Tyr Arg Thr Gly Met
290 295 300

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-8-

Ala Asp Ala Gly Val Arg Phe Gln Asp Asn Ala Asn Val Ala Ser Leu
 305 310 315 320

Cys Phe Ala Ser Ala Cys Cys Thr Ser Ala Asp His Lys Ala Ala Val
 325 330 335

Leu Gly Ser Leu Arg Arg His Ala Ile Glu Ala Arg Asp Tyr Tyr Asn
 340 345 350

Pro Pro Gln His Arg His Pro Tyr Phe Val Thr Asn Ala Glu Leu Val
 355 360 365

Glu Ser Thr Asp Leu Ala Val Thr Ala Asp Ile Cys Ser Arg Ile Val
 370 375 380

Ser Leu Pro Val His Asp-His Met Ala Pro-Asp Asp-Val Ala Arg Val
 385 390 395 400

Val Ala Ala Val Gln Glu Ala Glu Val Arg Gly Glu
 405 410

<210> 6

<211> 1236

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 6
 atgaagatcc gaacgttatc cggctcgggtg ctggagccgc cgtccgcagt acgcgcgaac 60
 ccaggcacgt ccatgttaaa actcagaccg ggtggctcga cgatcccaa gatcccttc 120
 atccgccga gotttcccg gccagccgag ctccgcggg acttcgtaca gatcgcccag 180
 gctaactggt aacgaactt cggtcggaac gagcggcgtt ttgcccgcgc cctgcgcgac 240
 tatctgggac ctcatctgca cgttgctacc ctgcacaac gcaccctggc actcctcgcg 300
 gcgctccacg tcagtttcgg cgcgggtacg cgggaccgct acctgctgat gccgtcgttc 360
 acgttcgtcg cgtgggtcga ggctgcgcta tggactgggt accgtccctg gttcatcgac 420
 atcgacgcca acacatggca gccatgcgtc cactccgcc gcgcgctcat cgaacgcttc 480
 cgcgaccgga tcgcccgcgt cctgctggcc aatgtgttcg gcgtcggcaa tcccagatc 540
 agcgtctggg aggagctcgc cgcgaatgg gagctacga ttgtgctcga ctccggcgcc 600

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-9-

```

ggcttcgggt ccacgtacgc cgaaggcgag cgcttcgggt gacgcggtgc atgcgagatc 660
ttctctctcc atgcgaccaa gccgttcgag gttggtgagg gcggcgctct gggtttctgc 720
gatccacggc tcgtcgagca cgcatacaag ttccagaact tcggcttggt gcaaacacgc 780
gagtcacatc agctcggaat gaacggcaag ctgtcggaga tcagcgccgc tattggccta 840
cgccaactag tcgggcttga tcgcgcctg gcaagtcgcc gcaaggtcct cgagtgcctat 900
cgccacggta tggccgacgc gsgtgtgctt ttccaggaca acgccaatgt tgcgtcgctc 960
tggttcgcga gcgttgctg cagtcgcc gaccacaagg ccgcggttct gggtagcctg 1020
cgtaggcacg cgatcgaggc gcgcgactac tacaaccac cgacgcaccg acatcgctac 1080
tttgtagcga atgcgcagtt agtcgagtcg accgatctag ccgtcacggc ggacatttgc 1140
tcgcgaatcg tgctgctgcc agtcacgac cacatggccc cggatgacgt tgcccggtgc 1200
gtcgcgcgcg tgcaggaa gcaggtgcgc ggtgaa 1236

```

<210> 7

<211> 524

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 7

```

Val Ser Ile Ala Asp Thr Ala Ala Lys Pro Ser Thr Pro Ser Pro Ala
1          5          10          15

```

```

Asn Gln Pro Pro Val Arg Thr Arg Ala Val Ile Ile Gly Thr Gly Phe
20          25          30

```

```

Ser Gly Leu Gly Met Ala Ile Ala Leu Gln Lys Gln Gly Val Asp Phe
35          40          45

```

```

Val Ile Leu Glu Lys Ala Asp Asp Val Gly Gly Thr Trp Arg Asp Asn
50          55          60

```

```

Thr Tyr Pro Gly Cys Ala Cys Asp Ile Pro Ser His Leu Tyr Ser Phe
65          70          75          80

```

```

Ser Phe Glu Pro Lys Ala Asp Trp Lys His Leu Phe Ser Tyr Trp Asp
85          90          95

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-10-

Glu Ile Leu Gly Tyr Leu Lys Gly Val Thr Asp Lys Tyr Gly Leu Arg
 100 105 110
 Arg Tyr Ile Glu Phe Asn Ser Leu Val Asp Arg Gly Tyr Trp Asp Asp
 115 120 125
 Asp Glu Cys Arg Trp His Val Phe Thr Ala Asp Gly Arg Glu Tyr Val
 130 135 140
 Ala Gln Phe Leu Ile Ser Gly Ala Gly Ala Leu His Ile Pro Ser Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Ile Ala Gly Arg Asp Glu Phe Ala Gly Pro Ala Phe His Ser
 165 170 175
 Ala Gln Trp Asp His Ser Ile Asp Leu Thr Gly Lys Arg Val Ala Ile
 180 185 190
 Val Gly Thr Gly Ala Ser Ala Ile Gln Ile Val Pro Glu Ile Val Gly
 195 200 205
 Gln Val Ala Glu Leu Gln Leu Tyr Gln Arg Thr Pro Pro Trp Val Val
 210 215 220
 Pro Arg Thr Asn Glu Glu Leu Pro Val Ser Leu Arg Arg Ala Leu Arg
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Gly Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Gly Ile Tyr Trp Ala
 245 250 255
 Gln Glu Ala Leu Ala Tyr Gly Met Thr Lys Arg Pro Asn Thr Leu Lys
 260 265 270
 Ile Ile Glu Ala Tyr Ala Lys Tyr Asn Ile Arg Arg Ser Val Lys Asp
 275 280 285
 Arg Glu Leu Arg Arg Lys Leu Thr Pro Arg Tyr Arg Ile Gly Cys Lys
 290 295 300
 Arg Ile Leu Asn Ser Ser Thr Tyr Tyr Pro Ala Val Ala Asp Pro Lys
 305 310 315 320
 Thr Glu Leu Ile Thr Asp Arg Ile Asp Arg Ile Thr His Asp Gly Ile
 325 330 335

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-11-

Val Thr Ala Asp Gly Thr Gly Arg Glu Val Phe Arg Glu Ala Asp Val
 340 345 350

Ile Val Tyr Ala Thr Gly Phe His Val Thr Asp Ser Tyr Thr Tyr Val
 355 360 365

Gln Ile Lys Gly Arg His Gly Glu Asp Leu Val Asp Arg Trp Asn Arg
 370 375 380

Glu Gly Ile Gly Ala His Arg Gly Ile Thr Val Ala Asn Met Pro Asn
 385 390 395 400

Leu Phe Phe Leu Leu Gly Pro Asn Thr Gly Leu Gly His Asn Ser Val
 405 410 415

Val Phe Met Ile Glu Ser Gln Ile His Tyr Val Ala Asp Ala Ile Ala
 420 425 430

Lys Cys Asp Arg Met Gly Val Gln Ala Leu Ala Pro Thr Arg Glu Ala
 435 440 445

Gln Asp Arg Phe Asn Gln Glu Leu Gln Arg Arg Leu Ala Gly Ser Val
 450 455 460

Trp Asn Ser Gly Gly Cys Arg Ser Trp Tyr Leu Asp Glu His Gly Lys
 465 470 475 480

Asn Thr Val Leu Trp Cys Gly Tyr Thr Trp Gln Tyr Trp Leu Thr Thr
 485 490 495

Arg Ser Val Asn Pro Ala Glu Tyr Arg Phe Phe Gly Ile Gly Asn Gly
 500 505 510

Leu Ser Ser Asp Arg Ala Thr Val Ala Ala Ala Asn
 515 520

<210> 8

<211> 1572

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-12-

```

<400> 8
gtgagcattg ccgatacggc tgccaagcgc tccacgccaa gcccggccaa ccagccgcgc 60
gtacgtaccc gcgcgcgtcat catcggaacc ggattctccg gtttgggcat ggccatcgca 120
ctgcaaaagc aaggagtgga ctctgcata ttggagaaag ccgacgacgt cggcggcacc 180
tggcgcgaca acacctaccc cggctgcgcg tgcgacatcc cgtcgacctt gtactccttc 240
tcgttcgagc ccaaggcgga ctggaacac ctgttttccct actgggacga aatcttgggc 300
tacctcaaag gggtcaccga caagtaaggc ctgcgcgcgt acatcgagtt caattcgctc 360
gtcgatcgcg gctactggga cgaacgacga tgcgcctggc acgtgttcc cgcgcgacgg 420
cgtgaatacg tcgcgcagtt cctgatctcc ggggcgcgtg cgttgacat ccgcctcttc 480
cccgagatcg caggtcgcga cgaattcgc gcccccgtt tccattcgc ccagtgggac 540
cacagtatcg acctgaccgg caagcgggtg gcgacgtcg ggaccggtgc cagcgcgac 600
cagatcgtgc ccgagatcgt cggccaggtc gccgaactt agctctatca gccaccccg 660
ccgtgggtgg tcccgcgcac caacgaagag ctgcgggtgt cgtcgcccg ggcgttgcca 720
accgtccccc ggcctacggc actgttgcgc ctgcgcctct actgggccca ggaaggcgtg 780
gcctacggca tgaccaagcg gcccaacacg ttgaagatca tcgaggccta tgccaaatac 840
aatactctgc gatcgttgaa ggatcgcgag ctgcgcgcga agctgacgcc gcggtatcgc 900
atcggtgca aacggatcct gaactctctt acctattacc ccgcgggtgg ggaaccgaag 960
accgaactga tcaccgacgg catcgaccgg atcacgcacg acgggatcgt caccgcgcac 1020
ggcactggcc gtgaggtctt ccgggaagcc gatgtgatcg tgtacgccac cggcttccac 1080
gtcaccgact cctataccta tgtcagatc aaggggcgtc acggcgagga cctggtcgac 1140
cgttggaacc gtgagggcat cgggtgcacac cggggatca ccgtcgccaa catgcccac 1200
ctgtttcttc tgctggggcc gaacactggg ctgggacaca actccgtggt gttcatgac 1260
gaatcgcaga tccattacgt ggccgatgcg atcgcaaat gcgacggat gggcgtgcaa 1320
gcgtggccc caccgcga ggcgcaagac cggttcaacc agagctgca gcgcaggctg 1380
gctgggtcgg tgtggaacag tggcggctgc cgcagctggt atctcgacga gcacggcaag 1440
aacaccgtgc tctggtgcgg ctacacctgg caatactggc tgaccacccg ctcggtcaac 1500
ccgcgcgagt accggttctt cgggatcggc aacggtttgt cgagcgaccc gcgcaggtc 1560
gctcgggcga ac 1572

```

<210> 9

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-13-

<211> 444

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

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

Pro Gly Gly Val Glu Thr Ala Asp Asp Tyr Trp Thr Leu Leu Ser Glu
 20 25 30

Gln Arg Glu Gly Leu Gly Pro Phe Pro Thr Asp Arg Gly Trp Ala Leu
 35 40 45

Arg Glu Leu Phe Asp Gly Ser Arg Arg Asn Gly Phe Lys Pro Ile His
 50 55 60

Asn Leu Gly Gly Phe Leu Ser Ser Ala Thr Thr Phe Asp Pro Glu Phe
 65 70 75 80

Phe Arg Ile Ser Pro Arg Glu Ala Thr Ala Met Asp Pro Gln Gln Arg
 85 90 95

Val Gly Leu Arg Val Ala Trp Arg Thr Leu Glu Asn Ser Gly Ile Asn
 100 105 110

Pro Asp Asp Leu Ala Gly His Asp Val Gly Cys Tyr Val Gly Ala Ser
 115 120 125

Ala Leu Glu Tyr Gly Pro Ala Leu Thr Glu Phe Ser His His Ser Gly
 130 135 140

His Leu Ile Thr Gly Thr Ser Leu Gly Val Ile Ser Gly Arg Ile Ala
 145 150 155 160

Tyr Thr Leu Asp Leu Ala Gly Pro Ala Leu Thr Val Asp Thr Ser Cys
 165 170 175

Ser Ser Ala Leu Ala Ala Phe His Thr Ala Val Gln Ala Ile Arg Ala
 180 185 190

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-14-

Gly Asp Cys Asp Leu Ala Leu Ala Gly Gly Val Cys Val Met Gly Thr
 195 200 205
 Pro Gly Tyr Phe Val Glu Phe Ser Lys Gln His Ala Leu Ser Asp Asp
 210 215 220
 Gly His Cys Arg Pro Tyr Ser Ala His Ala Ser Gly Thr Ala Trp Ala
 225 230 235 240
 Glu Gly Ala Ala Met Phe Leu Leu Gln Arg Arg Ser Arg Ala Thr Ala
 245 250 255
 Asp Arg Arg Arg Val Leu Ala Glu Val Arg Ala Ser Cys Leu Asn Ser
 260 265 270
 Asp Gly Leu Ser Asp Gly Leu Thr Ala Pro Ser Gly Asp Ala Gln Thr
 275 280 285
 Arg Leu Leu Arg Arg Ala Ile Ala Gln Ala Ala Val Val Pro Ala Asp
 290 295 300
 Val Gly Met Val Glu Gly His Gly Thr Ala Thr Arg Leu Gly Asp Arg
 305 310 315 320
 Thr Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ala Ser Tyr Gly Thr Ala Pro Ala Gly
 325 330 335
 Arg Gly Pro Leu Leu Gly Ser Val Lys Ser Asn Ile Gly His Ala Gln
 340 345 350
 Ala Ala Ala Gly Gly Leu Gly Leu Val Lys Val Ile Leu Ala Ala Gln
 355 360 365
 His Ala Ala Ile Pro Pro Thr Leu His Val Asp Glu Pro Ser Arg Glu
 370 375 380
 Ile Asp Trp Glu Lys Gln Gly Leu Arg Leu Ala Asp Lys Leu Thr Pro
 385 390 395 400
 Trp Arg Ala Val Asp Gly Trp Arg Thr Ala Ala Val Ser Ala Phe Gly
 405 410 415
 Met Ser Gly Thr Asn Ser His Val Ile Val Ser Met Pro Asp Thr Val
 420 425 430

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-15-

Ser Ala Pro Glu Arg Gly Pro Glu Cys Gly Glu Val
 435 440

<210> 10

<211> 1332

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 10
 atgtccgata acgaccgggt cgtcatcgtc gggtggcca togaggcacc cggtsgtgtc 60
 gaaaccgcgc acgactactg gacactgctc tcggaacagc gcgagggact cggaccgttc 120
 cccaccgatac gaggttgggc aettcgcgag ctgttcgacg ggtcgctcg aaacggattc 180
 aaaccgatcc acaaccttgg cggattcctt tcacgcgcaa ctacattcga tcctgagttc 240
 ttccgcattc caccgcgcga ggcgacggcg atggacccgc agcagcgggt ggggctcgga 300
 gtagcatggc gcacctgga gaacagcggg atcaatcccg atgacctggc cggtcacgat 360
 gtggctgtgt atgtcgggtc ctgggcgctc gaatacggtc ccgctttgac cgaattctcc 420
 caccacagtg gccatctgat caccgggacg tcgctgggtg tcatctcccg gcgcacgccc 480
 tacacccttg acctggccgg gccggcgctg accgtcgata cctcgtgttc gtcggcgctg 540
 gcggcccttc acaccgcggg tcaagctatc cgggcgcgcg actgcgacct ggcaactgcc 600
 ggcgcggtgt gcgtgatggg tacgcccgcc tatttcgtcg agttctccaa gcagcagcgc 660
 ctatcgcgacg accgccactg ccggccctac agcgcgcacg ccagcgggac cgcctgggca 720
 gagggcgccg ccatgttctc cctgcagcgc cggtcgcggg caaccgctga ccggcgtcgt 780
 gtccctcgccg aggtgcgtgc cagttgcctg aactccgatg gacttagcga cgggctgacc 840
 gcgccacgcg gcgacgcgca aacgcgactg ctccggcgcg ccatcgcgca ggcagcagtt 900
 gtgcgcccgcg atgtcgggat ggtcgaaggc caccgcaccg cgaccgggct cggcgatcgc 960
 accgaattgc ggtcaactggc agccagctac ggcaaccgcc cggccggacg cgggcccgtg 1020
 ttgggatcgg tcaagtcaaa catcgggcat gctcaggcgg cggcgggcgg gctgggcttc 1080
 gtgaaggcca ttctggccgc ccagcacgcc gcgatccgc cgacactgca cgtcgacgag 1140
 cccagccgcg aatatgattg ggagaaacag ggtctgcggc tggccgacaa actcaagccg 1200
 tggcgggcgc ttgacggatg gcgcaccgcg gcgggtgtccg cgttcgggat gagcggatcc 1260

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-16-

aatagccaag tgatcggttc gatccggac accgtttccg cgcccgagcg tggcccgag 1320
 tgtggggagg tg 1332

<210> 11

<211> 1004

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11

Met Ala Pro Lys Gln Leu Pro Asp Gly Arg Val Ala Val Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Ala His Ala Glu Glu Leu Ile Gly Pro Asp Ala Arg Ala Ile Ala Asp
 20 25 30

Tyr Leu Glu Arg Phe Pro Ala Thr Thr Val Thr Glu Val Ala Arg Gln
 35 40 45

Leu Arg Lys Thr Arg Arg Val Arg Arg His Arg Ala Val Leu Arg Ala
 50 55 60

Ala Asp Arg Leu Glu Leu Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Ala Ala Gly
 65 70 75 80

Arg Glu His Pro Leu Ile Ala Arg Ser Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg
 85 90 95

Gln Ala Phe Val Phe Pro Gly Gln Gly Gly His Trp Pro Gly Met Gly
 100 105 110

Ala Val Ala Tyr Arg Glu Leu Pro Thr Tyr Arg Thr Ala Thr Asp Thr
 115 120 125

Cys Ala Ala Ala Phe Ala Ala Ala Gly Val Asp Ser Pro Leu Pro Tyr
 130 135 140

Leu Ile Ala Pro Pro Gly Thr Asp Glu Arg Gln Ala Phe Cys Glu Ile
 145 150 155 160

Glu Ile Glu Gly Ala Gln Phe Val His Ala Val Ala Leu Ala Glu Val

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-17-

	165		170		175
Trp Arg Ser Cys Gly Val Leu Pro Asp Leu Thr Val Gly His Ser Leu					
	180		185		190
Gly Glu Val Ala Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Thr Leu Ser Asp					
	195		200		205
Ala Val Ala Val Val Ala Ala Arg Ala Asn Val Val Gly Arg Leu Pro					
	210		215		220
Gly Arg Tyr Ala Val Ala Ala Leu Gly Ile Gly Glu Gln Asp Ala Ser					
	225		230		235
Ala Leu Ile Ala Thr Thr Gly Gly Trp Leu Glu Leu Ser Val Val Asn					
	245		250		255
Ala Ser Ser Thr Val Ala Val Ser Gly Glu Arg Gln Ala Val Ala Ala					
	260		265		270
Ile Val Asp Thr Val Arg Ser Ser Gly His Phe Ala Arg Gly Ile Thr					
	275		280		285
Val Gly Phe Pro Val His Thr Ser Val Leu Glu Ser Leu Arg Asp Glu					
	290		295		300
Leu Cys Glu Gln Leu Pro Asp Ser Glu Phe Met Glu Ala Pro Val Gln					
	305		310		315
Phe Ile Gly Gly Thr Thr Gly Asp Val Val Ala Pro Gly Thr Thr Phe					
	325		330		335
Gly Asp Tyr Trp Tyr Ala Asn Leu Arg His Thr Val Arg Phe Asp Arg					
	340		345		350
Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Cys Gly Ala Arg Ala Phe Ile Glu Ile					
	355		360		365
Ser Ala His Pro Ala Leu Leu Phe Ala Ile Gly Gln Asn Cys Glu Gly					
	370		375		380
Ala Ala Asn Leu Pro Asp Gly Pro Ala Val Leu Val Gly Ser Ala Arg					
	385		390		395
					400

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-18-

Arg Gly Glu Arg Phe Val Asp Ala Leu Ser Ala Asn Ile Val Ser Ala
 405 410 415
 Ala Val Ala Asp Pro Gly Tyr Pro Trp Gly Asp Leu Gly Gly Asp Pro
 420 425 430
 Leu Asp Gly Asp Val Asp Leu Ser Gly Phe Pro Asn Ala Pro Met Arg
 435 440 445
 Ala Val Pro Met Trp Ala His Pro Glu Pro Leu Pro Pro Val Ser Gly
 450 455 460
 Leu Thr Ile Ala Val Glu Arg Trp Glu Arg Met Val Pro Ser Thr Pro
 465 470 475 480
 Val Ala Gly Arg His Arg His Leu Ala Val Leu Asp Leu Gly Ala His
 485 490 495
 Arg Ala Leu Ala Gln Thr Leu Cys Ala Ala Ile Asp Ser His Pro Asp
 500 505 510
 Thr Glu Leu Ser Ala Ala Arg Asp Ala Glu Leu Ile Leu Val Ile Ala
 515 520 525
 Pro Asp Phe Glu His Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala Gly Ala Leu Ala
 530 535 540
 Asp Leu Val Gly Ala Gly Leu Leu Asp Tyr Pro Met His Ile Gly Ala
 545 550 555 560
 Arg Cys Gln Ser Val Cys Leu Val Thr Val Gly Ala Glu Gln Val Asp
 565 570 575
 Ala Ala Asp Ala Val Pro Ser Ala Gly Gln Ala Ala Leu Ala Ala Met
 580 585 590
 His Arg Ser Ile Gly Phe Glu His Pro Glu Gln Thr Phe Ser His Leu
 595 600 605
 Asp Leu Pro Ser Trp Asp Leu Asp Pro Val Leu Gly Val Ser Val Ile
 610 615 620
 Thr Ala Val Leu Arg Gly Phe Gly Glu Thr Ala Leu Arg Gly Ser Val
 625 630 635 640

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-19-

Asn Gly Tyr Thr Leu Phe Glu Arg Thr Leu Ala Asp Ala Pro Ala Val
 645 650 655
 Pro Asn Trp Ser Leu Asp Ser Gly Val Leu Asp Asp Val Val Val Thr
 660 665 670
 Gly Gly Ala Gly Ala Ile Gly Met His Tyr Ala Arg Tyr Leu Ala Glu
 675 680 685
 His Gly Ala Arg Arg Ile Val Leu Leu Ser Arg Arg Ala Ala Asp Gln
 690 695 700
 Ala Thr Val Ala Met Leu Arg Lys Gln His Gly Thr Val Ile Val Ser
 705 710 715 720
 Pro Pro Cys Asp Ile Thr Asp Pro Thr Gln Leu Ser Ala Ile Ala Ala
 725 730 735
 Glu Tyr Gly Gly Val Gly Ala Ser Leu Ile Val His Ala Ala Gly Ser
 740 745 750
 Val Ile Ser Gly Thr Ala Pro Gly Val Thr Ser Ala Ala Val Val Asp
 755 760 765
 Asn Phe Ala Ala Lys Val Leu Gly Leu Ala Gln Met Ile Glu Leu Trp
 770 775 780
 Pro Leu Arg Pro Asp Val Arg Thr Leu Leu Cys Ser Ser Val Met Gly
 785 790 795 800
 Val Trp Gly Gly His Gly Val Val Ala Tyr Ser Ala Ala Asn Arg Leu
 805 810 815
 Leu Asp Val Met Ala Ala Gln Leu Arg Ala Gln Gly Arg His Cys Val
 820 825 830
 Ala Val Lys Trp Gly Leu Trp Gln Ala Pro Lys Ala Gly Glu Pro Ala
 835 840 845
 Arg Gly Ile Ala Asp Ala Val Thr Ile Ala Arg Val Glu Arg Ser Gly
 850 855 860
 Leu Arg Gln Met Ala Pro Gln Gln Ala Ile Glu Ala Ser Leu His Glu

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-20-

865 870 875 880

Phe Thr Val Asp Pro Leu Val Phe Ala Ala Asp Ala Ala Arg Leu Gln
 885 890 895

Met Leu Leu Asp Ser Arg Gln Phe Glu Arg Tyr Glu Gly Pro Thr Asp
 900 905 910

Pro Asn Leu Thr Ile Val Asp Ala Val Arg Thr Gln Leu Ala Ala Val
 915 920 925

Leu Gly Ile Pro Gln Ala Gly Glu Val Asn Leu Gln Glu Ser Leu Phe
 930 935 940

Asp Leu Gly Val Asp Ser Met Leu Ala Leu Asp Leu Arg Asn Arg Leu
 945 950 955 960

Lys Arg Ser Ile Gly Ala Thr Val Ser Leu Ala Thr Leu Met Gly Asp
 965 970 975

Ile Thr Gly Asp Gly Leu Val Ala Lys Leu Glu Asp Ala Asp Glu Arg
 980 985 990

Ser His Thr Ala Gln Lys Val Asp Ile Ser Arg Asp
 995 1000

<210> 12

<211> 3012

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 12
 atggcccca aacagctgcc cgatgggcgg gttgcggttt tgctcagcgc ccattgccgag 60
 gaactgatcg ggcgcgacgc tcgggccatc gccgactacc tcgagcgctt tcggctacg 120
 accgtgacgc aagtggctcg gcagctgcgc aagaccgcac gggtccgtcg gcacggggcg 180
 gtgcttcggg cgcgcgacgc gctggaactc gccgagggct tcgcgcgctt ggcgcggga 240
 cgcgacatc cgtcatcgc gcggtcgtcg ttgggtcgg ccccgccca ggcgttcgtc 300
 ttcccgcc aggttggtca ttggccggc atggcgccg tcgctaccg cagctgcgc 360

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-21-

acctatcgga cgcgaccca cactgcgcc gccgcatttg cggccgctgg tgcgactcg	420
ccgctgccat acctgatcgc cccgcccgga accgatgagc ggcaagcgtt ctgcgagatc	480
gagatcgaag gcgcgcagtt cgtccatgcc gttgcgctgg cggaggtatg gcgttcctgc	540
gggtgtgctgc ccatcctaac agtcggtcat agcctcggcg aagtagcggc ggctatctc	600
gcaggaagta tcacctgtc ggatgctgtg gccgtgggtg cggcccgcc caacgtggtg	660
ggccgcttgc ctggtcgcta tgcggtggcg gcgctgggca tcggtgaaca ggaacgcgagc	720
gcgctgatcg cgaaccgcg cggctggctg gaactgtctg tggtaaatgc ctctcgacc	780
gtcgccgtgt ccggtgagcg ccaagcgga cggcccatcg tgaacacagt ccggtccagc	840
ggtaacttgc ccccgccgat caccgtgggc ttcccggtgc ataccagcgt gctcgaatcg	900
ctccgcatg aattatcgga gcagctgcct gactccgaat ttatggaagc gccagtgcga	960
ttcatcggcg gaaccaccgc cgactgtggtg gcgcacggca ccaatttcgg cgaactactg	1020
taacgaaacc tgcgcatac ggtgcgttgc gacgcgctg tcgaatcggc aatccgctgt	1080
ggagcacggg cgttcacga gatacggcc catcccgccg tgttglttg gatcggtcag	1140
aactgtgagg gcgcgccaa cctgcgcgac ggtcccgctg tgcgtggtgg gtggcacgt	1200
cgtggcgagc ggtttgttga tgcgtgtgct gcgaatattg ttagcgcggc ggtcgctgac	1260
cctggctacc cgtggggtga cctgggcggt gacccactcg accgacgagt cgatctgtcc	1320
gggttccga acgcgcgat gcgtgcggtg ccgatgtggc gcaccccca accgctgccg	1380
ccggtgtccg gactgacct tgcggttag cgggtgggaa ccatggtgcc gtcgacaccg	1440
gtcgctgggc ggcaccgtca cctgcagtg ctcatctcg gtgctcaacg cgcgctggct	1500
caaacactgt ggcagcaat tgattcgac cccgataccg agctgagtcg tgcgcgggac	1560
gcgagttga tctggtgat cgcgcgcgac ttcaacaca ccgacgcgt cggggccgcc	1620
ggtgcactcg ccgacctcgt cggggccggt ttgctggact atccgatgca tatcggtgcc	1680
cgttgccaat cgttatgtct ggtcacgctc ggcgcgcgag aggtcgacgc agcggacgcg	1740
gtgcgctcg ccggccaggc cgcgctggcc gcgatgcac gaagcatcgg attcgagcat	1800
ccgaacaga ctttcagcca cctggaattg ccgtcgtggg acttggaacc ggtcctcggc	1860
gtctcggtca taacggcggt actgcggggc ttcggtgaga ccgcgctacg cggctcggtg	1920
aacgggtaca cgtgttcga gcgaaccctc gccgatgcc cggccgtccc gaactggtcg	1980
ttggaactcg gcgtgctcga cgtatgtcgt gtcacgggtg gcgcgggtgc catcgggatg	2040
cactacgcgc ggtatctcgc cgagcatggc gcacggcgca tcgtgctgct cagccggcgc	2100

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-22-

```

gccgcggatc aggcgacggt ggccatgctc agaaagcaac atggcaccgt gatcgtgtcg 2160
ccgcgctgcg atatcaccca toccaaccag ttgtcagcga ttgcagccga atacgggtggc 2220
gtcggcgccct cgttgatcgt gcacgcggca ggcagcgtga tctctggtac cgcaccgggg 2280
gtgacgtcgg ccgcgctcgt tgacaacttc gcggccaagg tgctcggcct ggcccagatg 2340
atcgagctgt ggcgcgtgcg cccggatgtg cgaacccctg tgtgttcttc ggtgatgggg 2400
gtgtgggggtg gacacggggt ggtcgcgtac tcggcgccca accggctgct cgacgtgatg 2460
gcgcgccagc tgcgcgccca ggcacggcac tgcgtggcgg tgaatgggg octatggcag 2520
gcccccaagg ccggcgaaac agctcgggga atcgcggatg cggttacgat cgcgcgctc 2580
gagcgtcttg gactccgcca gatggcgccc cagcaggcga tcgaggcgag cctgcacgaa 2640
ttcaactgctg acccgctagt gttgcgcgc gacgcggccc ggttcagat gttgttgac 2700
agcaggcaat tcgaacgcta cgagggtcca accgaccca acctgacgat cgtggacgcg 2760
gtgcgcaccc aattggcggc cgtgctcggg atccgcagg ccggcgaggt gaacctgcag 2820
gaatcgtctg tcgatctcgg tgtcgattcc atgctggcac tggacttgcg taaccgactc 2880
aaacgatcaa tcggcgcgac ggtgcgctg gccacgtca tgggcgacat caccgggtgat 2940
ggacttctcg cgaactcga agatgccgac gagcgctcac acaccgcaca gaaagtggac 3000
atttcgctg ac 3012

```

<210> 13

<211> 1461

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 13

```

Met Gly Pro Val Ala Val Thr Arg Ala Asp Ala Arg Gly Ala Ile Asp
1           5           10           15

```

```

Asp Val Met Ala Leu Ser Pro Leu Gln Gln Gly Leu Phe Ser Arg Ala
20           25           30

```

```

Thr Leu Val Ala Ala Glu Ser Gly Ser Glu Ala Ala Glu Ala Asp Pro
35           40           45

```

```

Tyr Val Ile Ala Met Ala Ala Asp Ala Ala Gly Pro Leu Asp Ile Ala

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-23-

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-24-

Ser Gly Arg Pro Ser Glu Leu Ser Gly Val Glu Thr Met Ile Gly Leu
 290 295 300

Phe Ile Asn Thr Val Pro Leu Arg Val Arg Leu Asp Ala Arg Ala Thr
 305 310 315 320

Val Gly Gly Gln Cys Ala Val Leu Gln Arg Gln Phe Ala Met Leu Arg
 325 330 335

Asp His Ser Tyr Leu Gly Phe Asn Glu Phe Arg Ala Ile Ala Gly Ile
 340 345 350

Gly Glu Met Phe Asp Thr Leu Leu Val Tyr Glu Asn Phe Pro Pro Gly
 355 360 365

---Glu-Val Val Gly Thr Ala-Glu Phe Val Ala Asn Gly Val Thr Phe Arg
 370 375 380

Pro Val Ala Leu Glu Ser Leu Ser His Phe Pro Val Thr Val Ala Ala
 385 390 395 400

His Arg Ser Thr Gly Glu Leu Thr Leu Leu Val Glu Val Leu Asp Gly
 405 410 415

Ala Leu Gly Thr Met Ala Pro Glu Ser Leu Gly Arg Arg Val Leu Ala
 420 425 430

Val Leu Gln Arg Leu Val Ser Arg Trp Asp Arg Pro Leu Arg Asp Val
 435 440 445

Asp Ile Leu Leu Asp Gly Glu His Asp Pro Thr Ala Pro Gly Leu Pro
 450 455 460

Asp Val Thr Thr Ser Ala Pro Ala Val His Thr Arg Phe Ala Glu Ile
 465 470 475 480

Ala Ala Ala Gln Pro Asp Ser Val Ala Val Ser Trp Ala Asp Gly Gln
 485 490 495

Leu Thr Tyr Arg Glu Leu Asp Ala Leu Ala Asp Arg Leu Ala Thr Gly
 500 505 510

Leu Arg Arg Ala Asp Val Ser Arg Glu Thr Pro Val Ala Val Ala Leu
 515 520 525

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-25-

Ser Arg Gly Pro Arg Tyr Val Ala Ala Met Leu Ala Val Leu Lys Ala
 530 535 540

Gly Gly Met Ile Val Pro Leu Asp Pro Ala Met Pro Gly Glu Arg Val
 545 550 555 560

Ala Glu Ile Leu Arg Gln Thr Ser Ala Pro Val Val Ile Asp Glu Gly
 565 570 575

Val Phe Ala Ala Ser Val Gly Ala Asp Ile Leu Glu Glu Asp Arg Ala
 580 585 590

Ile Thr Val Pro Val Asp Gln Ala Ala Tyr Val Ile Phe Thr Ser Gly
 595 600 605

Thr Thr Gly Thr Pro Lys Gly Val Ile Gly Thr His Arg Ala Leu Ser
 610 615 620

Ala Tyr Ala Asp Asp His Ile Glu Arg Val Leu Arg Pro Ala Ala Gln
 625 630 635 640

Arg Leu Gly Arg Pro Leu Arg Ile Ala His Ala Trp Ser Phe Thr Phe
 645 650 655

Asp Ala Ala Trp Gln Pro Leu Val Ala Leu Leu Asp Gly His Ala Val
 660 665 670

His Ile Val Asp Asp His Arg Gln Arg Asp Ala Gly Ala Leu Val Glu
 675 680 685

Ala Ile Asp Arg Phe Gly Leu Asp Met Ile Asp Thr Thr Pro Ser Met
 690 695 700

Phe Ala Gln Leu His Asn Ala Gly Leu Leu Asp Arg Ala Pro Leu Ala
 705 710 715 720

Val Leu Ala Leu Gly Gly Glu Ala Leu Gly Ala Ala Thr Trp Arg Met
 725 730 735

Ile Gln Gln Asn Cys Ala Arg Thr Ala Met Thr Ala Phe Asn Cys Tyr
 740 745 750

Gly Pro Thr Glu Thr Thr Val Glu Ala Val Val Ala Ala Val Ala Glu

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-26-

755 760 765
 His Ala Arg Pro Val Ile Gly Arg Pro Thr Cys Thr Thr Arg Ala Tyr
 770 775 780
 Val Met Asp Ser Trp Leu Arg Pro Val Pro Asp Gly Val Ala Gly Glu
 785 790 795 800
 Leu Tyr Leu Ala Gly Ala Gln Leu Thr Arg Gly Tyr Leu Gly Arg Pro
 805 810 815
 Ala Glu Thr Ala Ala Arg Phe Val Ala Glu Pro Asn Gly Arg Gly Ser
 820 825 830
 Arg Met Tyr Arg Thr Gly Asp Val Val Arg Arg Leu Pro Asp Gly Gly
 835 840 845
 Leu Glu Phe Leu Gly Arg Ser Asp Asp Gln Val Lys Ile Arg Gly Phe
 850 855 860
 Arg Val Glu Pro Gly Glu Ile Ala Ala Val Leu Asn Gly His His Ala
 865 870 875 880
 Val His Gly Cys His Val Thr Ala Arg Gly His Ala Ser Gly Pro Arg
 885 890 895
 Leu Thr Ala Tyr Val Ala Gly Gly Pro Gln Pro Pro Pro Val Ala Glu
 900 905 910
 Leu Arg Ala Met Leu Leu Glu Arg Leu Pro Arg Tyr Leu Val Pro His
 915 920 925
 His Ile Val Val Leu Asp Glu Leu Pro Leu Thr Pro His Gly Lys Ile
 930 935 940
 Asp Glu Asn Ala Leu Ala Ala Ile Asn Val Thr Glu Gly Pro Ala Thr
 945 950 955 960
 Pro Pro Gln Thr Pro Thr Glu Leu Val Leu Ala Glu Ala Phe Ala Asp
 965 970 975
 Val Met Glu Thr Ser Asn Val Asp Val Thr Ala Gly Phe Leu Gln Met
 980 985 990

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-27-

Gly Leu Asp Ser Ile Val Ala Leu Ser Val Val Gln Ala Ala Arg Arg
 995 1000 1005
 Arg Gly Ile Ala Leu Arg Ala Arg Leu Met Val Glu Cys Asp Thr
 1010 1015 1020
 Ile Arg Glu Leu Ala Ala Ala Ile Asp Ser Asp Ala Ala Trp Gln
 1025 1030 1035
 Ala Pro Ala Asn Asp Ala Gly Glu Pro Ile Pro Val Leu Pro Asn
 1040 1045 1050
 Thr His Trp Leu Tyr Glu Tyr Gly Asp Pro Arg Arg Leu Ala Gln
 1055 1060 1065
 Thr Glu Val Ile Arg Leu Pro Asp Arg Ile Thr Arg Glu Arg Leu
 1070 1075 1080
 Asp Ala Val Leu Ala Ala Val Val Asp Gly His Glu Val Leu Arg
 1085 1090 1095
 Cys Arg Phe Asp Arg Asp Ala Met Ala Leu Val Ala Gln Pro Lys
 1100 1105 1110
 Thr Asp Ile Leu Ser Glu Val Trp Val Ser Gly Glu Leu Val Thr
 1115 1120 1125
 Ala Val Ala Glu Gln Thr Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Asp Pro
 1130 1135 1140
 Gln Ala Gly Arg Leu Leu Ser Ala Val Trp Leu Arg Glu Pro Asp
 1145 1150 1155
 Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Thr Ala His Val Leu Ala Met Asp
 1160 1165 1170
 Pro Ala Ser Trp Arg Ile Val Leu Gly Glu Leu Asp Ala Gly Leu
 1175 1180 1185
 His Ala Leu Ala Ala Gly Arg Ala Pro Ser Pro Ala Arg Glu Asn
 1190 1195 1200
 Thr Ser Tyr Arg Gln Trp Ser Arg Leu Leu Ala Gln Arg Ala Lys
 1205 1210 1215

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-28-

Ala Leu Asp Ser Val Asp Phe Trp Val Ala Glu Leu Glu Gly Ala
1220 1225 1230

Asp Pro Pro Leu Gly Ala Arg Arg Val Ala Pro Gln Thr Asp Arg
1235 1240 1245

Val Gly Glu Leu Ala Ile Thr Met Ser Ile Ser Asp Ala Asp Leu
1250 1255 1260

Thr Ala Arg Leu Leu Ser Thr Gly Arg Ser Met Thr Asp Leu Leu
1265 1270 1275

Ala Thr Ala Ala Ala Arg Met Val Thr Ala Trp Arg Arg Gln Arg
1280 1285 1290

Gly Gln Gln Thr Pro Ala Pro Leu Leu Ala Leu Glu Thr His Gly
1295 1300 1305

Arg Ala Asp Val His Val Asp Lys Thr Ala Asp Thr Ser Asp Thr
1310 1315 1320

Val Gly Leu Leu Ser Ala Ile Tyr Pro Leu Arg Ile His Cys Asp
1325 1330 1335

Gly Ala Thr Asp Phe Ala Arg Ile Pro Gly Ser Gly Ile Asp Tyr
1340 1345 1350

Gly Leu Leu Arg Tyr Leu Arg Ala Asp Thr Ala Glu Arg Leu Arg
1355 1360 1365

Ala His Arg Glu Pro Gln Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Gly Ser Leu
1370 1375 1380

His Val Gly Val Gly Asp Leu Ala Val Asp Arg Ala Leu Leu Ala
1385 1390 1395

Asp Val Gly Gln Leu Pro Glu Pro Glu Gln Pro Val Arg His Glu
1400 1405 1410

Leu Thr Val Leu Ala Ala Leu Leu Gly Pro Ala Asp Ala Pro Val
1415 1420 1425

Leu Ala Thr Arg Trp Arg Thr Leu Pro Asp Ile Leu Ser Ala Asp

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-29-

1430 1435 1440

Asp Val Ala Thr Leu Gln Ser Leu Trp Gln Gly Ala Leu Ala Glu
 1445 1450 1455

Ile Thr Ala
 1460

<210> 14

<211> 4383

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 14

atgggaccag tggcgtgac gcgagccgac gcgcggggcg ccatcgacga tgtgatggcg 60

ctcagcccat tgcaacaggg actgttttct agggcgacac tggtcgccgc ggagtcgggc 120

tctgaggcgc cagaggccga ccgtatgtg atcgcgatgg cggccgacgc ggcgggccgc 180

ctcgacatcg cttgtcttcg cgactgcgct gccgcgatgc tgaccgggca ccccaacctg 240

cgggcgagct tctacacgg gaacctgagc cggcccgctc aggtataacc atccagtgcg 300

gaggtgcttt ggcgtcacgt gcgcgccac ccagtgagg tcggggcgct ggcagccgaa 360

gagcgccggc gccgcttcga cgtcgccgc ggaccactca tccggttct gtcctcgaa 420

ctaccggacg aatgttgga tctggtcacc gtcgcgacc acatcgtaac cgacggatgg 480

tcgtagccgc tgttcgtctc cgagctgctc gccctgtatc gggtggtgg tcacgtcgcc 540

gcgttgccgc cagcgccgc gccgtatcgc gactacatcg gctggctggc cggccgcgat 600

cagacggcta gcccgcaat gtgggcggac cactcaatg gcctggaagg ccgactctg 660

ttatcgccgc cactcgccga cactcctgtg cagccgggta ttccgggacg caccgaagtg 720

cgcttgacc gtgaagccac cggggagctg gccgatgcc cccgcacccg tggcgtaacg 780

atcagcacac ttgttcaaat ggcttgggct accacgcttt cagcattcac cggtcgtggc 840

gatgtgacgt tcgggtgac ggtgtccggc aggccagcg aactgtccgg cgtggaaacg 900

atgatcgcc tggtcatcaa tacggtgcca ctgcgggtcc gctggagcg ccgcgctacc 960

gtcgggggc aatgcgctgt cctacaacgt caattcgcca tgttcggcga ccacagctat 1020

ctcggttcca acgagtttcg tgccatcgcc ggtatcggt agatgttcca caccctactg 1080

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-30-

```

gtgtatgaga acttcccgcc cggcgaggtg gtgggcaccg cggagttcgt cgcaaacggg 1140
gtgacgttcc gtccggtagc gctagagagt ttgtcgactt ttccggtgac cgtcgccgcg 1200
caccgcagca cgggtgagct cactgtgcta gtggaggtgc tcgacggtgc gctgggcacg 1260
atggcgcccg aaagctctcg caggcggtg ctggtctgtg tacagcgtt ggtcagcccg 1320
tgggacgtgc cgtcgcgca cgtcgacatt ctgctggacg gcgagcaca tccgacccga 1380
cccgccctgc cggatgtgac gacgtcgca ccccggtgc ataccgggt cgcgaaatc 1440
gtcgccgcac agcctgactc ggtggcggtc agttggcggt atggtcagct gacgtaccgg 1500
gagctggatg cattggccga cggctggcc actggctgc gccgcgcga cgtgagtcgc 1560
gagaccccg tggcgtgc gctgtccgt ggtccgct acgtggcgc catgctggcg 1620
gtcctcaagg cgggtggcat gatcgtccg ctgaccccg cgtgcccgg tgagcgtgct 1680
gccgagatct tgcgcagac atcgggtccg gtgtcatcg atgagggcgt gttccgct 1740
tcgggtggcg ctgacalact cggaggagac cgtgccatca cgtgcccgt ggaccaggcg 1800
gcctacgtga ttttcaactc cggcaccacc ggtaccgga aagggtgcat cggcaccgat 1860
cggcgctgt cggcctacgc cgcgaccac atcgagcgc tgttgccgc gccgcccag 1920
cggctcgggc gcccgctgc aatcgcgcat gctcgtcgt tcacctcga cgcgctgg 1980
cagcgttgg tcgactgct tgacggccac gcggtgcaca ttgtcgaca ccactgtoag 2040
cgggacgcag gggcgctggt cgaagcgatc gaccgattcg gtctggacat gattgacac 2100
acgcgtcga tgttcgcca gctgcacaac gctggactgc tcgacgggc gccgttggcg 2160
gtgcttgcc tggcgcgca agccttgggc gccgcgacgt ggcggatgat ccagcagaac 2220
tgccgcgca cggccatgac ggccttcaac tgotacgggc ctaccgagac caggtcgaa 2280
gccgtggtgc cggcgttgc tgagcatgc cgcacggtca tggacgtcc gacctgcacc 2340
accgcgcct acgtcatgga ctctggctg cggccggtgc ccgatggcgt cgcggcgag 2400
ctgtatctgg cggcgccca gttgacccgc ggttacctcg gcccccgcg cgcgactgoc 2460
gcgcgctttg tcgctgagcc aaacgggcgc ggtagccgaa tgtaccgac cggagatgtg 2520
gtgcgcgcgc tgcgcgacgg tggactggag ttctcgggc gcagcgatga ccaggtgaag 2580
atcccggtt tcgcgtcga gccgggtgag attgcgcgc tgetcaacgg ccacatgctg 2640
gtgcacggtt gccatgtgac ggcgcgcgc catgccagt gcccccggct gacggcgat 2700
gtggcaggcg gaccacaacc gccacgggtg gccgaattgc gggcgatgct gctagagcgg 2760
ttgcgcgctt atctagtccc gcacatata gtcgtctcgc acgagttacc gctgactcca 2820

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-31-

caccggcaaga tcgacgaaaa cgcctttggcg gcaatcaatg tcaccgaagg accggcaact 2880
 ccgcgcgaga caccgacga gctgggtgctg gccgaggcgt tcgccgatgt catggaaacc 2940
 tcgaacgtcg atgtcaccgc gggctttttg cagatgggtc tagacagcat cgtggcgctg 3000
 tcggtgggtc aggcgcgcgc cgtcgtggg attgcgttc gggccaggct gatgggtggg 3060
 tcgcacacca tcggtgaact cgcgggggc attgaactcg atgccgatg gcaggcaccc 3120
 gccaacgatg ccgcgcagcc gatcccggtg ctacccaaca ctcatlgtg ctacgagtac 3180
 ggcgaccgcg gccggctggc acaaacggg gtcatcaggt tgcccgaacc gatcaccgc 3240
 gaacgcctgg atgcggtgtt ggccgcggc gtcgaacgac acgaggtgtt gcggtgcccg 3300
 ttgcaccggg atgcgatggc ccttgctgca caaccgaaaa cggacattct cagcgaggtt 3360
 tgggtcagcg gtgaactggc caccgcggcg gccgagcaga ctcttggcgc gctggcgagt 3420
 ctgcaccccc aggcgcggcg actgctctcg ccggtgtggc tgccggaacc cgacggggcc 3480
 ggtgttctgg tgcgacccgc ccattgtctg gcgatggacc cagcctcctg gcgattgtg 3540
 ctgggtgaac tcgacgcccg cctgcacgcg ctggcgcccg ggcgcgcgc cagcccagcg 3600
 cgcgagaaca ccagctaccg gcagtggtcg cggctgctcg cgcagcggc taagcgctg 3660
 gatagcgttg atttctgggt cgcgaactc gagggcgccg atccgccgtt gggtgcccg 3720
 agggtgccgc cgcagaccga ccgggttggg gagctagcga tcaccatgic gatctccgac 3780
 gccgatctga ccgcgcggct gctttcgacg ggacgggtcga tgaccgatct gctggtacc 3840
 gccgctgcgc ggatggtgac cgcctggcgc cggcaacgcg gtcaacaaac accagcaccc 3900
 ctgttggcgt tggagacgca tggccgcgcg gacgtccacg tcgataagac tgccgacacc 3960
 agcgacacgg tcgggtgctc cagcgcgacg taccgctgc gcaccactg cgacggcgcg 4020
 accgacttcg ccgggatacc cggcagcggc atcgattacg gcctgctgct gaactatctg 4080
 gccgataccg ccgagcgact acgcgcccac cgcgaacccc agctgctgct gaactatctg 4140
 ggtagcctgc acgtcggggg gggagatctg gcggtcgacc gcgcactact ggcgtatgtg 4200
 gggcaactgc ctgaacccga acagccggcg cgcacgaaac tgacgggtgct ggcggcgctc 4260
 ctccggcccg ccgacgctcc cgtgctagcc acgcggtggc gcaegctgac cgacatcctg 4320
 tcgcgccgac acgtcgccac gctgcaatca ctgtggcagg gcgcgctgga ggagataaca 4380
 gca 4383

<210> 15

<211> 118

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-32-

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 15

Met Leu Thr Cys Glu Met Arg Glu Ser Ala Leu Ala Arg Leu Gly Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Asp Pro Thr Arg Cys Arg Ile Leu Val Ala Leu Leu Asp
 20 25 30

Gly Val Cys Tyr Pro Gly Gln Leu Ala Ala His Leu Gly Leu Thr Arg
 35 40 45

Ser Asn Val Ser Asn His Leu Ser Cys Leu Arg Gly Cys Gly Leu Val
 50 55 60

Val Ala Thr Tyr Glu Gly Arg Gln Val Arg Tyr Ala Leu Ala Asp Ser
 65 70 75 80

His Leu Ala Arg Ala Leu Gly Glu Leu Val Gln Val Val Leu Ala Val
 85 90 95

Asp Thr Asp Gln Pro Cys Val Ala Glu Arg Ala Ala Ser Gly Glu Ala
 100 105 110

Val Glu Met Thr Gly Ser
 115

<210> 16

<211> 354

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 16

atgctgacgt gtgagatgcg ggaatcggcc ctggctcgac tcggccgggc tctggctgat 60
 ccgacgggt gccgattct ggtggcgttg ctggatggcg ttgctatcc cggccagcta 120
 gctgcgcacc tcgggttgac ccgatcgaat gtgtccaacc atctgtcgtg ttgctggggc 180
 tgcgggctgg tagtcgcaac ctatgagggc cggcagggtc ggtatgcgct ggcgcacagt 240

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-33-

cacctggcgc gagccttggg caggttggtc caggtcgttc tcgcggtgga taccgaccaa 300
 cctgtgtcgc ccgagcgcgc cscgtccggg gagcggtcgc agatgacagg tagc 354

<210> 17

<211> 159

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 17

Met Asn Asn Leu Ala Leu Trp Ser Arg Pro Val Trp Asp Val Glu Pro
 1 5 10 15

Trp Asp Arg Trp Leu Arg Asp Phe Phe Gly Pro Ala Ala Thr Thr Asp
 20 25 30

Trp Tyr Arg Pro Val Ala Gly Asp Phe Thr Pro Ala Ala Glu Ile Val
 35 40 45

Lys Asp Gly Asp Asp Ala Val Val Arg Leu Glu Leu Pro Gly Ile Asp
 50 55 60

Val Asp Lys Asp Val Asn Val Glu Leu Asp Pro Gly Gln Pro Val Ser
 65 70 75 80

Arg Leu Val Ile Arg Gly Glu His Arg Asp Glu His Thr Gln Asp Ala
 85 90 95

Gly Asp Lys Asp Gly Arg Thr Leu Arg Glu Ile Arg Tyr Gly Ser Phe
 100 105 110

Arg Arg Ser Phe Arg Leu Pro Ala His Val Thr Ser Glu Ala Ile Ala
 115 120 125

Ala Ser Tyr Asp Ala Gly Val Leu Thr Val Arg Val Ala Gly Ala Tyr
 130 135 140

Lys Ala Pro Ala Glu Thr Gln Ala Gln Arg Ile Ala Ile Thr Lys
 145 150 155

<210> 18

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-34-

<211> 477

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

```

<400> 18
atgaacaatc tcgcattgtg gtgcgctcgg gtgtgggacg ttgagccctg ggaccgctgg      60
ctacgtgact tcttcggccc tgcgcgacg acggactggg accgcccggg cgcgggagac      120
ttcacgcccgg cgcgggagat cgtcaaggat ggcgacgacg cgggtggtccg tttggaactg      180
cccgccattg acgtcgacaa ggacgtcaac gtcgagcttg accctggcca gccggtgagc      240
cgcttggtga tccgcggcga acaccgacgac gacacacgc aagacgcccg agacaaagac      300
ggcgcgaccc tgcgtgagat ccgctacgga tcattccgcc gctcgttccg gctgcccgcg      360
caegtaccca gcgaggccat cgcgggttcc tatgacgccg gtgtgctgac cgtccggggt      420
ggcgggcgct acaaggcccc agccgaaact caggcgacgc gcacgcgat cagcaag      477

```

<210> 19

<211> 235

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 19

```

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

```

```

Gly Met Gly Arg Glu Tyr Val Ala Gln Leu Leu Gly Arg Lys Val Ala
20           25           30

```

```

Lys Val Tyr Ala Ala Thr Arg Asn Pro Leu Ala Ile Asp Val Ser Asp
35           40           45

```

```

Pro Arg Val Ile Pro Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp Ala Val Ser Val
50           55           60

```

```

Ala Glu Ala Ala Asp Leu Ala Thr Asp Val Gly Ile Leu Ile Asn Asn
65           70           75           80

```


WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-35-

Ala Gly Ile Ser Arg Ala Ser Ser Val Leu Asp Lys Asp Thr Ser Ala
85 90 95

Leu Arg Gly Glu Leu Glu Thr Asn Leu Phe Gly Pro Leu Ala Leu Ala
100 105 110

Ser Ala Phe Ala Asp Arg Ile Ala Glu Arg Ser Gly Ala Ile Val Asn
115 120 125

Val Ser Ser Val Leu Ala Trp Leu Pro Leu Gly Met Ser Tyr Gly Val
130 135 140

Ser Lys Ala Ala Met Trp Ser Ala Thr Glu Ser Met Arg Ile Glu Leu
145 150 155 160

Ala Pro Arg Gly Val Gln Val Val Gly Val Tyr Val Gly Leu Val Asp
165 170 175

Thr Asp Met Gly Arg Phe Ala Asp Ala Pro Lys Ser Asp Pro Ala Asp
180 185 190

Val Val Arg Gln Val Leu Asp Gly Ile Glu Ala Gly Lys Glu Asp Val
195 200 205

Leu Ala Asp Glu Met Ser Arg Gln Val Arg Ala Ser Leu Asn Val Pro
210 215 220

Ala Arg Glu Arg Ile Ala Arg Leu Met Gly Asn
225 230 235

<210> 20

<211> 705

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 20
atgacttcac tagccgagcg gaccgtgctc gtcaccggcg ccaaccgagg catgggcccgc 60
gaatacgtcg ctacgtttct cggtcgcaaa gtggcaaaagg tctatgccgc taccgcgaac 120
ccgctggcaa tcgacgttag cgatccgcgc gtgattccgc tccaactcga cgtcaccgac 180
gcggtgtcgg tcgccgaggg agccgactta gcaaccgatg tcggcattct gatcaacaat 240

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-36-

```

gccggcatct cccgggcgtc ctccgtgctc gacaaggaca catccgcgt tcgcggcgag 300
ctggagacga acctgttcgg accgcctcgc ctggcctccg cgttcgcga ccgcacgcgc 360
gagagatccg gtgccatcgt caacgtttcc tcggtactcg cctggcttcc ccttgccatg 420
agctatggag tgtccaaggc ggcgatgtgg agcgcgacgg agtcgatcgc tatcgagctg 480
gcgcgcgcgc gtgtgcaggt ggtggcgctc taactggggc tggtcgacac cgacatgggt 540
cgattccgcg acgcgcgcaa gtccgatact gccgatgtgg tcgcgcaggt gctcgacgga 600
atagaggctg gcaaggagga cgtgctggcc gacgagatga gccgtcaggt gcgcgcgctc 660
ctgaatgtcc ctgcgcggga acgtatcgcg cggttgatgg gtaac 705

```

<210> 21

<211> 386

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 21

```

Met Thr Ala Gly Ser Asp Leu Asp Asp Phe Arg Gly Leu Leu Ala Lys
1          5          10          15

Ala Phe Asp Glu Arg Val Val Ala Trp Thr Ala Glu Ala Glu Ala Gln
20          25          30

Glu Arg Phe Pro Arg Gln Leu Ile Glu His Leu Gly Val Cys Gly Val
35          40          45

Phe Asp Ala Lys Trp Ala Thr Asp Ala Arg Pro Asp Val Gly Lys Leu
50          55          60

Val Glu Leu Ala Phe Ala Leu Gly Gln Leu Ala Ser Ala Gly Ile Gly
65          70          75          80

Val Gly Val Ser Leu His Asp Ser Ala Ile Ala Ile Leu Arg Arg Phe
85          90          95

Gly Lys Ser Asp Tyr Leu Arg Asp Ile Cys Asp Gln Ala Ile Arg Gly
100         105         110

Ala Ala Val Leu Cys Ile Gly Ala Ser Glu Glu Ser Gly Gly Ser Asp

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-37-

```

115              120              125

Leu Gln Ile Val Glu Thr Glu Ile Arg Ser Arg Asp Gly Gly Phe Glu
130              135              140

Val Arg Gly Val Lys Lys Phe Val Ser Leu Ser Pro Ile Ala Asp His
145              150              155              160

Ile Met Val Val Ala Arg Ser Val Asp His Asp Pro Thr Ser Arg His
165              170              175

Gly Asn Val Ala Val Val Ala Val Pro Ala Ala Gln Val Ser Val Gln
180              185              190

Thr Pro Tyr Arg Lys Val Gly Ala Gly Pro Leu Asp Thr Ala Ala Val
195              200              205

Cys Ile Asp Thr Trp Val Pro Ala Asp Ala Leu Val Ala Arg Ala Gly
210              215              220

Thr Gly Leu Ala Ala Ile Ser Trp Gly Leu Ala His Glu Arg Met Ser
225              230              235              240

Ile Ala Gly Gln Ile Ala Ala Ser Cys Gln Arg Ala Ile Gly Ile Thr
245              250              255

Leu Ala Arg Met Met Ser Arg Arg Gln Phe Gly Gln Thr Leu Phe Glu
260              265              270

His Gln Ala Leu Arg Leu Arg Met Ala Asp Leu Gln Ala Arg Val Asp
275              280              285

Leu Leu Arg Tyr Ala Leu His Gly Ile Ala Glu Gln Gly Arg Leu Glu
290              295              300

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

Glu Val Ile Ser Glu Cys Met His Ile Phe Gly Gly Ala Gly Tyr Leu
325              330              335

Val Asp Glu Thr Thr Leu Gly Lys Trp Trp Arg Asp Met Lys Leu Ala
340              345              350

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-38-

Arg Val Gly Gly Gly Thr Asp Glu Val Leu Trp Glu Leu Val Ala Ala
 355 360 365

Gly Met Thr Pro Asp His Asp Gly Tyr Ala Ala Val Val Gly Ala Ser
 370 375 380

Lys Ala
 385

<210> 22

<211> 1158

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 22
 atgacggcgc gctccgacct cgacgacttc cgcggtttgc tcgccaaagc gttcgaacgag 60
 cgggtggtgg catggaccgc agaagcggaa gcgcaggaac gttttccgcg ccagttgatc 120
 gaacacctgg gtgtctgcgg cgtattcgat gcgaagtggg cgaccgacgc ccgtcccgac 180
 gtccgtaaac tcgtcgaact cgccttccgc ttgggccagc tggcctctgc cggcatcggt 240
 gtgggtgca gcttgcata ctcggcgatc gcgattttgc gccggtttgg taagtccgac 300
 tacttgcggg atatctgcga tcaggcgatc cgtggcgcgc cgggtctgtg catcggagcc 360
 tcggaggagt ccggcggatc cgacctgcag atcgtcgaaa ccgagatacg gtcccgtgac 420
 ggtggtttcg aggtccgcgc cgtcaagaaa ttctgtctgc tgtctccgat cgcgcaccac 480
 atcatggtgg tggcccgacg cgtcgaccac gatccgacca gtaggcacgg caatgtcgcg 540
 gtctgtggcg tgcggccgc acaagtcagc gtgcagacc cctaccgcaa ggtcgggtcg 600
 ggaccgctgg ataccgcgc ggtctgcata gacacctggg taaccggcga tgcactggtt 660
 gcgcgggcgc gcaaggggct ggcagccatc agttggggac tggctcatga gcggatgtcg 720
 atcgccgggc agatcgagc gtcgtgtcaa cgggcgcatc gaataccct ggcgcgcatg 780
 atgagtcgac gtcagttcgg tcagacgctg ttccgaacac aggcgctgcg gctgcgtatg 840
 gcggacctgc aggcgcgtgt cgtctgtctg cggtaacgcg tgcacggcat cgtgaaacag 900
 gggagactgg aactgcgcac ggcggcagcg gtcaaatga ccgccgcccg gctcgggtgag 960
 gaagtcatct ccgaatgcat gcacatcttc ggtggggcgg gttatcttgt cgacgaaacg 1020
 acgcttggca aatgggtggc ggacatgaag ctgcgccggg tcggcggcgg caccgacgag 1080

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-39-

gtgctgtggg aattggtggc tgccggcatg acgcccgatc acgacgggta cgcagccgtg 1140
 gtccggagctt ccaaagcg 1158

<210> 23

<211> 306

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 23

Met Val Leu Arg Pro Ile Thr Gly Ala Ile Pro Pro Asp Gly Pro Trp
 1 5 10 15

Gly Ile Trp Ala Ser Arg Arg Ile Ile Ala Gly Leu Met Gly Thr Phe
 20 25 30

Gly Pro Ser Leu Ala Gly Thr Arg Val Glu Gln Val Asn Ser Val Leu
 35 40 45

Pro Asp Gly Arg Arg Val Val Gly Glu Trp Val Tyr Gly Pro His Asn
 50 55 60

Asn Ala Ile Asn Ala Gly Pro Gly Gly Gly Ala Ile Tyr Tyr Val His
 65 70 75 80

Gly Ser Gly Tyr Thr Met Cys Ser Pro Arg Thr His Arg Arg Leu Thr
 85 90 95

Ser Trp Leu Ser Ser Leu Thr Gly Leu Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr
 100 105 110

Arg Leu Ala Pro Arg Tyr Arg Phe Pro Thr Ala Ala Thr Asp Val Arg
 115 120 125

Ala Ala Trp Asp Trp Leu Ala His Val Cys Gly Leu Ala Ala Glu His
 130 135 140

Met Val Ile Ala Ala Asp Ser Ala Gly Gly His Leu Thr Val Asp Met
 145 150 155 160

Leu Leu Gln Pro Glu Val Ala Ala Arg Pro Pro Ala Ala Val Val Leu

PCT/GB02/02845

[illegible]

Asp Leu
305

```
<210> 24
<211> 918
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis
```

atggtgttgc	cgagcgcgatt	ccgcacagagc	ggcgctgggg	gatatggggc	60
tgcgcgcgca	teatcgcggg	actcatgggc	acgtctgggc	cctcgtctgc	120
gggcaaccga	tcacttcgtt	tctgcgggac	ggacgcgggg	tctgcggcga	180
atgggtgtat	ggagcaacga	acaactcgtt	caatcgcgga	cccgctggcg	240
ggcgccatcta	ttacgtacac				

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-41-

```

ggcagcggtt acacgatgtg ttgcgccga acccaccgga ggctgacatc ctggctgtcg 300
tcattgaccg ggctaccggt attcagtgtc gattaccgac tggcgccgag ctaccgtttc 360
ccgaccgcgg ccaccgacgt gcgggcagcc tgggattggt tagcgacagt atgcgggetta 420
gccgcggagc acatggtgat cgcgcgggat tccgcgggtg gccatctgac cgtcgacatg 480
ctgctgcaac cggaggtgac cgcgcgacct ccggcgccgg tgggtgtgtt ttgcgcgtg 540
atcgacctca ccttcgggtt ggggcacagt cgtgagctgc agcgcccca tcctgtctgt 600
cgcgtgacc gtgcggcccg gtcggttgcc ctgtactaca ccggagtoga tcccgccac 660
caaccggttg cgtcgatgtt tgcggcgagg ccaccgctgc caccgacgt gatccagtg 720
ggtggagccg agatactoga ggcgatgag agacaactcg atgcgacat ccgcgtgac 780
ggcgcatat gcgagttgca agtgtggcct gatcagatgc atgtgttcca ggccctgccg 840
cggatgacgc ccgaagcggc caaagccatg acctatgttg ccagttcat ccgcagtaca 900
acagcacgtg gagacctc 918

```

<210> 25

<211> 485

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 25

```

Met Asn Val Val Asp Ile Ser Arg Trp Gln Phe Gly Ile Thr Thr Val
1      5      10      15

```

```

Tyr His Phe Ile Phe Val Pro Leu Thr Ile Gly Leu Ala Pro Leu Ile
20      25      30

```

```

Ala Val Met Gln Thr Leu Trp Val Val Thr Asp Asn Pro Ala Trp Tyr
35      40      45

```

```

Arg Leu Thr Lys Phe Phe Gly Lys Leu Phe Leu Ile Asn Phe Ala Ile
50      55      60

```

```

Gly Val Ala Thr Gly Ile Val Gln Glu Phe Gln Phe Gly Met Asn Trp
65      70      75      80

```

```

Ser Glu Tyr Ser Arg Phe Val Gly Asp Val Phe Gly Ala Pro Leu Ala

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-42-

85	90	95
Met Glu Gly Leu Ala Ala Phe Phe Phe Glu Ser Thr Phe Ile Gly Leu		
100	105	110
Trp Ile Phe Gly Trp Asn Arg Leu Pro Arg Leu Val His Leu Ala Cys		
115	120	125
Ile Trp Ile Val Ala Ile Ala Val Asn Val Ser Ala Phe Phe Ile Ile		
130	135	140
Ala Ala Asn Ser Phe Met Gln His Pro Val Gly Ala His Tyr Asn Pro		
145	150	155
Thr Thr Gly Arg Ala Glu Leu Ser Ser Ile Val Val Leu Leu Thr Asn		
165	170	175
Asn Thr Ala Gln Ala Ala Phe Thr His Thr Val Ser Gly Ala Leu Leu		
180	185	190
Thr Ala Gly Thr Phe Val Ala Ala Val Ser Ala Trp Trp Leu Val Arg		
195	200	205
Ser Ser Thr Thr His Ala Asp Ser Asp Thr Gln Ala Met Tyr Arg Pro		
210	215	220
Ala Thr Ile Leu Gly Cys Trp Val Ala Leu Ala Ala Thr Ala Gly Leu		
225	230	235
Leu Phe Thr Gly Asp His Gln Gly Lys Leu Met Phe Gln Gln Gln Pro		
245	250	255
Met Lys Met Ala Ser Ala Glu Ser Leu Cys Asp Thr Gln Thr Asp Pro		
260	265	270
Asn Phe Ser Val Leu Thr Val Gly Arg Gln Asn Asn Cys Asp Ser Leu		
275	280	285
Thr Arg Val Ile Glu Val Pro Tyr Val Leu Pro Phe Leu Ala Glu Gly		
290	295	300
Arg Ile Ser Gly Val Thr Leu Gln Gly Ile Arg Asp Leu Gln Gln Glu		
305	310	315
		320

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-43-

Tyr Gln Gln Arg Phe Gly Pro Asn Asp Tyr Arg Pro Asn Leu Phe Val
 325 330 335

Thr Tyr Trp Ser Phe Arg Met Met Ile Gly Leu Met Ala Ile Pro Val
 340 345 350

Leu Phe Ala Leu Ile Ala Leu Trp Leu Thr Arg Gly Gly Gln Ile Pro
 355 360 365

Asn Gln Arg Trp Phe Ser Trp Leu Ala Leu Leu Thr Met Pro Ala Pro
 370 375 380

Phe Leu Ala Asn Ser Ala Gly Trp Val Phe Thr Glu Met Gly Arg Gln
 385 390 395 400

Pro Trp Val Val Val Pro Asn Pro Thr Gly Asp Gln Leu Val Arg Leu
 405 410 415

Thr Val Lys Ala Gly Val Ser Asp His Ser Ala Thr Val Val Ala Thr
 420 425 430

Ser Leu Leu Met Phe Thr Leu Val Tyr Ala Val Leu Ala Val Ile Trp
 435 440 445

Cys Trp Leu Leu Lys Arg Tyr Ile Val Glu Gly Pro Leu Glu His Asp
 450 455 460

Ala Glu Pro Ala Ala His Gly Ala Pro Arg Asp Asp Glu Val Ala Pro
 465 470 475 480

Leu Ser Phe Ala Tyr
 485

<210> 26

<211> 1455

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 26

atgaatgtcg tcgacatttc gcggtggcag ttcggtatca ccaccgtcta tcaattcatt 60
 ttctgtaccgc tgaccatcgg cctggccccc ctgatgcgg toatgcaaac gctgtgggtc 120

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-44-

```

gtcaccgata accccgcttg gtatcgctc accaaattct tcggcaaat gttcotgato 180
aactttgcc tccgctggc gaccggaatc gtgcaggaaat ttcagttcgg catgaactgg 240
agcgagtact ccgattcgt cggcgatgto ttccggccco cgtcgcccat ggagggcttg 300
gcggccttct tcttcgaatc cacttcctc ggggttgga tcttcggtg gaacaggctg 360
ccccgctgg tgcctctggc ctgcatctgg atcgtcgaa tcgcggtcaa cgtgtcccg 420
ttcttcatca tcgcggaata ctcttcctg cagcatccgg tcggcgcca ctacaaccg 480
accaccgggc gtgcgagtt gacgagcatc gtcgtgctgc tgaccaaaa caccgacag 540
gcggcgttta cccacctgt cagcggtgcc ctgctgaccg ccgggacctt cgtcgcccg 600
gtgagcgctt ggtggctggt ccgttcgagc accacgacg ccgactcaga taccgaagcc 660
atgtatctgc ccgcgacct cctggggtgt tgggttgctg tggccgccc ggccgggttg 720
ttgttcacgg gcgaccacca aggcaagctg atgttcacg agcagccgat gaagatggcg 780
tcggcggaat cgttgctgga taccagaca gatccaaact tctctgtcct gacggtcgcc 840
cggcaaaaac actgcgacag cctcaccgt gtcctgaaag tgccctatgt gttgccgttc 900
ctcgccgagg gccggatcag cgggtgacg ttgcagggtg tcccgatct gcagcaggaa 960
taccagcagc gcttcggacc aaacgactac cggcccaacc tcttcgtcac ctactggtca 1020
tttcgcatga tgatcgggtt gatggcgatc ccggtgctgt tcgcactgat tgcgtctctg 1080
ctcaccctgg gcggccagat ccccaataaa cgtcggttct cctggctggc gctgctaacc 1140
atgcccgccc cgttcctggc caacagccc ggatgggtgt tcaccgagat gggcgccag 1200
ccctgggtcg tcgtccctaa ccgaccggt gatcagctgg ttcgactcac cgtcaaagca 1260
ggcgtctcgg atcactccgc caccgtggtc gccacgtctt tgcgtatgtt cacttggtc 1320
tacgggtac ttgcgtcat ctggtgctgg ctgctcaagc gttacatcgt cgaaggcccc 1380
ctggaacacg acgcggaacc ggtgcgcac ggggcacccc gcgacgacga ggtagcacca 1440
ttgtcggttg ctac 1455

```

<210> 27

<211> 301

<212> FRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 27

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-45-

Met Pro Arg Ala His Asp Asp Asn Trp Asp Leu Ala Ser Ser Val Gly
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Thr Met Val Ala Ala Gly Arg Ala Leu Ala Thr Lys Asp
 20 25 30

Pro Arg Gly Leu Ile Asn Asp Pro Phe Ala Glu Pro Leu Val Arg Ala
 35 40 45

Val Gly Leu Asp Phe Phe Thr Lys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Asp Ile
 50 55 60

Ala Thr Thr Gly Asn Leu Ser Pro Gly Arg Ala Gln Ala Met Ile Asp
 65 70 75 80

Gly Ile Ala Val Arg Thr Lys Tyr Phe Asp Asp Tyr Phe Arg Thr Ala
 85 90 95

Thr Asp Gly Gly Val Arg Gln Val Val Ile Leu Ala Ala Gly Leu Asp
 100 105 110

Ala Arg Ala Tyr Arg Leu Pro Trp Pro Ala Gly Thr Val Val Tyr Glu
 115 120 125

Ile Asp Gln Pro Gln Val Ile Asp Phe Lys Thr Thr Thr Leu Ala Gly
 130 135 140

Ile Gly Ala Lys Pro Thr Ala Ile Arg Arg Thr Val Tyr Ile Asp Leu
 145 150 155 160

Arg Ala Asp Trp Pro Ala Ala Leu Gln Ala Ala Gly Leu Asp Ser Thr
 165 170 175

Ala Pro Thr Ala Trp Leu Ala Glu Gly Met Leu Ile Tyr Leu Pro Pro
 180 185 190

Asp Pro Arg Thr Gly Cys Ser Thr Thr Ala Pro Asn Ser Val Leu Arg
 195 200 205

Ala Ala Arg Ser Leu Pro Asn Leu Ser Arg Ala Leu Trp Ile Ser Thr
 210 215 220

Gln Ala Gly Tyr Glu Lys Trp Arg Ile Arg Phe Ala Ser Thr Ala Trp
 225 230 235 240

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-46-

Thr Ser Thr Trp Arg Arg Trp Cys Ile Pro Ala Asn Ala Ala Thr Ser
 245 250 255

Ser Thr Thr Cys Ala Pro Arg Ala Gly Thr Leu Arg Ala Gln Cys Gly
 260 265 270

Pro Thr Tyr Ser Gly Ala Met Val Cys Pro Phe Pro Pro His Thr Thr
 275 280 285

Thr Ile Arg Ser Ala Lys Ser Ser Ser Ser Ala Val Val
 290 295 300

<210> 28

<211> 903

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 28

```

atgccgcgcg ctcacgacga caactgggat ctagcctcca gcgtcggggc taccgcgacc      60
atggttgctg ccggacgcgc gtggcgacc aaggatccac gaggtttgat caacgacccg      120
ttcgccgaac cgtgggtgcy cgcggtcggg ctggatttct tcaccaagtt gatcgacggc      180
gagctcgata tcgcgacgac cgggaacctt tcgccggggc gggcacaggc gatgatcgac      240
gggatagcgg tgcgcaccaa gtacttcgac gactacttcc gcactgccac ggaaggcgga      300
gtgcgacaag tgggtatcct ggcagccggg ttggacgcgc gcgcctatcg gttgccgtgg      360
ccggccggca cgtggtcta cgagatcgac caaccacagg tgatcgactt caagacaacc      420
acctggcccg gcatcggcgc caagcccacc gccattcggc gcacgggtga catcgacttg      480
cgcgcggact ggcgcggcgc actgcaagct gccggcctgg actcgacggc accgacagca      540
tggttggcgg aaggcatgct gatctacctg ccgccggato ccaggacogg ttgttcgaca      600
acagcaccga actcagtggt gcgggcagca cgatcgctac cgaacttgc ccgggcattg      660
tggtatttga cgcaggccgg gtacgagaaa tggcggatto gtttcgcaag caccgctggg      720
acatcgacat ggcgtcgtg gtgtattccg gcgaacgcag ccacgtcgtc gactacctgc      780
gcgccaaagg ctgggacgtt gagggcacag tgcggacgca cctattcagg cgcaatgggt      840
tgcccgttcc cgccccacac gacgacgata cgtcgccga aatcatcttc atcagcgggc      900

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-47-

gtt

903

<210> 29

<211> 188

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> '29

Met Ala Gly Leu Phe Thr Pro Pro Ala Ser Gly Ala Ala Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Arg Ala Ala Arg Asp Ala Ala Pro Asp Ala Arg Trp Leu Leu Ala Val
 20 25 30

Ser Asp Arg Asn Gly Ile Val Ser Thr Ser Ala Thr Thr Cys Asn Tyr
 35 40 45

Pro Pro Ala Ala Lys Asp Ser Ala Gln Asp Gly Phe Arg His Ala Leu
 50 55 60

Ala Ala Ala Ile Ala Ala Asp Ile Asp Glu Ala Leu Arg His Gly Tyr
 65 70 75 80

Gly Asp Leu Leu Glu Leu Ala Tyr Pro Leu Met Ser Trp Pro Arg Arg
 85 90 95

Gly Val Phe Gly Gly Pro Thr Pro Ala Pro Arg Gly Leu Ala Thr Arg
 100 105 110

Gln Cys Pro Pro Arg Thr Val His Val Asp Arg Val Arg Pro Asn Gly
 115 120 125

Ala Glu Arg Ala Leu Arg Ala Arg Phe Arg Pro Ile Leu Arg Pro Gln
 130 135 140

Phe Thr Leu Gly Asp Gly Ala Asn Gly Leu Pro Leu Ala Ala Cys Thr
 145 150 155 160

Lys Thr Gly Ala Tyr Val Pro His Leu Pro Tyr Ser Pro Ile Ala Val
 165 170 175

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-48-

Asp Pro Gln Pro Ser Ala Gly Gln Gln Gly Pro Ser
 180 185

<210> 30

<211> 564

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 30
 atggcgggtc tcttcacgoc cccggcttcc ggtgcgcgca cacttcagcg tgctgcgcga 60
 gatgtgcccc cggacgcgcg ctggctactc gcggtctccg accgcaacgg gatcgtcagc 120
 acttcggcga cgacgtgcaa ctaccgccc gctgcgaaag actctgcgca agacgggttt 180
 aggcacgcac tggcgcgtgc catcgtcgcg sacatcgatg aagcactccg tcacggctac 240
 ggagatctgc ttgagcttgc gtaccgctc atgagctggc cgcgcggggg cgttttttggc 300
 gggccgaccc cggcccccag tgggctcgtc acgcgacagt gcccgccccc gacagttcac 360
 gttgacccggg tgaggccaaa cggcgccgag cgtgcactga gggcgagatt ccggccgatt 420
 ctccgccttc agttcacgct gggcgacggc gctaacgggc tgcccttggc cgcgtgcacc 480
 aagacgggtg catacgtgcc gcacttgcca tactcaccca tcgcggtgga cccccaaccc 540
 agtgccggtc aacaagggcc ttcc 564

<210> -31

<211> 241

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 31

Met Ser Thr Val Leu Thr Tyr Ile Arg Ala Val Asp Ile Tyr Glu His
 1 5 10 15

Met Thr Glu Ser Leu Asp Leu Glu Phe Glu Ser Ala Tyr Arg Gly Glu
 20 25 30

Ser Val Ala Phe Gly Glu Gly Val Arg Pro Pro Trp Ser Ile Gly Glu
 35 40 45

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-49-

Pro Gln Pro Glu Leu Ala Ala Leu Ile Val Gln Gly Lys Phe Arg Gly
 50 55 60

Asp Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Glu Ala Ala Ile Ser Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Ala Glu Arg Gly His Thr Thr Val Gly Leu Asp Leu Ser Pro Ala Ala
 85 90 95

Val Glu Leu Ala Arg His Glu Ala Ala Lys Arg Gly Leu Ala Asn Ala
 100 105 110

Ser Phe Glu Val Ala Asp Ala Ser Ser Phe Thr Gly Tyr Asp Gly Arg
 115 120 125

Phe Asp Thr Ile Val Asp Ser Thr Leu Phe His Ser Met Pro Val Glu
 130 135 140

Ser Arg Glu Gly Tyr Leu Gln Ser Ile Val Arg Ala Ala Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Ala Ser Tyr Phe Val Leu Val Phe Asp Arg Ala Ala Ile Pro Glu Gly
 165 170 175

Pro Ile Asn Ala Val Thr Glu Asp Glu Leu Arg Ala Ala Val Ser Lys
 180 185 190

Tyr Trp Ile Ile Asp Glu Ile Lys Pro Ala Arg Leu Tyr Ala Arg Phe
 195 200 205

Pro Ala Gly Phe Ala Gly Met Pro Ala Leu Leu Asp Ile Arg Glu Glu
 210 215 220

Pro Asn Gly Leu Gln Ser Ile Gly Gly Trp Leu Leu Ser Ala His Leu
 225 230 235 240

Gly

<210> 32

<211> 723

<212> DNA

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-50-

<213> Mycobacterium tuberculosis

```

<400> 32
atgtcaactg tgttgacata tatcagggcc gttgatatat atgaacacat gactgaatcg 60
ctggatcttg agttcgaatc cgcctaccgc ggtgaatccg tcgccttcgg ggagggagtc 120
cgaccgccat ggagcaccgg cgaaccccag ccgagctggg ccgcccctgat cgtgcagggc 180
aagtcccgcg gcgagctcct cgacgtgggc tgcggggagg ccgcgatttc gctggcactg 240
gcggaacggg gacacaccac ggctcgactg gacctctccc ccgcccctgt agaactggct 300
cgccatgaag cagcgaagcg cggcctggcc aatgccagct tcgaggtggc cgacgccagt 360
tcgtttaccg gctatgacgg caggttcgac accatgctcg acagcagct gttccactcc 420
atgcggtcg agtccgggga gggctatctg caatcgatcg tgcgtgcggc ggcaaccggc 480
gcctcctact tcgtgttggt attcgacgg gcggcgatcc ccgagggggc gatcaatcg 540
gtcaccgagg acgagctgcg cgcggcgggt tccaagtact ggatcatcga tgagatcaag 600
cccgcgggc tgtagcgag gttccggcc ggcttcgccc gcattgccc actcctggac 660
atcgcggaag agcccaacgg gctgcagtcg atcgtggct ggctgctctc ggcccaactg 720
ggc 723

```

<210> 33

<211> 175

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33

```

Val Ser Arg Leu Leu Leu Ser Tyr Ala Val Val Glu Leu Ala Val Val
1          5          10          15

Phe Ala Leu Ala Ala Thr Ile Gly Phe Gly Trp Thr Leu Leu Val Leu
20          25          30

Leu Ala Thr Phe Val Leu Gly Phe Gly Leu Leu Ala Pro Leu Gly Gly
35          40          45

Trp Gln Leu Gly Arg Arg Leu Leu Trp Leu Arg Ser Gly Leu Ala Glu
50          55          60

```


WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-51-

Pro Arg Ser Ala Leu Ser Asp Gly Ala Leu Val Thr Val Ala Ser Val
65 70 75 80

Leu Val Leu Val Pro Gly Leu Val Thr Thr Thr Met Gly Leu Leu Leu
85 90 95

Leu Val Pro Pro Ile Arg Ala Leu Ala Arg Pro Gly Leu Thr Ala Ile
100 105 110

Ala Val Arg Gly Phe Leu Arg Asn Val Pro Leu Thr Ala Asp Ala Ala
115 120 125

Ala Asn Met Ala Gly Ala Phe Gly Glu Ser Gly Thr Asp Pro Asp Phe
130 135 140

Ile Asp Gly Glu Val Ile Asp Val Ile Asp Val Glu Pro Leu Thr Leu
145 150 155 160

Gln Pro Pro Arg Val Ala Ala Glu Pro Pro Ser Pro Gly Ser Asn
165 170 175

<210> 34

<211> 525

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

```

<400> 34
gtgtcgcggc tgctgtcag ctacgcgcgc gtcgagctcg cggctggttt cgcgcgtggcg 60
gcgacgacgc ggtttggctg gactttgctg gtggttgcctg cgacgttcgt cctcgggttc 120
ggtctgtctg cgcgcgtcgc tggctggcag ctccgcccac ggtcctctgt gttgcgatcc 180
ggcttggcgc aaccacgaag cgcactgagt gacggcgcgc tggtaacctg tgcctcggtc 240
ttggtgcttg ttctggtct ggtcaccacg acgatggggc tgttgctgct ggtgcgcgcg 300
atcggggcgc tcgctcgacc cgggctgacc gcgacgcgcg tgcgcggttt cctgcggaac 360
gtgcactga cggccgatgc ggcggccaac atggccgggg ccttcggcga gagcggcacc 420
gaccgggact ttattgatgg cgaggtcacc gacgtcatag atgtcgagcc gttgacctt 480
cagcccccctc gggtagccgc agaacctcca tcgccggggt cgaat 525

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-52-

<210> 35

<211> 130

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 35

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

Val Ala Ala Val Ala Ala Ala Cys Trp Leu Pro Gln Leu His Arg His
 20 25 30

Val Ala His Pro Asn His Pro Leu Thr Thr Ser Val Gly Ser Glu Phe
 35 40 45

Val Ile Asn Thr Asp His Gly His Leu Val Asp Asn Ser Met Pro Pro
 50 55 60

Cys Pro Glu Arg Leu Ala Thr Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Thr Pro
 65 70 75 80

Val Leu Leu Pro Asp Val Val Ala Ala Ala Pro Gly Met Thr Ala Ala
 85 90 95

Leu Thr Asp Pro Val Ala Pro Ala Ala Arg Gly Pro Pro Ala Ala Gln
 100 105 110

Gly Ser Val Arg Thr Gly Gln Asp Leu Leu Thr Arg Phe Cys Leu Ala
 115 120 125

Arg Arg
 130

<210> 36

<211> 390

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-53-

```

<400> 36
gtggtgtgga tgcgatcggc gattgtcgcg gtcgcgctgg gggtagacggt agccgccgtc 60
gcgcgtgcat gctggctccc ccagctccac cgtcatgtgg ctcacccaaa ccaccggttg 120
acgacgtccg taggtagcga attcgtcacc aacaccgacc acgggcaccc ggtggacaac 180
tcgatgccac cgtgcccgga acggtcgcg acggcggtgc tgcgcgcgtc cgcctactccg 240
gtgttactac cagacgtcgt ggcggctgcg ccggcatga cagccgcgtc taccgacccc 300
gtcgcgccgg ccgcgcgcgg tcgcccggcg gcgcagggat ccgttcgcac cggtaagac 360
ctgttgcccc ggttcgcct ggtcgtcgc 390

```

<210> 37

<211> 314

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 37

```

Val Pro Arg Thr Asp Asn Asp Ser Trp Ala Ile Thr Glu Ser Val Gly
1           5           10          15

Ala Thr Ala Leu Gly Val Ala Ala Ala Arg Ala Ala Glu Thr Glu Ser
20          25          30

Asp Asn Pro Leu Ile Asn Asp Pro Phe Ala Arg Ile Phe Val Asp Ala
35          40          45

Ala Gly Asp Gly Ile Trp Ser Met Tyr Thr Asn Arg Thr Leu Leu Ala
50          55          60

Gly Ala Thr Asp Leu Asp Pro Asp Leu Arg Ala Pro Ile Gln Gln Met
65          70          75          80

Ile Asp Phe Met Ala Ala Arg Thr Ala Phe Phe Asp Glu Tyr Phe Leu
85          90          95

Ala Thr Ala Asp Ala Gly Val Arg Gln Val Val Ile Leu Ala Ser Gly
100         105         110

Leu Asp Ser Arg Ala Trp Arg Leu Pro Trp Pro Asp Gly Thr Val Val
115         120         125

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-54-

Tyr Glu Leu Asp Gln Pro Lys Val Leu Glu Phe Lys Ser Ala Thr Leu
 130 135 140

Arg Gln His Gly Ala Gln Pro Ala Ser Gln Leu Val Asn Val Pro Ile
 145 150 155 160

Asp Leu Arg Gln Asp Trp Pro Lys Ala Leu Gln Lys Ala Gly Phe Asp
 165 170 175

Pro Ser Lys Pro Cys Ala Trp Leu Ala Glu Gly Leu Val Arg Tyr Leu
 180 185 190

Pro Ala Arg Ala Gln Asp Leu Leu Phe Glu Arg Ile Asp Ala Leu Ser
 195 200 205

Arg Pro Gly Ser Trp Leu Ala Ser Asn Val Pro Gly Ala Gly Phe Leu
 210 215 220

Asp Pro Glu Arg Met Arg Arg Gln Arg Ala Asp Met Arg Arg Met Arg
 225 230 235 240

Ala Ala Ala Ala Lys Leu Val Glu Thr Glu Ile Ser Asp Val Asp Asp
 245 250 255

Leu Trp Tyr Ala Glu Gln Arg Thr Ala Val Ala Glu Trp Leu Arg Glu
 260 265 270

Arg Gly Trp Asp Val Ser Thr Ala Thr Leu Pro Glu Leu Leu Ala Arg
 275 280 285

Tyr Gly Arg Ser Ile Pro His Ser Gly Glu Asp Ser Ile Pro Pro Asn
 290 295 300

Leu Phe Val Ser Ala Gln Arg Ala Thr Ser
 305 310

<210> 38

<211> 942

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-55-

```

<400> 38
gtgccgcgga cgcacaacga ttccctgggccc attaccgaga gcgtggggcgc caaccgactg 60
gggtgtggcgg cggcgcgtgc ggcccgagacc gagagcgaca acccattgat caacgatccg 120
ttcgcgcgga tctttgtgga cgcggccggc gacgggatat ggagcatgta caccgaatcgc 180
acgtttgctgg ccggtgcgac cgacctcgac ccggacctgc gggcgccgat acagcagatg 240
atcgatttca tggcgcgcgc gaccgcgttt ttgcacgagt atttccctgg taaccgcgac 300
gctggggtga ggcaagtagt gatccctgcc tcgggcctgg actcgcgtgc ctggcggctg 360
ccctggctcg caggcacctg ggtgtacgag ctggaccagc ccaagtgct ggaattcaaa 420
tcagccacgt tgcgccagca tggcgcgcag ccggcttcgc agctggtgaa cgttcccata 480
gaccttcgtc aggaactggc aaaggcactg cagaaagccg gatttgaccc atcgaagccg 540
tgtgcgtggt tagccgaagg gttggtgcgg tacctgcgcg ccggcggtca ggaatctgtg 600
ttcgagcgta tcgatcgct cagcaggccg ggcagttggt tggcggtcaa cgtccccggc 660
gcgggttttc tcgacctga gcgaatcga cggcagcgtg cggacatgcy ggggatggg 720
gcgcggcgag ccaagctggt cgaactgag atatcagatg tcgatgacct ctggtatgca 780
gagcagcgca ccgcggtcgc cgagtggctg cgtgaacgtg gctgggagct gtgcacggca 840
acgttgcccg agctgctggc tcggtatggc cgcagcatcc ctccacagtg cgaagactca 900
atccccccaa accttttctg atccgcgcag cgggcccacga gc 942

```

<210> 39

<211> 504

<212> FRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 39

```

Val Ser Phe Val Val Thr Val Pro Glu Ala Val Ala Ala Ala Ala Gly
1           5           10           15

```

```

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

```

```

Ala Gly Pro Thr Thr Gly Leu Ala Ala Ala Ala Ala Asp Asp Val Ser
35           40           45

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-56-

Ile Ala Val Ser Gln Leu Phe Gly Arg Tyr Gly Gln Glu Phe Gln Thr
 50 55 60

Val Ser Asn Gln Leu Ala Ala Phe His Thr Glu Phe Val Arg Thr Leu
 65 70 75 80

Asn Arg Gly Ala Ala Tyr Leu Asn Thr Glu Ser Ala Asn Gly Gly
 85 90 95

Gln Leu Phe Gly Gln Ile Glu Ala Gly Gln Arg Ala Val Ser Ala Ala
 100 105 110

Ala Ala Ala Ala Pro Gly Gly Ala Tyr Gly Gln Leu Val Ala Asn Thr
 115 120 125

Ala Thr Asn Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Ala Trp Ser Ala Asn Pro Phe
 130 135 140

Pro Phe Leu Arg Gln Ile Ile Ala Asn Gln Gln Val Tyr Trp Gln Gln
 145 150 155 160

Ile Ala Ala Ala Leu Ala Asn Ala Val Gln Asn Phe Pro Ala Leu Val
 165 170 175

Ala Asn Leu Pro Ala Ala Ile Asp Ala Ala Val Gln Gln Phe Leu Ala
 180 185 190

Phe Asn Ala Ala Tyr Tyr Ile Gln Gln Ile Ile Ser Ser Gln Ile Gly
 195 200 205

Phe Ala Gln Leu Phe Ala Thr Thr Val Gly Gln Gly Val Thr Ser Val
 210 215 220

Ile Ala Gly Trp Pro Asn Leu Ala Ala Glu Leu Gln Leu Ala Phe Gln
 225 230 235 240

Gln Leu Leu Val Gly Asp Tyr Asn Ala Ala Val Ala Asn Leu Gly Lys
 245 250 255

Ala Met Thr Asn Leu Leu Val Thr Gly Phe Asp Thr Ser Asp Val Thr
 260 265 270

Ile Gly Thr Met Gly Thr Thr Ile Ser Val Thr Ala Lys Pro Lys Leu
 275 280 285

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-57-

Ileu Gly Pro Leu Gly Asp Leu Phe Thr Ile Met Thr Ile Pro Ala Gln
 290 295 300

Glu Ala Gln Tyr Phe Thr Asn Leu Met Pro Pro Ser Ile Leu Arg Asp
 305 310 315 320

Met Ser Gln Asn Phe Thr Asn Val Leu Thr Thr Leu Ser Asn Pro Asn
 325 330 335

Ile Gln Ala Val Ala Ser Phe Asp Ile Ala Thr Thr Ala Gly Thr Leu
 340 345 350

Ser Thr Phe Phe Gly Val Pro Leu Val Leu Thr Tyr Ala Thr Leu Gly
 355 360 365

Ala Pro Phe Ala Ser Leu Asn Ala Ile Ala Thr Ser Ala Glu Thr Ile
 370 375 380

Glu Gln Ala Leu Leu Ala Gly Asn Tyr Leu Gly Ala Val Gly Ala Leu
 385 390 395 400

Ile Asp Ala Pro Ala His Ala Leu Asp Gly Phe Leu Asn Ser Ala Thr
 405 410 415

Val Leu Asp Thr Pro Ile Leu Val Pro Thr Gly Leu Pro Ser Pro Leu
 420 425 430

Pro Pro Thr Val Gly Ile Thr Leu His Leu Pro Phe Asp Gly Ile Leu
 435 440 445

Val Pro Pro His Pro Val Thr Ala Thr Ile Ser Phe Pro Gly Ala Pro
 450 455 460

Val Pro Ile Pro Gly Phe Pro Thr Thr Val Thr Val Phe Gly Thr Pro
 465 470 475 480

Phe Met Gly Met Ala Pro Leu Leu Ile Asn Tyr Ile Pro Gln Gln Leu
 485 490 495

Ala Leu Ala Ile Lys Pro Ala Ala
 500

<210> 40

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-58-

<211> 1512

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 40

```

gtgtcgttcg tggtcacagt gccggaggcc gtggcggctg cggcggggga ttggcgggcc 60
atcggtctga cgcttcggga agcgacgcgt gcggcggcgg gcccacgac cgggctggcg 120
gccgcggcgg cgcacgacgt gtcgatgcgt gtctgcagc tgttcggcag gtacggccag 180
gaatttcaaa cgttgagcaa ccaactggcc gcgtttcata ccgagttcgt acgcacgttg 240
aaccgcggcg cggcggcgta tctcaacacc gaaagcgcta acggcgggca gctgttcggt 300
cagatcgagg cgggacagcg cgcggtttcc gcggcggcgg ccgcgcgtcc gggcggcgca 360
tacggccaac tcgttgccaa cagggccacc aacctggaat ccctctacgg cgcatggtcg 420
gccaaccctg tccatttctc ccgcagatc atgcaccaac agcaggttta ctggcagcag 480
atcgcccgcg cgctcgccaa cgcgcgtccg aacttccccc ccctggtggc gaatttgcca 540
ggggccatcg acgcgccggt ccagcaattc ctggccttca acgcgcgcta ctacatccaa 600
cagattatta gctgcagat cggcttcgcc cagctattcg ccacgacggt cggtcagggg 660
gtcaccagcg tcattgcggg gtggcccaac ctgcggcggg agcttcagct agcgtttcaa 720
cagcttctgg tgggtgacta caacgcgcgc gtggcgaaac tgggtaaggc catgacaaac 780
cttcgtgta cggggttcga caccagcgac gtgacgatcg gcacaatggg caccaccatt 840
agtgtcacgg cgaaccccaa gctgtgtggc ccgctgggag atctgttca ccatcatgac 900
atcccgccac aagaggcgca gtaattcacc aacctgatgc cccctccat cctgcgagac 960
atgtcgacga acttcaccaa cgtgttcacg acgctctcca accgaacat ccaggcggtc 1020
gcttcgttcg atatcgcaac caccgcgggg actttgagca ccttcttcgg ggtgccattg 1080
gtgtcactt acgccacatt gggtgccggc ttgcgtcac tgaacgcgat tgcgacgagc 1140
gcggaaccaa tcgagcaggc cctgttggcc ggcaactacc taggggcggg ggggtgcgctt 1200
atcgacgccc cggccacgcg gttagacggc ttcctcaaca gcgcaacggt gttggatacg 1260
ccgatcctgg tgcccaaggc gctcccgtcc cctctgccc cgaaggctgg gatcaegctg 1320
cacttgctt tcgacgggat tctcgtgccg ccgcataccg tcaccgcgac gatcagcttc 1380
ccgggtgctc cggttcctat tcccggttcc ccaaccaccg taaccgtttt cggcacaccc 1440
ttcatgggaa tgggtccgct gctgatcaac tacattcccc aacagctcgc cctggcaatc 1500

```


WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-59-

aaacggcggt ct

1512

<210> 41

<211> 368

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> '41

Met Thr Ser Gly Ser Leu Gln Phe Thr Val Leu Arg Ala Val Asn Pro
 1 5 10 15

Ala Thr Asp Ala Gln Arg Glu Ser Met Leu Arg Glu Pro Gly Phe Gly
 20 25 30

Lys Tyr His Thr Asp His Met Val Ser Ile Asp Tyr Ala Glu Gly Arg
 35 40 45

Gly Trp His Asn Ala Arg Val Ile Pro Tyr Gly Pro Ile Glu Leu Asp
 50 55 60

Pro Ser Ala Ile Val Leu His Tyr Ala Gln Glu Val Phe Glu Gly Leu
 65 70 75 80

Lys Ala Tyr Arg Trp Ala Asp Gly Ser Ile Val Ser Phe Arg Ala Asp
 85 90 95

Ala Asn Ala Ala Arg Leu Arg Ser Ser Ala Arg Arg Leu Ala Ile Pro
 100 105 110

Glu Leu Pro Asp Ala Val Phe Ile Glu Ser Leu Arg Gln Leu Ile Ala
 115 120 125

Val Asp Lys Ala Trp Val Pro Gly Ala Gly Gly Glu Glu Ala Leu Tyr
 130 135 140

Leu Arg Pro Phe Ile Phe Ala Thr Glu Pro Gly Leu Gly Val Arg Pro
 145 150 155 160

Ala Thr Gln Tyr Arg Tyr Leu Leu Ile Ala Ser Pro Ala Gly Ala Tyr
 165 170 175

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-60-

Phe Lys Gly Gly Ile Ala Pro Val Ser Val Trp Val Ser Thr Glu Tyr
 180 185 190
 Val Arg Ala Cys Pro Gly Gly Thr Gly Ala Ala Lys Phe Gly Gly Asn
 195 200 205
 Tyr Ala Ala Ser Leu Leu Ala Gln Ala Glu Ala Ala Glu Asn Gly Cys
 210 215 220
 Asp Gln Val Val Trp Leu Asp Ala Val Glu Arg Arg Tyr Ile Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Gly Gly Met Asn Ile Phe Phe Val Leu Gly Ser Gly Gly Ser Ala
 245 250 255
 Arg Leu Val Thr Pro Glu Leu Ser Gly Ser Leu Leu Pro Gly Ile Thr
 260 265 270
 Arg Asp Ser Leu Leu Gln Leu Ala Ile Asp Ala Gly Phe Ala Val Glu
 275 280 285
 Glu Arg Arg Ile Asp Ile Asp Glu Trp Gln Lys Lys Ala Ala Ala Gly
 290 295 300
 Glu Ile Thr Glu Val Phe Ala Cys Gly Thr Ala Ala Val Ile Thr Pro
 305 310 315 320
 Val Ala Arg Val Arg His Gly Ala Ser Glu Phe Arg Ile Ala Asp Gly
 325 330 335
 Gln Pro Gly Glu Val Thr Met Ala Leu Arg Asp Thr Leu Thr Gly Ile
 340 345 350
 Gln Arg Gly Thr Phe Ala Asp Thr His Gly Trp Met Ala Arg Leu Gly
 355 360 365

<210> 42

<211> 1104

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-61-

<400> 42
 atgaccagcg gctcccttca attcacggcg ttacgtgcgg tcaatccggc caccgacgcg 60
 cagcgtgaat cgatgctgcg ggagccgggt ttoggcaaat accacacoga ccatatggtg 120
 tcgatacgact atgccgaggg ccgtgggttg cacaacgcgc gggtaatccc ttatggcccg 180
 atcgagctgg atccctoggc gatcgtgctg cactatgcgc aggaggtgtt cgaagggtc 240
 aaagcctacc gctgggcccga cgggtccatc gtgtcgttcc ggcgcgacgc caacgcgcgc 300
 aggttgcggt cgtcggcgcg gcggttgcg attcccgaaac tgcccgacgc ggtgttcac 360
 gaatccctgc gccagctaat cgtcgtcgac aaagctggg tgcccggtgc cggcggtgag 420
 gagcgctgt atctgcggcc gtccatcttc gccacgcgc cgggactggg cgtgcggcct 480
 gccacccaat accgttacct gttgatcgcc tcgcccggcg gtgcgtactt caaggcgcg 540
 atcgccctcg tcagcgtctg ggtttcgacg gagtatgtac gggcctgtcc gggcggcacc 600
 ggtgcggcca agttcggcg ccaactacgc gcctcgttgc tggcgacggc cgaagccgc 660
 gagaacgat gcgaccaggt ggtgtgctg gacgtgtg aacgcgccta tatcgaagag 720
 atgggtggca tgaacatctt ctctgtgctc ggcagcgcg gatcgcgcg gctggtcacc 780
 ccggagctgt ccggttcctt gctgcccggg atcacacggg attcgttgtt gcagttggct 840
 attgatccg gattcgcggt cgaggaacgc aggatgata tcgacgagtg gcagaagaaa 900
 gccgcgcgc gcgagatcac cgaggtgttt gcgtcggca ccgcccgtgt catcaccccg 960
 gtgcgcggg tcgggcacgg tgccagcgag ttcagaatcg ccgacggtca gccgggtgag 1020
 gtgaccatcg cactacgcga tacgctgacc ggcacacgc ggggcacott ccgggacacc 1080
 caccgctgga tgccgcggct gggg 1104

<210> 43

<211> 249

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 43

Val Thr Ala Asp Trp Val Val Thr Phe Thr Phe Asp Ala Asp Pro Ser
 1 5 10 15

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-62-

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

<210> 44

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-63-

<211> 747

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 44

```

gtgacagccg actgggtcgt caccttcacg ttgatgctg acccttcgat ggagaccatg      60
gacgcctggg agacgcagct cgaggggttc gacgcactgg tatctcgggt cccaggacac      120
ggcattgaag tcacgtctta tgcgccgggc gattggagtg tgttcgaagc gtcgcgcaag      180
atggctggcg aggttatgcc ggtagtcaa gccaaagatc ccattgctgt gcagatcatt      240
agcgagccag agcatcgtct gcgcgctgag gcgttcacaa cgcgccgagtt gatgtctgcg      300
gctgagatcg cggatgagtt ggggggttgc cgtcagaggg tgcaccaatt gaggtcgaca      360
gcagggtttc ccgtccggtt ggcagatttg cgtggaggcg cgtgtggga tgcggcagcg      420
gtgcgcaggt ttgcggagac ctgggagcga aagcccggtc ggcgcgatac cgggaactgcc      480
aagttcgctt actcgtgggc ggtgggaccg gcggtcggca ggtccggtaa ggcacctaac      540
gtccggtggc gtgtcgagaa cccagacaaa atccgctttg tgttcgcaa catcggcgac      600
gatatcgagc aagatgtcga gattgacctc tcgcgaatcg atgcgatac tcgaaatgtc      660
ccgaagaaga cggtgattcg ccccgagagc gggctcaaca tgggtctgat agcggtttgg      720
ggccatcccc ttccaaatca gctatac                                     747

```

<210> 45

<211> 129

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 45

```

Met Arg Leu Ile Leu Asn Val Ile Trp Leu Val Phe Gly Gly Leu Trp
1           5           10           15

Leu Ala Leu Gly Tyr Leu Leu Ala Ser Leu Val Cys Phe Leu Leu Ile
                20                25                30

Ile Thr Ile Pro Phe Gly Phe Ala Ala Leu Arg Ile Ala Ser Tyr Ala
35                40                45

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-64-

Leu Trp Pro Phe Gly Arg Thr Ile Val Glu Lys Pro Thr Ala Gly Thr
 50 55 60

Gly Ala Leu Ile Gly Asn Val Ile Trp Val Leu Leu Phe Gly Ile Trp
 65 70 75 80

Leu Ala Leu Gly His Leu Val Ser Ala Ala Ala Met Ala Val Thr Ile
 85 90 95

Ile Gly Ile Pro Leu Ala Leu Ala Asn Leu Lys Leu Ile Pro Val Ser
 100 105 110

Leu Val Pro Leu Gly Lys Asp Ile Val Gly Val Asn Ser Gln Val Pro
 115 120 125

Thr

<210> 46

<211> 387

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 46
 atgcgactaa tccgaacgt tatctggttg gtgttcggtg gccctcgggt ggccctcggg 60
 taactgctgg cgtcgcttgt ctgcttcctg ctcatcatca ccattccgtt tggcttcgcg 120
 gcgctgcgca tcgctgcgta cgcgttggtg ccgttcggcc ggaagatcgt cgaagagcca 180
 accgcgggga cgggggcctt gatcggaac gtcatctggg tgctgctgtt cgggatctgg 240
 ctggccctcg ggcatttggt gaggccgcg gcaatggcag tcacgatcat cggcatttcg 300
 ctgcaactgg ccaacttgaa actgatcccg gtgtcgctgg tgccgctggg caaggacatc 360
 gtccgggtca actcacaggt gccca 387

<210> 47

<211> 346

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-65-

<400> 47

```

Met Asp Phe Thr Ile Phe Pro Pro Glu Phe Asn Ser Leu Asn Ile Gln
1      5      10      15

Gly Ser Ala Arg Pro Phe Leu Val Ala Ala Asn Ala Trp Lys Asn Leu
20      25      30

Ser Asn Glu Leu Ser Tyr Ala Ala Ser Arg Phe Glu Ser Glu Ile Asn
35      40      45

Gly Leu Ile Thr Ser Trp Arg Gly Pro Ser Ser Thr Ile Met Ala Ala
50      55      60

Ala Val Ala Pro Phe Arg Ala Trp Ile Val Thr Thr Ala Ser Leu Ala
65      70      75      80

Glu Leu Val Ala Asp His Ile Ser Val Val Ala Gly Ala Tyr Glu Ala
85      90      95

Ala His Ala Ala His Val Pro Leu Pro Val Ile Glu Thr Asn Arg Leu
100     105     110

Thr Arg Leu Ala Leu Ala Thr Thr Asn Ile Phe Gly Ile His Thr Pro
115     120     125

Ala Ile Phe Ala Leu Asp Ala Leu Tyr Ala Gln Tyr Trp Ser Gln Asp
130     135     140

Gly Glu Ala Met Asn Leu Tyr Ala Thr Met Ala Ala Ala Ala Ala Arg
145     150     155     160

Leu Thr Pro Phe Ser Pro Pro Ala Pro Ile Ala Asn Pro Gly Ala Leu
165     170     175

Ala Arg Leu Tyr Glu Leu Ile Gly Ser Val Ser Glu Thr Val Gly Ser
180     185     190

Phe Ala Ala Pro Ala Thr Lys Asn Leu Pro Ser Lys Leu Trp Thr Leu
195     200     205

Leu Thr Lys Gly Thr Tyr Pro Leu Thr Ala Ala Arg Ile Ser Ser Ile
210     215     220

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-66-

Pro Val Glu Tyr Val Leu Ala Phe Val Glu Gly Ser Asn Met Gly Gln
 225 230 235 240

Met Met Gly Asn Leu Ala Met Arg Ser Leu Thr Pro Thr Leu Lys Gly
 245 250 255

Pro Leu Glu Leu Leu Pro Asn Ala Val Arg Pro Ala Val Ser Ala Thr
 260 265 270

Leu Gly Asn Ala Asp Thr Ile Gly Gly Leu Ser Val Pro Pro Ser Trp
 275 280 285

Val Ala Asp Lys Ser Ile Thr Pro Leu Ala Lys Ala Val Pro Thr Ser
 290 295 300

Ala Pro Gly Gly Pro Ser Gly Thr Ser Trp Ala Gln Leu Gly Leu Ala
 305 310 315 320

Ser Leu Ala Gly Gly Ala Val Gly Ala Val Ala Ala Arg Thr Arg Ser
 325 330 335

Gly Val Ile Leu Arg Ser Pro Ala Ala Gly
 340 345

<210> 48

<211> 1038

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 48
 atggatttca caatttttcc gccggagttc aactccctca acatccaagg tagcgctcgt 60
 ccgtttctag tagccgcgaa cgcctggaag aatctgtcca acgagctgag ctacgcggcc 120
 agtcggttcg agagtgcgat caacgggctg atcacatcgt ggcgggggccc atcgtcgacg 180
 atcatggcag ctgcggtcgc cccatttcgg gcctggattg tcacgacgcg ttccctggct 240
 gaactcgtcg cgcaccacat cagcgtcgtg gcaggcgccct atgaagcggc gcacgcagca 300
 cactgcgcgc tgccggtgat cgagaccaac cgactgacgc gcctcgctct cgcacgacc 360
 aacattttcg ggattcacac ccccgcgatc ttgcccctcg atgcactgta tgccagtagc 420

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-67-

```

tggtcccaag atggcgaggg gatgaacctc tacgccacaa tggcggcggc cgccgcacgg 480
ctgacaccgt tctcgccccc ggcgcgcgac gccaaaccgg gcgcgtggc cagactttat 540
gaactgatcg gttcgggtgc cgagacggtg gggtcattcg cgcgcgcggc gaccaagaat 600
ctgccttcga agctgtggac gctgttgacg aagggcacct acccgctcac agccgcgcga 660
atctcgtcga taccgtgga atacgtgttg gcctttgtcg agggcagcaa catggggccag 720
atgatgggca acctgcctat gcggagcctg acaaccaacg tcaaggggcc gctggagttg 780
ctaccacaag cggtcaggcc cgcgggtgac gcaacattgg gaaatcgga taogtcggg 840
gggtgttcgg tccccccag ctgggttgcg gacaaatcga ttacgcggtt ggccaaagcc 900
gtcccgacct ccgcgcggg cggtcgcgct ggaacctcgt gggccagct gggattggca 960
agcctggcgg gggcgctgt gggcgccgct gcggcaagaa cccgttcggg agtgatactg 1020
cggtcaccgg ccgcgcggc 1038

```

<210> 49

<211> 876

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 49

```

Met Leu Pro Lys Ser Trp Asp Pro Ala Ala Met Glu Ser Ala Ile Tyr
1           5           10          15

Gln Lys Trp Leu Asp Ala Gly Tyr Phe Thr Ala Asp Pro Thr Ser Thr
20          25          30

Lys Pro Ala Tyr Ser Ile Val Leu Pro Pro Pro Asn Val Thr Gly Ser
35          40          45

Leu His Met Gly His Ala Leu Glu His Thr Met Met Asp Ala Leu Thr
50          55          60

Arg Arg Lys Arg Met Gln Gly Tyr Glu Val Leu Trp Gln Pro Gly Thr
65          70          75          80

Asp His Ala Gly Ile Ala Thr Gln Ser Val Val Glu Gln Gln Leu Ala
85          90          95

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-68-

Val Asp Gly Lys Thr Lys Glu Asp Leu Gly Arg Glu Leu Phe Val Asp
 100 105 110
 Lys Val Trp Asp Trp Lys Arg Glu Ser Gly Gly Ala Ile Gly Gly Gln
 115 120 125
 Met Arg Arg Leu Gly Asp Gly Val Asp Trp Ser Arg Asp Arg Phe Thr
 130 135 140
 Met Asp Glu Gly Leu Ser Arg Ala Val Arg Thr Ile Phe Lys Arg Leu
 145 150 155 160
 Tyr Asp Ala Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Glu Arg Leu Val Asn Trp Ser
 165 170 175
 Pro Val Leu Gln Thr Ala Ile Ser Asp Leu Glu Val Asn Tyr Arg Asp
 180 185 190
 Val Glu Gly Glu Leu Val Ser Phe Arg Tyr Gly Ser Leu Asp Asp Ser
 195 200 205
 Gln Pro His Ile Val Val Ala Thr Thr Arg Val Glu Thr Met Leu Gly
 210 215 220
 Asp Thr Ala Ile Ala Val His Pro Asp Asp Glu Arg Tyr Arg His Leu
 225 230 235 240
 Val Gly Thr Ser Leu Ala His Pro Phe Val Asp Arg Glu Leu Ala Ile
 245 250 255
 Val Ala Asp Glu His Val Asp Pro Glu Phe Gly Thr Gly Ala Val Lys
 260 265 270
 Val Thr Pro Ala His Asp Pro Asn Asp Phe Glu Ile Gly Val Arg His
 275 280 285
 Gln Leu Pro Met Pro Ser Ile Leu Asp Thr Lys Gly Arg Ile Val Asp
 290 295 300
 Thr Gly Thr Arg Phe Asp Gly Met Asp Arg Phe Glu Ala Arg Val Ala
 305 310 315 320
 Val Arg Gln Ala Leu Ala Ala Gln Gly Arg Val Val Glu Glu Lys Arg
 325 330 335

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-69-

Pro Tyr Leu His Ser Val Gly His Ser Glu Arg Ser Gly Glu Pro Ile
 340 345 350
 Glu Pro Arg Leu Ser Leu Gln Trp Trp Val Arg Val Glu Ser Leu Ala
 355 360 365
 Lys Ala Ala Gly Asp Ala Val Arg Asn Gly Asp Thr Val Ile His Pro
 370 375 380
 Ala Ser Met Glu Pro Arg Trp Phe Ser Trp Val Asp Asp Met His Asp
 385 390 395 400
 Trp Cys Ile Ser Arg Gln Leu Trp Trp Gly His Arg Ile Pro Ile Trp
 405 410 415
 Tyr Gly Pro Asp Gly Glu Gln Val Cys Val Gly Pro Asp Glu Thr Pro
 420 425 430
 Pro Gln Gly Trp Glu Gln Asp Pro Asp Val Leu Asp Thr Trp Phe Ser
 435 440 445
 Ser Ala Leu Trp Pro Phe Ser Thr Leu Gly Trp Pro Asp Lys Thr Ala
 450 455 460
 Glu Leu Glu Lys Phe Tyr Pro Thr Ser Val Leu Val Thr Gly Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ile Leu Phe Phe Trp Val Ala Arg Met Met Met Phe Gly Thr Phe Val
 485 490 495
 Gly Asp Asp Ala Ala Ile Thr Leu Asp Gly Arg Arg Gly Pro Gln Val
 500 505 510
 Pro Phe Thr Asp Val Phe Leu His Gly Leu Ile Arg Asp Glu Ser Gly
 515 520 525
 Arg Lys Met Ser Lys Ser Lys Gly Asn Val Ile Asp Pro Leu Asp Trp
 530 535 540
 Val Glu Met Phe Gly Ala Asp Ala Leu Arg Phe Thr Leu Ala Arg Gly
 545 550 555 560
 Ala Ser Pro Gly Gly Asp Leu Ala Val Ser Glu Asp Ala Val Arg Ala

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-70-

565

570

575

Ser Arg Asn Phe Gly Thr Lys Leu Phe Asn Ala Thr Arg Tyr Ala Leu
 580 585 590

Leu Asn Gly Ala Ala Pro Ala Pro Leu Pro Ser Pro Asn Glu Leu Thr
 595 600 605

Asp Ala Asp Arg Trp Ile Leu Gly Arg Leu Glu Glu Val Arg Ala Glu
 610 615 620

Val Asp Ser Ala Phe Asp Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ala Cys Glu Ser
 625 630 635 640

Leu Tyr His Phe Ala Trp Asp Glu Phe Cys Asp Trp Tyr Leu Glu Leu
 645 650 655

Ala Lys Thr Gln Leu Ala Gln Gly Leu Thr His Thr Thr Ala Val Leu
 660 665 670

Ala Ala Gly Leu Asp Thr Leu Leu Arg Leu Leu His Pro Val Ile Pro
 675 680 685

Phe Leu Thr Glu Ala Leu Trp Leu Ala Leu Thr Gly Arg Glu Ser Leu
 690 695 700

Val Ser Ala Asp Trp Pro Glu Pro Ser Gly Ile Ser Val Asp Leu Val
 705 710 715 720

Ala Ala Gln Arg Ile Asn Asp Met Gln Lys Leu Val Thr Glu Val Arg
 725 730 735

Arg Phe Arg Ser Asp Gln Gly Leu Ala Asp Arg Gln Lys Val Pro Ala
 740 745 750

Arg Met His Gly Val Arg Asp Ser Asp Leu Ser Asn Gln Val Ala Ala
 755 760 765

Val Thr Ser Leu Ala Trp Leu Thr Glu Pro Gly Pro Asp Phe Glu Pro
 770 775 780

Ser Val Ser Leu Glu Val Arg Leu Gly Pro Glu Met Asn Arg Thr Val
 785 790 795 800

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-71-

Val Val Glu Leu Asp Thr Ser Gly Thr Ile Asp Val Ala Ala Glu Arg
 805 810 815

Arg Arg Leu Glu Lys Glu Leu Ala Gly Ala Gln Lys Glu Leu Ala Ser
 820 825 830

Thr Ala Ala Lys Leu Ala Asn Ala Asp Phe Leu Ala Lys Ala Pro Asp
 835 840 845

Ala Val Ile Ala Lys Ile Arg Asp Arg Gln Arg Val Ala Gln Gln Glu
 850 855 860

Thr Glu Arg Ile Thr Thr Arg Leu Ala Ala Leu Gln
 865 870 875

<210> 50

<211> 2628

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 50
 atgctgcccc agtcgtggga tccggccgcg atggagagcg ccatctatca gaagtggctg 60
 gacgtggctt acttcaccgc ggacccgacc agcaccgaag cggcctatto gatcgtgctg 120
 ccgcccgcga acgtgaccgg cagcctgcac atgggccacg cgttggaaac caaccatgat 180
 gagcgtttga cgcggcgcaa gccgatgcag ggcctatgagg tgctctggca gccgggcacc 240
 gaccatgccg ggatcgccac ccagagcgctg gtccagcagc agctggcggt cagcggcaag 300
 actaagaag acctcggccg cgagctgttc gtggacaagg tgtgggattg gaagcgagag 360
 tctggcggtg ccatcgccgg ccagatgcgc cgactcgggt acgggggtga ctggagccgc 420
 gaccggttca ccatggacga aggtctgtcg cgggcggtgc gcacgatctt caagcggctt 480
 tatgacgcgg ggctgatcta tcgggccgag cggctggtca actggtcgcc ggtgctgcag 540
 accgcgatct ccgacctcga ggtcaactac cgcgacgtcg aaggcgagct ggtgtcgttt 600
 aggtacggct cgttgacga ctgcnaacc caccatcgtg tcgccaccac ccgggtcgag 660
 acgatcgtgg gcgataccgc gatcgccgtc catcccgatg acgagcgota ccgtcacctg 720
 gtccgcacca gctggcgca ccattcgtc gacggggagc tggccattgt cgcgcagcag 780
 cacgtggacc ctgaattcgg caccggcgcg gtcaaagtca caccgcacca cgaacccaac 840

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-72-

```

gacttcgaaa tcgggggtgcg ccaccagctg ccatgccct ccatcctgga caccaagggc 900
cggatcgtcg acaccggaac gcgattcgac ggcattggacc gcttcgaggc acgggtcgcg 960
gtgcgcacaag cgtcgcggcg ccaggggccgc gtggtcgaa aaaagcgacc ctacctgcac 1020
agcgtcggaac actcgaagcg cagcggcgag ccatcgagc cggcgctatc cctcgagtg 1080
tgggtccggg tggatcgct ggcacaaagc gccggggatg cggtcgcaa cggggacacc 1140
gtgattcacc cggccagcat ggaacccgc tggttctct gsgtcgaca catgcacgac 1200
tgggtcatct cgcgacagct ctggggggg catcgatcc ccatctggtc cggaccgac 1260
ggcgaaacagg tgtcgctcg ccgcgacga acaccocgc agggctggga acaggatcct 1320
gacgtgctgg atacctggtt ttctcgggc ctgtggcgt ttccacgct gsgttggcg 1380
gacaagacgg cggagctgga aaagtctat ccgacaagc ttctggttac cggctatgac 1440
atcttcttct ttgggtggc cagaatgat atgttcggc ccttcgtcg cagcagcgc 1500
gccatcacc tcgacggcg ccggggcccg cagggtcgt tcaccagct gtttctgcat 1560
gggtgatcc gcgacgagtc tggccgcaag atgagcaagt ccaaggcaa cgtcatcgac 1620
ccgtggatt gggggaat gttcggggc gatcgctgc ggttcacgt ggcgcggcg 1680
gccagtcgc gtggtgactt ggcggcgagc gaggatgcc tgcggcgct gcgcaatttc 1740
gggaccaagc tgtcaacgc cactcggtac gcatgctca atggcgccg gccagcacc 1800
ctgccatcgc cgaacgagct gacgacgcc gaccgctgga ttctcggaag gttggaagag 1860
gttcggggcg aagttgatto ggccttcgac ggatacagat tcagccgcg ttgtgagtc 1920
ctgtatcaat tcgcctggga cgaattctgc gactggtaac tcgaactggc caaaacgcag 1980
cttgccagg gactcacaca caccaccgc gtgctggcg ccgggctgga cagctgctg 2040
cgctgctgc acccggtgat tcccttcct accgaggcg tatggctggc gctgaccgc 2100
agggaatcgc tggtcagcgc cgaatggcg gaccttcg gattagcgt gaccttgtt 2160
gccgcgaac ggattaacga tatgcagaag ttggtgacc aagtcggcg gttccgagc 2220
gatcaagtc tggccgacgc gcagaaggt ccggccgaa tgcacggtg gcgggaactc 2280
gatctgagca accaggtggc cgcctgacc tcgctggcg ggtcacga gccgggccc 2340
gattttgagc cgtcggtctc gttgaggtt cggctcggc ccgagatgaa ccgacccgc 2400
gtcgtgagc tcgacacctc gggcaccatc gacgtggcg ccgagcgtc ccgctggaa 2460
aaggagttg ccggcgcca aaaggagctc gcgtgacgc ccgccaagt ggcacacgc 2520
gactttctgg ccaaagcgc cgaagcgtc attgccaaga tcgggagac ccagcgctg 2580

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-73-

gcgagcagcgg aaaccgagcg catcaccacc cgggttggtg cgtgcaa

2628

<210> 51

<211> 431

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> '51

Met Asn Pro Thr Leu Ala Val Leu Gly Ala Gly Ala Lys Ala Val Ala
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Ala Ser Val Leu Arg Asp Met Gly Val Asp Val Pro
 20 25 30

Asp Val Ile Ala Val Glu Arg Ile Gly Val Gly Ala Asn Trp Gln Ala
 35 40 45

Ser Gly Gly Trp Thr Asp Gly Ala His Arg Leu Gly Thr Ser Pro Glu
 50 55 60

Lys Asp Val Gly Phe Pro Tyr Arg Ser Ala Leu Val Pro Arg Arg Asn
 65 70 75 80

Ala Glu Leu Asp Glu Arg Met Thr Arg Tyr Ser Trp Gln Ser Tyr Leu
 85 90 95

Ile Ala Thr Ala Ser Phe Ala Glu Trp Ile Asp Arg Gly Arg Pro Ala
 100 105 110

Pro Thr His Arg Arg Trp Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Val Ala Asp His
 115 120 125

Ile Gly Leu Lys Val Ile His Gly Glu Val Glu Arg Leu Ala Val Thr
 130 135 140

Gly Asp Arg Trp Ala Leu Cys Thr His Glu Thr Thr Val Gln Ala Asp
 145 150 155 160

Ala Leu Met Ile Thr Gly Pro Gly Gln Ala Glu Lys Ser Leu Leu Pro
 165 170 175

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-74-

Gly Asn Pro Arg Val Leu Ser Ile Ala Gln Phe Trp Asp Arg Ala Ala
 180 185 190

Gly His Asp Arg Ile Asn Ala Glu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly
 195 200 205

Glu Thr Ala Ala Ser Met Leu Asn Glu Leu Phe Arg His Arg Val Ser
 210 215 220

Thr Ile Thr Val Ile Ser Pro Gln Val Thr Leu Phe Thr Arg Gly Glu
 225 230 235 240

Gly Phe Phe Glu Asn Ser Leu Phe Ser Asp Pro Thr Asp Trp Ala Ala
 245 250 255

Leu Thr Phe Asp Glu Arg-Arg Asp Ala-Leu Ala Arg-Thr-Asp-Arg Gly
 260 265 270

Val Phe Ser Ala Thr Val Gln Glu Ala Leu Leu Ala Asp Asp Arg Ile
 275 280 285

His His Leu Arg Gly Arg Val Ala His Ala Val Gly Arg Gln Gly Gln
 290 295 300

Ile Arg Leu Thr Leu Ser Thr Asn Arg Gly Ser Glu Asn Phe Glu Thr
 305 310 315 320

Val His Gly Phe Asp Leu-Val Ile Asp Gly-Ser Gly Ala Asp Pro Leu
 325 330 335

Trp Phe Thr Ser Leu Phe Ser Gln His Thr Leu Asp Leu Leu Glu Leu
 340 345 350

Gly Leu Gly Gly Pro Leu Thr Ala Asp Arg Leu Gln Glu Ala Ile Gly
 355 360 365

Tyr Asp Leu Ala Val Thr Asp Val Thr Pro Lys Leu Phe Leu Pro Thr
 370 375 380

Leu Ser Gly Leu Thr Gln Gly Pro Gly Phe Pro Asn Leu Ser Cys Leu
 385 390 395 400

Gly Leu Leu Ser Asp Arg Val Leu Gly Ala Gly Ile Phe Thr Pro Thr
 405 410 415

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-75-

Lys His Asn Asp Thr Arg Arg Ser Gly Glu His Gln Ser Phe Arg
 420 425 430

<210> 52

<211> 1293

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 52
 atgaatccga cgctcgccgt cctgggcgct ggagccaagg cggggcggt cggggccaag 60
 gcatccgtgc tgcgtgacat gggggtcgac gtgcccagc tgatcgccgt cgaacgcac 120
 ggggtcgggg ccaactggca ggccagcggg ggctggaccg acggagccca ccggctgggc 180
 accagcccag aaaaggatgt cgggtttccc taccggtcgg cgctgggtgc acggcgcaac 240
 gcagaattgg acgagcggat gaccgcgtac agctggcagt cgtatctgat cgcaccgcg 300
 tcgttcgcgg aatggatcga ccggggcgcg ccggcgccca cccatcgag gtggagttag 360
 tacctagcct ggggtggcga tcacattggc ctcaaggtga tccacggcga ggtcgaacgg 420
 ctgcgcgtca ccgtgacgc ctgggcgttg tgcacccacg agaccaccgt gcaggccgac 480
 gcgttgatga tcaccgggac cggccaggct gaaaagtcgc tactgcccgg aaaccgcgcg 540
 gtgctctcaa tcgcacagtt ctgggaccgt gccgcggcgc acgacgggat caacgccgag 600
 cgggtcgcgg tgatcggtgg cggagagacg gccgcacgta tgctcaacga gctgttcgg 660
 catcggtctc caacatcac cgtcatctcc ccgcaggtaa cctgttccac ccgcggcgag 720
 ggattcttcg agaactcact gttttccgat ccgacgcact gggcggcctt gacgttcgac 780
 gaacggcgcg acgcgctggc ccgcaccgac cgaggagtggt tctcgcgac cgtgcaggaa 840
 gcgtgctgg ccgatgaccg catccatcat ctgcgtggcc gggtcgccca cgcggtgggc 900
 cgtcaggggc agatccggtt gacgtgagc accaaccggg gcagcgagaa cttcgagacc 960
 gtgcacggat tcgatctcgt catcgacggc tcgggcgcgc atccgctgtg gttcacctca 1020
 ctgttcagtc agcacacct cgacctgctc gagctgggac tgggtggacc gctgaccgac 1080
 gaccgcctgc aggaagcgat cggctacgac ttggcagtc cgcagctcac gcccaagctg 1140
 ttectgccca cctgtccgg actcaccacg gggcccggtg tcccaacct gagctgcctc 1200
 ggcttggtgt cggaccgggt gctcggcgcc ggcattctta cgcgcaccaa acacaacgac 1260

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-76-

acaaggagaa gcggtgagca ccaatccttt cga

1293

<210> 53

<211> 71

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 53

Val Ser Thr Asn Pro Phe Asp Asp Asp Asn Gly Ala Phe Phe Val Leu
 1 5 10 15

Val Asn Asp Glu Asp Gln His Ser Leu Trp Pro Val Phe Ala Asp Ile
 20 25 30

Pro Ala Gly Trp Arg Val Val His Gly Glu Ala Ser Arg Ala Ala Cys
 35 40 45

Leu Asp Tyr Val Glu Lys Asn Trp Thr Asp Leu Arg Pro Lys Ser Leu
 50 55 60

Arg Asp Ala Met Val Glu Asp
 65 70

<210> 54

<211> 213

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 54
 gtgagcacca atcctttoga tgaagacaac ggcgacattct tcgtgctggt caacgacgaa 60

gaccagcaca gctgtggcc ggtgttgccc gatatccgg ccggtggcg cgtggtgcac 120

ggcgaagcca gccgtgccgc ctgcctggac taagtggaaa agaactggac cgatctgcgg 180

cgaagagcc tgcgtgaagc catggtcgag gac 213

<210> 55

<211> 201

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-77-

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 55

Val Thr Ala Val Ala Ala Gly Ala Leu Val Val Glu Thr Asp Ser Phe
 1 5 10 15

Arg Leu Arg Leu Leu Asp Gly Leu Val Ala Ser Ile Gly Glu Arg Gly
 20 25 30

Tyr Arg Ala Thr Thr Val Ser Asp Ile Val Arg His Ala Arg Thr Ser
 35 40 45

Lys Arg Thr Phe Tyr Asp Arg Phe Thr Ser Lys Glu Gln Cys-Phe-Leu
 50 55 60

Glu Leu Leu Leu Ala Asp Asn Glu Thr Leu Gly Asn Ser Ile Arg Ala
 65 70 75 80

Ala Val Asp Pro Asn Ala Asp Trp His Asp Gln Ile Arg Gln Ala Val
 85 90 95

Glu Ala Tyr Val Thr His Ile Glu Ser Arg Pro Ala Val Thr Leu Ser
 100 105 110

Trp Ile Arg Glu Phe Pro Ser Leu Gly Ala Ala Tyr Pro Val Gln
 115 120 125

Arg Arg Gly Met Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Ile Glu Leu Ser Ala
 130 135 140

Ser Pro Gly Phe Arg Arg Ala Asn Leu Pro Pro Leu Asn Val Pro Leu
 145 150 155 160

Ala Val Ile Leu Leu Gly Gly Leu Arg Glu Leu Thr Ala Leu Thr Val
 165 170 175

Glu Asp Gly Gln Pro Ile Arg Asn Ile Val Glu Pro Ala Val Asp Ala
 180 185 190

Ser Ile Ala Leu Leu Gly Pro Arg Ser
 195 200

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-78-

<210> 56

<211> 603

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

```

<400> 56
gtgacagcag tcgcccgg cgcggtggc gtgagaccg actcgtttcg gctacggttg    60
ctcgacggcc tggtcgcctc gatcggtgag cgggggttacc gcgccaccac cgtctccgac    120
atcgtccggc acgcccgcac atccaagcgc acgttctacg accggttca cagcaaggaa    180
cagtgctttt tggaaactct gctagcggac aacgagacgt tgggcaacag catccggggc    240
ggcgtcgatc caaacgccga ctggcacgac cagattcgtc aggcgggtga ggcctacgtc    300
acctatctcg aatccaggcc ggcggtgacg ttgagttgga tccgtgaatt cccgtcgcctc    360
ggtgccgcgc cttaccctgt ccagcgcgcg ggcattggag agctaaccag cctgctgato    420
gagctcagcg ccagccctgg gttccggcgg gctaacctac cgcactgaa tgtgccactg    480
gccgaatctc tgcctgggcgg ttgctgtgaa ctgaccgcgc tgaccgtcga ggaaggccag    540
ccgatccgga acatcgtcga gccggcggtg gatgcgtcaa tcgcgtgctt cggccccgcg    600
agc                                          603

```

<210> 57

<211> 534

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 57

```

Val Ser Gln Ile Pro Val Lys Leu Leu Val Asn Gly Arg Val Tyr Ser
1           5           10          15

Pro Thr His Pro Glu Ala Thr Ala Met Ala Val Arg Gly Asp Val Val
20          25          30

Ala Trp Leu Gly Ser Asp Asp Val Gly Arg Asp Gln Phe Pro Asp Ala
35          40          45

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-79-

Asp Val Gln Asp Leu Asp Gly Arg Phe Val Ala Pro Gly Phe Val Asp
 50 55 60

Ser His Ile His Leu Thr Ala Thr Gly Leu Met Leu Ser Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Leu Arg Pro Ala Thr Ser Arg Ala Gln Cys Leu Arg Met Val Ala Asp
 85 90 95

Tyr Ala Ala Asp His Pro Gly Gln Pro Leu Trp Gly His Gly Trp Asp
 100 105 110

Glu Ser Ala Trp Pro Glu Asn Ala Ala Pro Ser Thr Ala Asp Leu Asp
 115 120 125

Ala Val Leu Gly Asp Cys Pro Ala Tyr Leu Ala Arg Ile Asp Ser His
 130 135 140

Ser Ala Leu Val Ser Ser Gly Leu Arg Arg Leu Val Pro Glu Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Ala Thr Gly Tyr Thr Ala Gln Arg Pro Leu Thr Gly Asp Ala His
 165 170 175

His Leu Ala Arg Ala Ala Ala Arg Tyr Leu Leu Thr Asp Val Gln Leu
 180 185 190

Ala Asp Ala Arg Ala Val Ala Leu Gln Ala Ile Ala Ala Ala Gly Val
 195 200 205

Val Ala Val His Glu Cys Ala Gly Pro Glu Ile Gly Gly Leu Asp Asp
 210 215 220

Trp Leu Arg Leu Arg Ala Leu Glu His Gly Val Glu Val Ile Gly Tyr
 225 230 235 240

Trp Gly Glu Ala Val Ala Thr Pro Ala Gln Ala Arg Asp Leu Val Thr
 245 250 255

Glu Thr Gly Ala Arg Gly Leu Ala Gly Asp Leu Phe Val Asp Gly Ala
 260 265 270

Leu Gly Ser Arg Thr Ala Trp Leu His Glu Pro Tyr Ala Asp Ala Pro
 275 280 285

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-80-

Asp Cys Ile Gly Thr Cys His Leu Asp Val Asp Gly Ile Glu Ala His
290 295 300

Val Arg Ala Cys Thr Lys Ala Glu Val Thr Ala Gly Phe His Val Ile
305 310 315 320

Gly Asp Ala Ala Val Ser Ala Ala Val Ala Ala Phe Glu Arg Val Val
325 330 335

Ala Asp Leu Gly Val Val Ala Val Ala Arg Cys Gly His Arg Leu Glu
340 345 350

His Val Glu Met Val Thr Ala Asp Gln Ala Ala Lys Leu Gly Ala Trp
355 360 365

Gly Val Ile Ala Ser Val Gln Pro Asn Phe Asp Glu Leu Trp Gly Gly
370 375 380

Gly Asp Gly Met Tyr Ala Arg Arg Leu Gly Ala Gln Arg Gly Ser Glu
385 390 395 400

Leu Asn Pro Leu Ala Leu Leu Ala Ser Gln Gly Val Pro Leu Ala Leu
405 410 415

Gly Ser Asp Ala Pro Val Thr Gly Phe Asp Pro Trp Ala Ser Val Arg
420 425 430

Ala Ala Val Asn His Arg Thr Pro Gly Ser Gly Val Ser Ala Arg Ala
435 440 445

Ala Phe Ala Ala Ala Thr Arg Gly Gly Trp Arg Ala Gly Gly Val Arg
450 455 460

Asp Gly Arg Ile Gly Thr Leu Val Pro Gly Ala Pro Ala Ser Tyr Ala
465 470 475 480

Ile Trp Asp Ala Gly Asp Phe Asp Val Asp Ala Pro Arg Asp Ala Val
485 490 495

Gln Arg Trp Ser Thr Asp Pro Arg Ser Arg Val Pro Ala Leu Pro Arg
500 505 510

Leu Gly Pro Thr Asp Ala Leu Pro Arg Cys Arg Gln Thr Val His Arg

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-81-

515

520

525

Gly Ala Val Ile Tyr Gly
530

<210> 58

<211> 1602

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

```

<400> 58
gtgagccaga ttcccgctcaa actcctggtc aaaggccggg tgtacagccc caccaccccc 60
gaagcaaccg cgatggcggg gcggggcgat gtctgcgctt ggttgggcag cgacgacgtc 120
ggccgcgacc agttccacaga cgtgacgtg caggatctcg acggccgatt cgtggcgccg 180
gggttctgtg acagccacat ccacctgacc ggcaccggtc tgatgctcag cgggctggac 240
ttgcggcccg cgacctcagc cgcgcagtcg ctacggatgg tcgccgacta tgcggccgac 300
catccgggtc agccgctgtg gggtcacggg tgggatgagt cggcctggcc ggagaatgct 360
gcgcccagca ccgcccacct agacggggtt ctgggtgact gtcccgccta cctggccagg 420
atcgactcgc actccgcgtt ggtctctccc ggaactgcggc ggtgggtccc cgaactggcg 480
gcggcaaccg gttacacggc ccagcggccg ctgaccggtg atgccacca cctagcccg 540
gccgcgcac gctacctctt gaccgacgtc cagcttgccg acgcccggc cgtggcgctg 600
caggccatag ccgcccggc cgtcgtcgcc gtgcacgaat gcgcccgtcc ggaaatcggc 660
gggctcgacg actgggttgcg gctgcgtgca ctcgagcagc gactcgaggt gatcgggtac 720
tgggggtgag ccgtggccac gccggcccag gcccgtagc tggtagccga gaccggggct 780
cgagggctgg ccggtgatit gttcgtcgac ggggcgctcg ggtcgccgac cgcctggctg 840
cacgagccct acgcccagc ccccgactgc atcgccacct gccaccttga ctagacggc 900
atcgagcgc acgtacgagc atgcaccaag gccgaagtga ccgcccgtt ccacgtcatc 960
ggcgacgctg cgggtgtcggc cgcagtcgac gccttcgaac gggtagtggt agatctcgcc 1020
gtggttgccg tcgcccgtg cggccacgcg ctcgagcatg tggagatggt caccgcggac 1080
caggcccgca agctgggggc ttgggggggc atcgccagtg tgcagcccaa cttcgatgag 1140
ctgtggggcg gtggcgacgg catgtacgct cgcgcctgg gcgccagcg aggcagcgaa 1200

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-82-

ctcaaccgcg tggcgctgtt agcatcccaa ggcgtgcccc tgcgcttgg ctccgacgcg 1260
 ccgcgcacgg gctttgatcc ctggggccagc gtgcgcgcgg cggtaaatca ccgcaacgcg 1320
 ggcagcgggg tatcggcgcg ggcggcggtt gctgccgcga ccgcggcgcg ctggcggggc 1380
 ggtggtgttc gagaaggcgc gatcggcacc ctggtgccgg gcgcgcgcgc gtctacgcg 1440
 atatgggacg ccggggactt tgacgtcgac gcaccgcgcg acgcagtcca gcgctggtct 1500
 accgaccgcg gctccgggtt accgcattg ccgcggctgg gcccgacgca cgccttgccg 1560
 cgttgccgcc aaaccgtgca tcgaggtgog gtcatctatg gc 1602

<210> 59

<211> 151

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 59

Met Leu Lys Gly Phe Lys Glu Phe Leu Ala Arg Gly Asn Ile Val Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Val Ala Val Val Ile Gly Thr Ala Phe Thr Ala Leu Val Thr
 20 25 30

Lys Phe Thr Asp Ser Ile Ile Thr Pro Leu Ile Asn Arg Ile Gly Val
 35 40 45

Asn Ala Gln Ser Asp Val Gly Ile Leu Arg Ile Gly Ile Gly Gly Gly
 50 55 60

Gln Thr Ile Asp Leu Asn Val Leu Leu Ser Ala Ala Ile Asn Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Ile Ala Phe Ala Val Tyr Phe Leu Val Val Leu Pro Tyr Asn Thr
 85 90 95

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Val Glu Gln Pro Gly Asp Thr Gln Val Val
 100 105 110

Leu Leu Thr Glu Ile Arg Asp Leu Leu Ala Gln Thr Asn Gly Asp Ser
 115 120 125

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-83-

Pro Gly Arg His Gly Gly Arg Gly Thr Pro Ser Pro Thr Asp Gly Pro
 130 135 140

Arg Ala Ser Thr Glu Ser Gln
 145 150

<210> 60

<211> 453

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 60
 atgctcaag gattcaagga gttctcgcg cggggaata tcgtcgacct ggctgtcgcg 60
 gtggaatcg gcacagcgtt caccggttg gtcaccaagt tcaccgacag catcattacg 120
 ccgctgatca accggatcgg cgtcaacgca cagtcgacg tcggcatctt gcggatcggg 180
 atcggcggtg gtcagaccat tgacttgaac gtcttgttgt cggcagcgat caactttttc 240
 ctgatcgcgt tcgcggtgta cttcctagtc gtgctgccct acaacacact acgcaagaag 300
 ggggaggtcg agcagccggg cgacacccaa gtcgtgctgc tcaccgaaat ccgcgatctg 360
 ctgcgcgaaa cgaacgggga ctgcgccggg aggcacggcg gccgtgggac accatcgcca 420
 accgacgggc ctgcgcgag cacagaatcg caa 453

<210> 61

<211> 759

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 61

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

Val Leu Tyr Pro Ala Thr Gly Thr Thr Lys Ser Asp Ile Phe Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ala Gly Val Ala Glu Val Met Leu Gly His Ile Ala Gly Arg Pro
 35 40 45

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-84-

Ala Thr Arg Lys Arg Trp Pro Asn Gly Val Asp Gln Pro Ala Phe Phe
 50 55 60

Glu Lys Gln Leu Ala Leu Ser Ala Pro Pro Trp Leu Ser Arg Ala Thr
 65 70 75 80

Val Ala His Arg Ser Gly Thr Thr Thr Tyr Pro Ile Ile Asp Ser Ala
 85 90 95

Thr Gly Leu Ala Trp Ile Ala Gln Gln Ala Ala Leu Glu Val His Val
 100 105 110

Pro Gln Trp Arg Phe Val Ala Glu Pro Gly Ser Gly Glu Leu Asn Pro
 115 120 125

Gly Pro Ala Thr Arg Leu Val Phe Asp Leu Asp Pro Gly Glu Gly Val
 130 135 140

Met Met Ala Gln Leu Ala Glu Val Ala Arg Ala Val Arg Asp Leu Leu
 145 150 155 160

Ala Asp Ile Gly Leu Val Thr Phe Pro Val Thr Ser Gly Ser Lys Gly
 165 170 175

Leu His Leu Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Pro Val Ser Ser Arg Gly Ala
 180 185 190

Thr Val Leu Ala Lys Arg Val Ala Gln Arg Leu Glu Gln Ala Met Pro
 195 200 205

Ala Leu Val Thr Ser Thr Met Thr Lys Ser Leu Arg Ala Gly Lys Val
 210 215 220

Phe Val Asp Trp Ser Gln Asn Ser Gly Ser Lys Thr Thr Ile Ala Pro
 225 230 235 240

Tyr Ser Leu Arg Gly Arg Thr His Pro Thr Val Ala Ala Pro Arg Thr
 245 250 255

Trp Ala Glu Leu Asp Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu Ser Tyr Asp Glu
 260 265 270

Val Leu Thr Arg Ile Ala Arg Asp Gly Asp Leu Leu Glu Arg Leu Asp

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-85-

275 280 285
 Ala Asp Ala Pro Val Ala Asp Arg Leu Thr Arg Tyr Arg Arg Met Arg
 290 295 300
 Asp Ala Ser Lys Thr Pro Glu Pro Ile Pro Thr Ala Lys Pro Val Thr
 305 310 315 320
 Gly Asp Gly Asn Thr Phe Val Ile Gln Glu His His Ala Arg Arg Pro
 325 330 335
 His Tyr Asp Phe Arg Leu Glu Cys Asp Gly Val Leu Val Ser Trp Ala
 340 345 350
 Val Pro Lys Asn Leu Pro Asp Asn Thr Ser Val Asn His Leu Ala Ile
 355 360 365
 His Thr Glu Asp His Pro Leu Glu Tyr Ala Thr Phe Glu Gly Ala Ile
 370 375 380
 Pro Ser Gly Glu Tyr Gly Ala Gly Lys Val Ile Ile Trp Asp Ser Gly
 385 390 395 400
 Thr Tyr Asp Thr Glu Lys Phe His Asp Asp Pro His Thr Gly Glu Val
 405 410 415
 Ile Val Asn Leu His Gly Gly Arg Ile Ser Gly Arg Tyr Ala Leu Ile
 420 425 430
 Arg Thr Asn Gly Asp Arg Trp Leu Ala His Arg Leu Lys Asn Gln Lys
 435 440 445
 Asp Gln Lys Val Phe Glu Phe Asp Asn Leu Ala Pro Met Leu Ala Thr
 450 455 460
 His Gly Thr Val Ala Gly Leu Lys Ala Ser Gln Trp Ala Phe Glu Gly
 465 470 475 480
 Lys Trp Asp Gly Tyr Arg Leu Leu Val Glu Ala Asp His Gly Ala Val
 485 490 495
 Arg Leu Arg Ser Arg Ser Gly Arg Asp Val Thr Ala Glu Tyr Pro Gln
 500 505 510

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-86-

Leu Arg Ala Leu Ala Glu Asp Leu Ala Asp His His Val Val Leu Asp
 515 520 525

Gly Glu Ala Val Val Leu Asp Ser Ser Gly Val Pro Ser Phe Ser Gln
 530 535 540

Met Gln Asn Arg Gly Arg Asp Thr Arg Val Glu Phe Trp Ala Phe Asp
 545 550 555 560

Leu Leu Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Leu Leu Gly Thr Arg Tyr Gln Asp
 565 570 575

Arg Arg Lys Leu Leu Glu Thr Leu Ala Asn Ala Thr Ser Leu Thr Val
 580 585 590

Pro Glu Leu Leu Pro Gly Asp Gly Ala Gln Ala Phe Ala Cys Ser Arg
 595 600 605

Lys His Gly Trp Glu Gly Val Ile Ala Lys Arg Arg Asp Ser Arg Tyr
 610 615 620

Gln Pro Gly Arg Arg Cys Ala Ser Trp Val Lys Asp Lys His Trp Asn
 625 630 635 640

Thr Gln Glu Val Val Ile Gly Gly Trp Arg Ala Gly Glu Gly Gly Arg
 645 650 655

Ser Ser Gly Val Gly Ser Leu Leu Met Gly Ile Pro Gly Pro Gly Gly
 660 665 670

Leu Gln Phe Ala Gly Arg Val Gly Thr Gly Leu Ser Glu Arg Glu Leu
 675 680 685

Ala Asn Leu Lys Glu Met Leu Ala Pro Leu His Thr Asp Glu Ser Pro
 690 695 700

Phe Asp Val Pro Leu Pro Ala Arg Asp Ala Lys Gly Ile Thr Tyr Val
 705 710 715 720

Lys Pro Ala Leu Val Ala Glu Val Arg Tyr Ser Glu Trp Thr Pro Glu
 725 730 735

Gly Arg Leu Arg Gln Ser Ser Trp Arg Gly Leu Arg Pro Asp Lys Lys
 740 745 750

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-87-

Pro Ser Glu Val Val Arg Glu
755

<210> 62

<211> 2277

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

```

<400> 62
atgggttcgg cgtcggagca acgggtgacg ctgaccaacg cgcacaaggt gctctatccc 60
gccaccggga ccacaaagtc cgatatcttc gactactacg ccggtgttgc cgaagtcatg 120
ctcggccaca tcgctgggacg gccggcgacg cgcacgcgct ggcttaacgg cgtcgaccaa 180
cccgcttctc tcgaaaagca gttggcggtg tcggcgccgc cttggctgtc acgtgcaacg 240
gtggcgccac ggctcgggac gacgacctat ccgatcatcg atagcgcaac cgggctggcc 300
tggatcgccc aacaggcggc gctggaggtg cactgccccg agtggcggtt tgtcgccgag 360
ccgggatcag gtgagttaaa tcggggcccc gcaacgcggt tgggtgttga cctggacccg 420
ggcgaaggcg tgatgatggc ccagctggcc gaggtggcgc gcgcgggttc tgatcttctc 480
gcgatatcg ggttggtcac cttcccggtc accagcgga gcaagggtat gcctctgtac 540
acaccgctgg atgagccggt gacgacgag ggagccacgg tgttgcccaa gcgcgtcgcg 600
cagcgattgg agcaggcgat gcccgcttg gtcacctcga ccatgaccaa aagcctgcgg 660
gccgggaagg tgtttgtgga ctggagccag aacagcggtc cgaagacac catcgcgccg 720
tactcactac gtggccggac gcatccgacc gtcgcggcgc cactgacctg ggccgagctc 780
gacgaccccg cactgcgtca gctctctac gacgaggtgc tgacccgat tgcccgcgac 840
ggcgatctgc tcgagcggtc ggatgcgcgc gctccgtag cggaccggtt gacccgatac 900
cgccgcatgc gcgacgcctc gaaaactccc gagccgattc ccacggcgaa acccgttacc 960
gggacggca atacgttcgt catocaggag catcacgcgc gtcggccgca ctacgatttc 1020
cggctggaat scgacggcgt gctggtctcg tgggcggtac cgaaaaaact gcccgacaac 1080
acatcggtta aocatctagc gatacacacc gaggaccacc cgtcggaata cggcacgctc 1140
gaggcgcgca tccccagcgg ggagtacggc gccggcaagg tgatcatctg ggactccggc 1200
acttacgaca ccgagaagtt ccacgatgac ccgcacacgg gggagggtcat cgtgaatctg 1260

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-88-

cacggcggcc ggatctctgg gcgttatgag ctgattcggg ccaacggcga tcggtggctg 1320
 gcgcaccgcc taaagaatca gaaagaccag aagggtgtcg agttcgacaa tctggcccca 1380
 atgcttgcca cgcacggcac ggtggcgggt ctaaaggcca gccagtgggc gttcgaaggc 1440
 aagtgggacg gctaccggtt gctggttgag gctgaccacg gcgccgtgag gctgcggtcc 1500
 cgcagcgggc gcgatgtcac cgcgagtat ccgcattgc ggcattggc ggaggatetc 1560
 gccgatcacc acgtgggtgt ggacggcgag gccgtcgtac ttgactcctc tgggtgtgcc 1620
 agcttcagcc agatgcagaa tcggggccgc gacaccctg tcgagttctg ggcgttcgac 1680
 ctgctctacc tcgacggccg cgcgctgcta ggcaccctct accaagaccg gcglaagctg 1740
 ctcgaaaccc tagctaaccg aaccagctc accgttcocg agctgctgcc cgggtgacgc 1800
 gcccaagcgt ttgctgtctc gcgcaagcac ggcgggaggg gcgtgatcgc caagaggcgt 1860
 gactcgcgct atcagccggg ccggcgctgc gcgtcgtggg tcaaggacaa gcactggaac 1920
 acccaggaag tcgtcattgg tggctggcgc gccggggaag gcgggcgcag cagtggcgctc 1980
 gggctcgtgc tcaltggcat ccccggtcca ggtgggctgc agttcgccgg gcgggtcggt 2040
 accggcctca gcgaacgcga actggccaac ctcaaggaga tgctggcgcc gctgcatacc 2100
 gacgagtcgc ccttcgacgt accactgccc gcgcgtgacg ccaaggccat cacatatgct 2160
 aagccggcgc tggttgcaga ggtgcgctac agcgagtggg ctccggaggg ccggctcggt 2220
 caatcaagct ggcgtgggct gcggccggac aagaaacca gtgaggtggg gcgcgaa 2277

<210> 63

<211> 170

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 63

Val Val Pro Ala Gln His Arg Pro Pro Asp Arg Pro Gly Asp Pro Ala
 1 5 10 15

His Asp Pro Gly Arg Gly Arg Arg Leu Gly Ile Asp Val Gly Ala Ala
 20 25 30

Arg Ile Gly Val Ala Cys Ser Asp Pro Asp Ala Ile Leu Ala Thr Pro
 35 40 45

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-89-

Val Glu Thr Val Arg Arg Asp Arg Ser Gly Lys His Leu Arg Arg Leu
 50 55 60

Ala Ala Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Val Glu Val Ile Val Gly Leu
 65 70 75 80

Pro Arg Thr Leu Ala Asp Arg Ile Gly Arg Ser Ala Gln Asp Ala Ile
 85 90 95

Glu Leu Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Ser Pro Thr Pro Val Arg
 100 105 110

Leu Ala Asp Glu Arg Leu Thr Thr Val Ser Ala Gln Arg Ser Leu Arg
 115 120 125

Gln Ala Gly Val Arg Ala Ser Glu Gln Arg Ala Val Ile Asp Gln Ala
 130 135 140

Ala Ala Val Ala Ile Leu Gln Ser Trp Leu Asp Glu Arg Leu Ala Ala
 145 150 155 160

Met Ala Gly Thr Gln Glu Gly Ser Asp Ala
 165 170

<210> 64

<211> 510

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 64
 gtggtcccag cacagcaccg ccgcgccgac cggcccgccg atccagcgca cgaccctgga 60
 cggggacgac gctcgggtat cgacgtgggc gccgcgcgta tcggcgtggc ttgcagcgac 120
 ccggacgcga tottgccac ccgggtggaa acggtgcgcc gcgacgttc cggcaagcac 180
 ctgcgcaggc tggctgcgct ggccgcgcgag ttggaggcgg tcgaggtgat cgtcgggctc 240
 ccgcgcacgc tggccgaccg catcgccgc tcggcccaag acgcaatcga actggccgag 300
 gcgctggcac gccgtgttc tctacgccg gtgcggctgg ccgacgagcg gctcaccacg 360
 gtacgtgctc aacgatcttt gcggcaggcg ggggtgcggg cctccgagca gcgtgcggtg 420
 atcgaccaag cggccgcagt ggcaatactg cagagctggc tggatgaacg tctcgcggcg 480

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-90-

atggccggga ctcaagaagg ctccgatgcc

510

<210> 65

<211> 120

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 65

Met Thr Ala Pro Glu Thr Pro Ala Ala Gln His Ala Glu Pro Ala Ile
1 5 10 15

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

Trp Thr Thr Gly Leu Trp Leu Ile Ala Leu Cys Tyr Glu Ile Val Val
35 40 45

Arg Tyr Val Val Lys Val Asp Asn Pro Pro Thr Trp Ile Gly Val Val
50 55 60

His Gly Trp Val Tyr Phe Thr Tyr Leu Leu Leu Thr Leu Asn Leu Ala
65 70 75 80

Val Lys Val Arg Trp Pro Leu Gly Lys Thr Ala Gly Val Leu Leu Ala
85 90 95

Gly Thr Ile Pro Leu Leu Gly Ile Val Val Glu His Phe Gln Thr Lys
100 105 110

Glu Ile Lys Ala Arg Phe Gly Leu
115 120

<210> 66

<211> 360

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 66

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-91-

atgaccgcac ccgaaacgcc cgcggcgagc cagcccgagc ctgccatcgc cgtcgagagg 60
 attogcaccg ctttgcctcg ctaccggatc atggcgtgga cgaaggccct ctggctcacc 120
 gcactgtgct acgagatcgt ggtccgctac gtctcaagg ttgacaatcc gccgacgtgg 180
 atcggtgtgg tgcacggctg ggtgtacttc acgtatctgc ttctgacgtt gaacctggcg 240
 gtcaaggtcc gctggcgct cgcgaaaaca gccggtgttc tgcctggcgg cacaattccg 300
 ctgctcgga tgcgtctga gcacttcag accaagaga tcaaggcccg cttcgggctt 360

<210> 67

<211> 122

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 67

Leu Leu Ala Thr Phe Trp Gly Trp Arg Ala Gln Gln Leu Pro Asp Gly
 1 5 10 15

Thr Val Ile Trp Thr Leu Pro Gly Asp Gln Thr Tyr Val Thr Thr Pro
 20 25 30

Gly Ser Ala Leu Leu Phe Pro Ala Leu Cys Thr Pro Thr Gly Asp Pro
 35 40 45

Pro Arg Pro Asp Pro Ala Arg Ala Asp Arg Arg Gly Gln Arg Thr Ala
 50 55 60

Met Met Pro Arg Arg Ala Ser Thr Arg Ala Gln Asn Arg Ala His Tyr
 65 70 75 80

Ile Ala Ala Glu Arg His Arg Asn His Gln Ala Arg Arg Ile Ala His
 85 90 95

Val Val Thr Gln Thr Ala Thr Thr Ala Pro Glu Thr Asn Gly Pro Pro
 100 105 110

Pro Asp Pro Asp Asp Asp Pro Pro Pro Phe
 115 120

<210> 68

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-92-

<211> 366

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

```

<400> 68
ttgctggcca cttctgggg ctggcgcgcc cagcaactgc cgcacggcac cgtgatttgg 60
acgctgccgg gtgaccagac ctatgtcacc accccgggca gcgcgctgct gttcccgggc 120
ctgtgcaccc ccaccggtga cccacctga cccgacccgg cccgcgcga cgcgcgcggg 180
cagcgcaccc cgatgatgcc gcgcggggcc agcaccggag cgcacacccg cgcacctac 240
atcgcccgcc aacgccaccg caaccacca gcccgccgga ttgcccacgt ggtcacccaa 300
accgccacaa cgcgcccgga gactaacggc ccaccaccg atcccgacga cgcacccggc 360
cccttc 366

```

<210> 69

<211> 208

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 69

```

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

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-93-

His Arg Ser Gly Thr Leu Ala Gln Pro Val Arg Ala Ala Ala Thr
 100 105 110

Gly Val Pro Val Leu Ile Glu Val Asp Leu Ala Gly Ala Arg Ala Ile
 115 120 125

Lys Lys Thr Met Pro Glu Ala Val Thr Val Phe Leu Ala Pro Pro Ser
 130 135 140

Trp Gln Asp Leu Gln Ala Arg Leu Ile Gly Arg Gly Thr Glu Thr Ala
 145 150 155 160

Asp Val Ile Gln Arg Arg Leu Asp Thr Ala Arg Ile Glu Leu Ala Ala
 165 170 175

Gln Gly Asp Phe Asp Lys Val Val Val Asn Arg Arg Leu Glu Ser Ala
 180 185 190

Cys Ala Glu Leu Val Ser Leu Leu Val Gly Thr Ala Pro Gly Ser Pro
 195 200 205

<210> 70

<211> 624

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 70
 gtgagcgtcg gcgaggagacc ggacaccaag cccaccgcgc gtggccaacc ggcggcagtg 60
 ggacgtgtgg tgggtgtgtc cggtccttcc gcggtcggca aatccacggt gggtcgtgtg 120
 ctgcgcgagc ggatcccga tctgcatttc agtgtctcgg ccacgacgcg ggcgcacgc 180
 ccgggcgagg tcgacgggtg cgactaccac ttcacgacc ccacccgctt tcagcagctc 240
 atcgaccagg gtgagttgct ggaatgggca gaaatccacg gcggcctgca ccggtcgggc 300
 actttggccc agccggtgcg ggcggccgcg gcgactggtg tgccggtgct tatcgaggtt 360
 gacctggccg gggccagggc gatcaagaag acgatgcccg aggtgtgcac cgtgtttctg 420
 gcgccacctt gctggcagga tcttcaggcc agactgattg gccgcggcac cgaacagct 480
 gacgttatcc aacgcccgcct ggacaccgcg cggatcgaat tggcagcgca gggcgacttt 540

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-94-

gacaaggctcg tggtagaacag gcgattagag tctgcgtgtg cgggaattggt atccttgctg 600
 gtgggaacgg caccgggctc cccg 624

<210> 71

<211> 122

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 71

Met Thr Lys Lys Pro Arg Asn Pro Ala Asp Tyr Val Ile Gly Asp Asp
 1 5 10 15

Val Glu Val Ser Asp Val Asp Leu Lys Gln Glu Glu Val Tyr Val Asp
 20 25 30

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

Leu Arg Leu Ala Arg Glu Arg Glu Ala Asn Leu Ile Pro Gly Gly Lys
 50 55 60

Ser Leu Ser Gly Gly Ser Ala His Ser Pro Ala Val Gln Val Val Val
 65 70 75 80

Ser Lys Ala Thr His Ala Lys Leu Lys Glu Leu Ala Arg Ser Arg Lys
 85 90 95

Met Ser Val Ser Lys Leu Leu Arg Pro Val Leu Asp Glu Phe Val Gln
 100 105 110

Arg Glu Thr Gly Arg Ile Leu Pro Arg Arg
 115 120

<210> 72

<211> 366

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-95-

<400> 72
 atgacgaaga agccacgtaa cccgcgcgac tacgtgatcg gcgacgatgt cgaggtgtct 60
 gacgtcgatc tcaagcaaga ggaggtctat gtcgatggcg agcggctaac ggacgagcgc 120
 gtcgagcaga tggcttcaga gtcgctgcgg ctggcgcgcg aacgagaagc caacctgatt 180
 cctggcgga agtctctgtc cggcggtctt gcgcactcgc cggctgtgca ggtggtcgtt 240
 tcgaaggcta cccacgcaaa gctcaaggag ctggcgcgca gccggaagat gagcgtatct 300
 aagctgctgc gtcccgtgct cgacgagttc gtacagcgag aaacgggtcg gattctccca 360
 cggcgt 366

<210> 73

<211> 333

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 73

Met Phe Tyr Asp Asp Ala Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly Arg Lys
 1 5 10 15

Val Gly Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ser Leu Ser
 20 25 30

Leu Arg Asp Ser Gly Val Gln Val Arg Val Gly Leu Lys Gln Gly Ser
 35 40 45

Arg Ser Arg Pro Lys Val Glu Glu Gln Gly Leu Asp Val Asp Thr Pro
 50 55 60

Ala Glu Val Ala Lys Trp Ala Asp Val Val Met Val Leu Ala Pro Asp
 65 70 75 80

Thr Ala Gln Ala Glu Ile Phe Ala Gly Asp Ile Glu Pro Asn Leu Lys
 85 90 95

Pro Gly Asp Ala Leu Phe Phe Gly His Gly Leu Asn Val His Phe Gly
 100 105 110

Leu Ile Lys Pro Pro Ala Asp Val Ala Val Ala Met Val Ala Pro Lys
 115 120 125

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-96-

Gly Pro Gly His Leu Val Arg Arg Gln Phe Val Asp Gly Lys Gly Val
 130 135 140
 Pro Cys Leu Val Ala Val Glu Gln Asp Pro Arg Gly Asp Gly Leu Ala
 145 150 155 160
 Leu Ala Leu Ser Tyr Ala Lys Ala Ile Gly Gly Thr Arg Ala Gly Val
 165 170 175
 Ile Lys Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe Gly Glu
 180 185 190
 Gln Thr Val Leu Cys Gly Gly Thr Glu Glu Leu Val Lys Ala Gly Phe
 195 200 205
 Glu Val Met Val Glu Ala Gly Tyr Pro Ala Glu Leu Ala Tyr Phe Glu
 210 215 220
 Val Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu Gly Gly
 225 230 235 240
 Leu Ala Arg Met Tyr Tyr Ser Val Ser Asp Thr Ala Glu Phe Gly Gly
 245 250 255
 Tyr Leu Ser Gly Pro Arg Val Ile Asp Ala Gly Thr Lys Glu Arg Met
 260 265 270
 Arg Asp Ile Leu Arg Glu Ile Gln Asp Gly Ser Phe Val His Lys Leu
 275 280 285
 Val Ala Asp Val Glu Gly Gly Asn Lys Gln Leu Glu Glu Leu Arg Arg
 290 295 300
 Gln Asn Ala Glu His Pro Ile Glu Val Val Gly Lys Lys Leu Arg Asp
 305 310 315 320
 Leu Met Ser Trp Val Asp Arg Pro Ile Thr Glu Thr Ala
 325 330
 <210> 74
 <211> 999
 <212> DNA

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-97-

<213> Mycobacterium tuberculosis

```

<400> 74
atgttctacg acgacgacgc agacctgtcg atcattcagg gccgcaaggt tgggtgtgac 60
ggctacggca gccaggggca cgcgcactcg ctaagcctgc gcgactcggg tgtgcaggtg 120
cgcgtcgggc tgaagcaggg ttgcggtcg cgsgccaagg tagaagagca gggcctggac 180
gtcgacactc ccgccgaggt cgccaaatgg gccgatgtgg tcatgggtgt ggcccccgac 240
accgcccagg ccgagatctt cgcaggagac atcgaacca acctcaagcc cggtgacgcg 300
ctgttcttcg gtcacggact caacgttcac ttccgcttga tcaagccgcc cgcgcacgtc 360
gccgtcgcgga tggtcgcccc gaagggacgg ggtcatttgg tgcgccgcca gttcgtcgac 420
ggcaagggtg tgcggtgttt ggttcgggta gacgagatc cgcgaggcga cggcttggcg 480
ctggcgctgt cgtatcccaa agcgcacggc ggcaaccggg cggcgctcat caagacgacg 540
ttcaaaagcg agaccgaaac cgacctgttc ggtgagcaaa cgggtgttgt cggcggcacc 600
gaggaatttg tcaaggccgg gttcgaggtc atggtcgaa cggcctacc cgcggaattg 660
gcctacttcg aggtgctgca cgagctgaag ctgatcgtc acttgatga caggggtggc 720
ctggcgcgga tgtactactc ggtgtcggac accgcggaat tcggcggtta cctctcaggc 780
ccgcgcgtca tcgatccgg caccagggag cggatgcgcg acatcctcgc ggagatccag 840
gacggtagct ttgtccacaa gctggtcgcc gacgtcgagg gcgcaacaa acagctcgaa 900
gagttgcgcc ggcaaaacgc cgagcaccgc atcgaggtcg tcgcaagaa actccgcgac 960
ctgatgagct gggtaggacg ccgcatcacc gagacggcc 999

```

<210> 75

<211> 258

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 75

```

Met Pro Pro Leu Thr Ser Leu Ala Pro Thr Thr Ala Glu Arg Ile Arg
1          5          10          15

```

```

Ser Ala Cys Ala Arg Ala Gly Gly Ala Leu Leu Val Val Glu Arg Glu
20          25          30

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-98-

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-99-

<210> 76

<211> 774

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 76

```
atgccgcgcgc tcaccagtct cgcgccgact actgccgagc gaattcgag cgcctgcgcg    60
cgggcggggg gcgccttgct ggtggttgag cgggaggatc cggccccgt gcccatcac    120
cattgttgtt acgacgggtc cttcgccgtg gcggttccgg tcgacgtgg cgaggtgtcc    180
ggttcgcaag cgtctctgga gttgactgac tatgcgcgc tgccggtgcg tgaaccgcgc    240
cgttcgctgg tctggatccg cggctgcctc caccagatcc cgcgcgcaga gctggttag    300
acctgggacc tgatgcgcc cgaataatcc aatccggccc tgctacaagt cgagaccccg    360
aggcccgggc cggccgatgc ggcggagacc cgtatacca tgcagcggct ggagatcgaa    420
tcgtagtgg tgaccgacgc caccggcgcc gaaccgtta cgtggcgga cctgctcgcg    480
gcccgaaccc atccgttttg tgaatcgaa tcaacctgc tetggcacct agccacccgc    540
catgacgatg tggtcgcgc gctggtatcc aggtgcgcg caccgctacg acgcggacag    600
atccgcccc tcgctctcga tcgtaacggc gtccggttc gcattgaagc tcgcgacgga    660
gaccgcgaca tcgactgcc gttccataag ccggtggacg acatgacccg gctaagccag    720
gccatccggg tgctcatggg ttgccgttc cgcaacgggc tgcgcgcgcg cagg        774
```

<210> 77

<211> 384

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 77

```
Met Arg Ala Lys Arg Glu Ala Pro Lys Ser Arg Ser Ser Asp Arg Arg
1           5           10          15
```

```
Arg Arg Ala Asp Ser Pro Ala Ala Ala Thr Arg Arg Thr Thr Thr Asn
```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-100-

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-101-

Asp Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ser Gly Pro Glu Val Leu Val Arg Thr
 260 265 270

Pro Asp Gly Thr Ala Thr Leu Gly Gly Ala Thr His Leu Pro Thr Gln
 275 280 285

Ala Gly Pro Gln Leu Pro Gly Pro Val Pro Ile Pro Gly Ala Pro Gly
 290 295 300

Pro Met Pro Ala Pro Pro Leu Gly Ala Val Pro Ser Pro Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Glu Asn Pro Val Pro Leu Gln Val Gly Ala Ala Pro Pro Ala Gly Leu
 325 330 335

Pro Gly Pro Ala Pro Val Ala Ala Thr Pro Gly Leu Ser Gly Gly Ser
 340 345 350

Gln Pro Met Val Ala Pro Pro Ala Pro Val Pro Ala Asn Gly Glu Gln
 355 360 365

Phe Gly Pro Val Thr Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Gly Ala Pro Arg
 370 375 380

<210> 78

<211> 1152

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 78
 atgagggccca agcgtgaggc accgaaaagc cgcagcagcg atcgtcgccg gagagccgac 60
 agtcctgccg cggcgacgag gcgaacgact acgaactcgg cgcgtcgcg ccgcatccgg 120
 agccgtgccg gcaagacctc ggcacccggc cggcaggccc gsgtgctcgg ccttggaacc 180
 caaacccagcc cgtatgctcag ccgtttcgac cggccggccc ccgcaaagaa caccagccag 240
 gccaggccgc gggccaaggc ccgaaaagcc aaggcgccca agctgggtccg tcttacgccg 300
 atggagcgctc tcgcccgcgg gctcacgtcg atcgacctgc ggccgcgcac gttggcaaac 360
 aagggtccgt ttgtgtgct ggttatcggt tcgctcggcg tcggactagg cctcacactg 420
 tggttgtcca ccgatgccgc cgagaggtcc taccagctga gcaacgccc ggagcggacc 480

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-102-

```

cggatgctgc agcagcacaa ggaagcgctg gaacgcgacg tacgcgaggc tgcgtcggcg   540
ccggcgctgg ccgagcgccg tcgtcgccag ggcgatgcc cgacgagggg taccgcccac   600
ctggttcagg atccggacgg caattgggtg gtggtcggta caccgaagcc ggctgacgga   660
gttcacccgc cgcgctgaa cacgaagtgc ccgaagatc cgcgcgcgcc ccgaaaccc   720
gcggcggtgc cctcgaggt gccggtccgg gtgacaccag gcccgatga tcccgctccg   780
ccgcccgggt ctggcccgga ggtgctggtg cgtacccag acggcacagc gacgctgggc   840
ggcgcaaccc acctgcccac ccaggccggc ccgcagctgc ccggtccggt gccgatacct   900
ggggcgccgg gtccgatgcc ggctcctccg ctcgggcgag tgcctatccc ggcaccagcg   960
gaaaatccgg tgcgctcca ggtgggtgcg gcgcccgcgg ccgggctccc tggaccagca  1020
ccggtgctgc cgacgccggg gctgtcgggt gggtcgcaac ccattggtgc accaccgct  1080
ccagtgcggg ccaacggcga acagttcggg cccgtcacgg cgcgggtgcc aacggcgccg  1140
ggggctccca gg                                     1152

```

<210> 79

<211> 346

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 79

```

Met Asn Gly Leu Gly Asp Val Leu Ala Val Ala Arg Lys Ala Arg Gly
1           5           10           15

```

```

Leu Thr Gln Ile Glu Leu Ala Glu Leu Val Gly Leu Thr Gln Pro Ala
20           25           30

```

```

Ile Asn Arg Tyr Glu Ser Gly Asp Arg Asp Pro Asp Gln His Ile Val
35           40           45

```

```

Ala Lys Leu Ala Glu Ile Leu Gly Val Thr Asp Asp Leu Leu Ile His
50           55           60

```

```

Gly Asn Arg Phe Arg Gly Ala Leu Ala Val Asp Ala His Met Arg Arg
65           70           75           80

```

```

His Lys Thr Thr Lys Ala Ser Ala Trp Arg Gln Leu Glu Ala Arg Leu

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-103-

85	90	95
Asn Leu Leu Arg Val His Ala Ser Phe Leu Phe Glu Glu Val Ala Ile		
100	105	110
Asn Ser Glu Gln His Val Pro Ala Phe Asp Pro Glu Phe Thr Ala Ala		
115	120	125
Glu Asp Ala Ala Arg Leu Val Arg Ala Gln Trp Arg Met Pro Met Gly		
130	135	140
Pro Val Val Asn Leu Thr Arg Trp Met Glu Ala Ala Gly Cys Leu Val		
145	150	155
Phe Glu Glu Asp Phe Ala Thr Gln Arg Ile Asp Gly Leu Ser Gln Trp		
165	170	175
Val Asp Asp Tyr Pro Val Met Leu Ile Asn Ala Asn Ala Ala Pro Asp		
180	185	190
Arg Lys Arg Leu Thr Leu Ala His Glu Leu Gly His Leu Val Leu His		
195	200	205
Ser Thr Asn Pro Thr Glu Asn Met Glu Thr Glu Ala Thr Ala Phe Ala		
210	215	220
Ala Glu Phe Leu Met Pro Glu Ser Glu Ile Arg Pro Glu Leu Arg Arg		
225	230	235
Leu Asp Leu Gly Lys Leu Leu Glu Leu Lys Arg Glu Trp Gly Val Ser		
245	250	255
Met Gln Ala Leu Leu Ala Arg Ala Tyr Arg Met Gly Leu Val Ser Ala		
260	265	270
Glu Ala Arg Thr Lys Leu Tyr Lys Ala Met Asn Ala Arg Gly Trp Lys		
275	280	285
Thr Lys Glu Pro Gly Ile Glu Ser Ile Val Arg Glu Lys Pro Ser Leu		
290	295	300
Pro Ala His Ile Gly Met Thr Leu Arg Ser Arg Gly Phe Thr Asp Gln		
305	310	315
		320

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-104-

Gln Ala Ala Ala Ile Ala Gly Tyr Ala Asn Pro Ala Asp Asn Pro Phe
 325 330 335

Arg Pro Glu Gly Gly Arg Leu His Ala Ile
 340 345

<210> 80

<211> 1038

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 80

```

atgaacggcc tgggagagct gctcgggctc gcccggaagg ctggtggact caccagatc   60
gaattggcgc agctggtggg actcaccag cggcgatca accggtacga atcaggcgao   120
cgtgacccgc accaaccacat cgtggccaag ctggccgaaa tctcgggtgt gaccgacgat   180
ctgctcatac acgggaacag gtctcgaggt gcgctcgag tcgatcgca tatgcgcgc   240
cacaagacca cgaaggcgte ggctggcgt cagctggagg ccggttgaa cctgttgcc   300
gtgcacgcgt cattctctt cgaggagtg gctatcaata gcgagcaaca tgtgccgcg   360
ttcgacccgc agttcaccgc cgcggaggac gccgccggt tagtccgtgc ccagtgggc   420
atgcgatgg gcccggtcgt caacctgacc cggtgatgg aggcgcggg ctgcctggtg   480
ttcgaagagg acttcgccac ccagcgcatc gacgggttgt cgcagtgggt cgacgactac   540
cccgatcatgc tgaatcaagg caacgcagca cccgacggaa aacgcttgac ccttgccac   600
gaactcgcc acctcgtgct gcaattccac aacccacgg agaactgga gaccgaagcc   660
accgccttcg ccgcgagtt totcatgcc gagagcgaga ttcgcccca gctgcgtcgg   720
ctcgatctcg gcaagttgct cgaactgaaa cgggaatggg gcgtctcgat gcaagccctc   780
ctggcgcggg catatcgcat gggcctggta tggcgagg ctgcaccaa gctctacaag   840
gcgatgaacg cgcgcggctg gaaaaccaa gagccaggca tcgagtcct cgtgcgagaa   900
aaaccgagcc taaccgcca catcgcatg acactccgaa gccgcggatt caccgaccag   960
caagcgcgcg ccacgcgcg atacgccaat cctgcggaca atccattccg ccccgaaagt  1020
ggcgcctcc atgcgatt                                     1038

```

<210> 81

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-105-

<211> 139

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 81

Met Ile Val Asp Thr Ser Ala Val Val Ala Leu Val Gln Gly Glu Arg
1 5 10 15

Pro His Ala Thr Leu Val Ala Ala Leu Ala Gly Ala His Ser Pro
20 25 30

Val Met Ser Ala Pro Thr Val Ala Glu Cys Leu Ile Val Leu Thr Ala
35 40 45

Arg His Gly Pro Val Ala Arg Thr Ile Phe Glu Arg Leu Arg Ser Glu
50 55 60

Ile Gly Leu Ser Val Ser Ser Phe Thr Ala Glu His Ala Ala Thr
65 70 75 80

Gln Arg Ala Phe Leu Arg Tyr Gly Lys Gly Arg His Arg Ala Ala Leu
85 90 95

Asn Phe Gly Asp Cys Met Thr Tyr Ala Thr Ala Gln Leu Gly His Gln
100 105 110

Pro Leu Leu Ala Val Gly Asn Asp Phe Pro Gln Thr Asp Leu Glu Phe
115 120 125

Arg Gly Val Val Gly Tyr Trp Pro Gly Val Ala
130 135

<210> 82

<211> 417

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 82

atgatcgtgg acacaagcgc cgtggtggcc ctggttcaag gcgagcggcc gcacgccacc 60

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-106-

```

ctggtcgagg cggccctggc cggcgcccat agccccgtca tgtctgcacc caccgtcgcc 120
gaatgcctga ttgtcttgac cggccgtcac ggcccgcttg cgcgcacgat ctgcgaacga 180
cttcgcagcg aaatcggett gagcgtgtca tctttcaccg ccgagcatgc cgtgcccacg 240
caacggagcct ttctgcgata cggcaagggg cggcaccgcy cggtctctaa cttcggagac 300
tgtatgacgt acgcgaccgc ccagctgggc caccaaccac tgcctggcgt cggcaacgac 360
ttcccgcaaa ccgaccttga gttccgggc gtcgtcggt actggccagg cgtcgcg 417

```

<210> '83

<211> 376

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 83

```

Leu Ile Cys Phe Asp Asp Val Ser Lys Val Tyr Ala His Gly Ala Thr
1           5           10          15

```

```

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

```

```

Phe Val Gly Pro Ser Gly Cys Gly Lys Thr Thr Ala Leu Arg Met Ile
35          40          45

```

```

Asn Arg Met Val Asp Pro Thr Ser Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Thr
50          55          60

```

```

Asp Val Ser Thr Val Asn Ala Val Lys Leu Arg Leu Gly Ile Gly Tyr
65          70          75          80

```

```

Val Ile Gln Asn Ala Gly Leu Met Pro His Gln Arg Val Ile Asp Asn
85          90          95

```

```

Val Ala Thr Val Pro Val Leu Lys Gly Gln Pro Arg Arg Ala Ala Arg
100         105         110

```

```

Lys Ala Gly Tyr Glu Val Leu Glu Arg Val Gly Leu Asp Pro Lys Val
115        120        125

```

```

Ala Thr Arg Tyr Pro Ala Gln Leu Ser Gly Gly Glu Gln Gln Arg Val

```


WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-107-

130 135 140
 Gly Val Ala Arg Ala Leu Ala Ala Asp Pro Pro Ile Leu Leu Met Asp
 145 150 155 160
 Glu Pro Phe Ser Ala Val Asp Pro Val Val Arg His Glu Leu Gln Asn
 165 170 175
 Glu Ile Leu Arg Leu Gln Ala Glu Leu His Lys Thr Ile Val Phe Val
 180 185 190
 Thr His Asp Ile Asp Glu Ala Leu Lys Leu Ala Asp Leu Val Ala Val
 195 200 205
 Phe Ala Pro Gly Gly Ala Leu Ala Gln Tyr Asp Glu Thr Ala Arg Leu
 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Ala Asn Asp Phe Val Ser Lys Phe Ile Gly Leu Gly
 225 230 235 240
 Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Gln Leu Phe Asp Ala Ala Gly Leu Pro Val
 245 250 255
 Arg Asp Ile Glu Gln Val Ser Val Asn Gly Leu Ser Asp Ala Arg Asp
 260 265 270
 Arg Gln Val Arg Asp Gly Trp Val Leu Val Val Asp Gly Ala Gly Ala
 275 280 285
 Pro Leu Gly Trp Ile Asp Ala Asp Gly Arg Arg Arg His Arg Gly Gly
 290 295 300
 Ala Ala Leu Ser Asp Ala Met Thr Val Gly Gly Ser Val Phe Arg Pro
 305 310 315 320
 Asn Gly Asn Leu Ser Gln Ala Leu Asp Ala Ala Leu Ser Ser Pro Ser
 325 330 335
 Gly Val Gly Val Ala Val Asp Gly Gly Gly Lys Val Ile Gly Gly Ile
 340 345 350
 Leu Ala Ala Asp Val Leu Ala Glu Phe Gln Lys Gly Lys Lys Ala Gly
 355 360 365

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-108-

Gly Gly Ala Lys Pro Cys Thr Thr
370 375

<210> 84

<211> 1128

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 84

ttgatctgct ttgacgatgt cagcaaggtg tacgcacacg gtgccaccgc cgtagaccgg 60
ctgacgctgg aagtcacctaa cggcatgctg accgtcttcg tcggcccttc cggctgcggc 120
aagacgacgg cgtgcgaat gatcaacga atggtggato cgacctcggg caccatcaact 180
gtcgacgta ccgacgtgc gacgtcaat gcggtgaagc tgcgcctggg aattggctat 240
gtcatccaga acgcggggct gatgcctcat caacgggtca tcgacaacgt cgcaacgggtg 300
ccggtgctga agggtcagcc gcgcgggca gcccgcaaag ccggttatga ggtgcttgag 360
cgtgtcgggc tggaccctaa ggtgccacc cgctaccggg ccagctcttc gggcggcgaa 420
cagcaacggg tcggcgtggc acgggcaact gcggccgac cgccgatctt gttgatggac 480
gagccgttct cggcgtcga ccgggtggtt cgcacgagc tacagaacga aatacttcgt 540
ctgcaagcgg agttgcacaa gaccattgto ttctgacgc acgacatcga cgaggcgttg 600
aagctcggcg atctggtggc ggtgttcgco ccgggcggcg cgttcgcga gtacgaagaa 660
actgcccggc tgttatccag tccggcgaat gacttcgtgt cgaagtcat cggctctcgt 720
cgcggtatc ggtggtgca gctgttcgac gcggccggac tacctgtgcg cgacatcgag 780
caagtctcgg tgaacggcct ttccgatgcc cgggacaggg aagttcgtga cggctgggtg 840
ctggtggtcg acggtcgggg tgcgcgttg ggtggatcg acgccgatgg ccggcggcgt 900
cacgcggggc gcgcggcatt gtggatgcc atgaccgtcg gcggttcggt gttccgccc 960
aacggttaac tcagccaggc gctggacgcc gccctgtcct cgcgtcggg ggtcgggtgc 1020
gccgttgacg gcggtgacaa ggtcatcggc gggatactgg ccgccgagc gctggccgag 1080
ttccaaaaag gcaagaaggc cggcggcgga gctaagccat gcactacc 1128

<210> 85

<211> 145

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-109-

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 85

Val Ser Glu Thr Phe Asp Val Asp Val Leu Val His Ala Thr His Arg
1 5 10 15

Ala Ser Pro Phe His Asp Lys Ala Lys Thr Leu Val Glu Arg Phe Leu
20 25 30

Ala Gly Pro Gly Leu Val Tyr Leu Leu Trp Pro Val Ala Leu Gly Tyr
35 40 45

Leu Arg Val Val Thr His Pro Thr Leu Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro
50 55 60

Glu Val Ala Val Glu Asn Ile Glu Gln Phe Thr Ser Arg Pro His Val
65 70 75 80

Arg Gln Val Gly Glu Ala Asn Gly Phe Trp Pro Val Tyr Arg Arg Val
85 90 95

Ala Asp Pro Val Lys Pro Arg Gly Asn Leu Val Pro Asp Ala His Leu
100 105 110

Val Ala Leu Met Arg His His Gly Ile Ala Thr Ile Trp Ser His Asp
115 120 125

Arg Asp Phe Arg Lys Phe Glu Gly Ile Arg Ile Arg Asp Pro Phe Ser
130 135 140

Gly
145

<210> 86

<211> 435

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-110-

<400> 86
 gtgagcgaaa cctttgacgt cgtatgtctg gtccatgcga cgcaccgagc cagcccgttt 60
 caccgataagg cgaagacgct cgttgagcga ttcttggtg gcccaggggt ggtatatata 120
 ttgtggcccg tcgcgtggg ttatctacgg gttgtcacc atccgacgtt gttgggtgcy 180
 ccgtggcgc ctgaggtcgc cgtcgaaaac atcgagcaat tcacctcacy accgcacgtg 240
 cggcaggtcg gcgaggccaa cggattctgg ccgtctatc gccgagtagc cgaccggtc 300
 aagccgcgag gcaatctggt tcccgacgc caccctgctg cgtctatgcy ccatacagcg 360
 atcgccacga tctggagtoa cgaccgcgac ttccgcaagt tcgagggcat tagaattcgc 420
 gaccccttct ccggc 435

<210> 87

<211> 185

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 87

Met Ser Arg Gln Trp His Trp Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ile Thr
 1 5 10 15

Thr Ala Ala Cys Ser Arg Pro Gly Thr Glu Glu Pro Asp Cys Pro Thr
 20 25 30

Lys Ile Thr Leu Pro Pro Gly Ala Thr Pro Thr Thr Thr Leu Asp Pro
 35 40 45

Arg Cys Ile Val Arg Ala Thr Thr Thr Gly Thr Ala Asp Gly Asp Ala
 50 55 60

Ala Ser Arg Trp Thr Gly Thr Val Arg Ile Ala Gly Phe Tyr Ala Ser
 65 70 75 80

Ile Cys Asn Ala Val Trp Asp Gly Asn Val Ser Leu Ala Gly Lys Asp
 85 90 95

Glu Leu Thr Gly Lys Ala Thr Leu Ile Leu Val Glu Thr Ser Cys Pro
 100 105 110

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-111-

Gly Lys Val Val Ala Gly Glu Leu Val Leu Lys Gly Asn Val Gly Ser
 115 120 125

Asp Ser Leu Ala Ile Thr Trp Ala His Pro Glu Leu Pro Gln Arg Ala
 130 135 140

Phe Asp Leu Gly Ala Gly Gln Gly Thr Ile Arg Arg Ser Gly Asp Arg
 145 150 155 160

Ala Glu Gly Thr Phe Asn Ser Asp Met Gly Gly Gly Thr Glu Phe Phe
 165 170 175

Leu Thr Trp Ser Leu Thr Met Arg Asn
 180 185

<210> 88

<211> 555

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 88
 atgagtcgac agtggcactg gctggcagcg acgctgctcc tgatcaccac cgcgcgctgc 60
 agtcgtccgg gcaccgagga accggattgc ccgacgaaaa taaccttgc gcccggtgct 120
 acgcccacca cgacctcga ccgagatgc atagtgcgcg cgaccaccac cggcacagcc 180
 gacggcgatg cggcgctcgcg ctggaccgga accgtgcgga tcgccgggtt ctatgcctcg 240
 atctgcaacg cggtatggga cgggaacgtc agccttcgga gaaaggacga gctgaccggc 300
 aaggctacgc ttatcctcgt cgaaccaggt tgcccgggca aggttgctgc cggcgaactc 360
 gtgctgaagg ggaacgtcgg ttccgacaga ctgcgatca cctggggcga cccgaactc 420
 ccgcagcggg cgttcgacct cggcgccgga cagggcacga tccgcgacg gggcgaccgt 480
 gccgagggaa cgttcaactc ggatatgggt gggggcaccg agttcttctt gacgtggtcg 540
 ctgacgatgc gtaac 555

<210> 89

<211> 219

<212> PRT

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-112-

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 89

Met Ala Val His Gly Phe Leu Leu Glu Arg Val Ser Val Val Arg Asp
 1 5 10 15

Glu Ala Thr Val Leu Arg Gln Val Ser Ala His Phe Pro Ala Gly Arg
 20 25 30

Cys Ser Ala Val Arg Gly Ala Ser Gly Ser Gly Lys Thr Thr Leu Leu
 35 40 45

Arg Leu Leu Asn Arg Leu Ile Asp Pro Thr Ser Gly Lys Val Trp Leu
 50 55 60

Asp Gly Val Pro Leu Thr Asp Leu Asp Val Leu Val Leu Arg Arg Arg
 65 70 75 80

Val Gly Leu Val Ala Gln Ala Pro Val Val Leu Thr Asp Ala Val Leu
 85 90 95

Asn Glu Val Arg Val Gly Arg Pro Asp Leu Pro Glu Gly Arg Val Thr
 100 105 110

Glu Leu Leu Ala Arg Leu Cys Leu Gly Gln Ser Ala Arg Glu Ala Phe
 115 120 125

Leu Pro His Gln Arg Ser Ala Leu Arg Thr Ala Leu Ile Pro Ala Ile
 130 135 140

Asp Ser Thr Lys Val Val Gly Leu Ile Ser Leu Pro Gly Ala Met Ser
 145 150 155 160

Gly Leu Ile Leu Ala Gly Val Asp Pro Leu Thr Ala Ile Arg Tyr Gln
 165 170 175

Ile Val Val Met Tyr Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ala Val Ala Ala Leu
 180 185 190

Thr Cys Ala Arg Leu Ala Glu Arg Ala Leu Phe Asp Arg Ala His Arg
 195 200 205

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-113-

Leu Val Ser Leu Pro Ala Ala Thr Arg Arg Ala
 210 215

<210> 90

<211> 657

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 90
 atggcgggtgc atggtttctc gctcgaacgg gtcagcgtgg tgcgcgacga ggcgacgggtg 60
 ctgcggcagg tcagcgcgca ttttcccgcct ggccgctgca gtgcggtgcg gggcgccagc 120
 ggatcgggaa agaccacgct gctgcggttg ctgaaccggc tcacgatcc gacgtccgga 180
 aaagtctggc ttgacggtgt gccgctcacc gatctggatg tgctcgtgtt acgtcggcgg 240
 gtcggcctgg ttgcgcaggc tcccgtggtg cttaccgatg cgggtgtcaa tgaggttcgc 300
 gtcggacgcc cggacctgcc agaaggctga gtgaccgagc tgctggcgcg gctggtgtc 360
 ggccagtcgc cagcgaagc gttcttgccg caccaacgat ccgccttgcg cactgcgctg 420
 ataccgcga tcgactccac gaaagtctgt gggtgatta gccttccggg tgcgatgtcc 480
 ggacttatcc tggcgggggt cgaccogctg accgcgatcc gctaccaaat cgtggtgatg 540
 tacctgtctc tcgccgcoac cgcgggtggca gcgtgacct gtgcacgctt ggtgaaact 600
 gcctatttcg accgcgcgca ccggctcgtt tcgtgcccgc cggcgactcg tcgggca 657

<210> 91

<211> 358

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 91

Val Arg Ala Arg Phe Gly Asp Arg Ala Pro Trp Leu Val Glu Thr Thr
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Arg Arg Ala Ala Gly Lys Leu Gly Glu Leu Cys Pro Asn
 20 25 30

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-114-

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-115-

Gly Asp Arg Leu Pro Pro Ala Leu Arg Gly Phe Glu Val Leu Glu Gln
 275 280 285

Leu Ala Phe Asp Glu Arg Arg Leu Arg Gln Val Leu Ser Ala Leu Asp
 290 295 300

Cys Gly Ala Ala Glu Ile Leu Val Arg Gly Val Ala Ile Asp Pro Asp
 305 310 315 320

Ala Leu Arg Arg Arg Leu Arg Leu Arg Gly Ser Arg Pro Leu Ala Val
 325 330 335

Val Ile Thr Arg Ile Gly Ala Gly Ser Leu Ser His Val Thr Ala Tyr
 340 345 350

Val Cys Arg Pro Ser Arg
 355

<210> 92

<211> 1074

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 92
 gtggcgcccc gggttgccga tcgggcgcgc tggctgggtg agaccacgct gctgcgcgcg 60
 cgcgcgcgcgc gcaaacctggg cgagctgtgt ccgaacgttg ggggtgtcga atggctattc 120
 accgatgagg cgtgcagca ggctaccgca gcaccggtgg cccggcaccg ggccaggcga 180
 ctggccggtc gggtagtgca cgacgcgacc tgctccatcg gcaccgagct ggccgcgctg 240
 cgcgagctag ctgtccgggc ggtcggcage gatatcgacc cgggtcggct ggccatggcg 300
 cgcacaacc tggccgccct gggaaatgaa gctgacctgt gccgcgcga tgtgtgcat 360
 cgggtgacct gcgacgcggt cgtcgtcatc gaccgggcgc gtcgcagcaa cgggcgcgca 420
 cgttcaccac tcgccgacta ccagcccgcc ctggggcccc tactggaccg ctaccgcgac 480
 cgtgatgtgg tcgtcaagtg cgtcccgga atagatttcg aggaggtggg ccggctcggg 540
 ttccaggggc agatcgaggt gatctcacc cgcggtgggg ttccgagaag atgtctttgg 600
 tcggccgggt tggccggatc gggatatcgc cgtcgagcca gcacccctga ttccggtgaa 660

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-116-

```

caaatcgggtg acgaacgagcc cgaacgactgc ggtgtgcggc ccgccgggaa atggatcgtc 720
gaccccgacg gcgcgcgtgt ccgtgccggc ctggtacgca actacggcgc ccggcatggg 780
ctgtggcagc tcgatcccca aatcgcttac ctgtccggtg accggctgcc gcttgcgttg 840
cgcgggttcg aggtgctcga gcagctggcc ttcgacgagc gtcggctgcg tcaggtgctg 900
tcagcgtcgg attgcggggc agccgaatc ctggtgcgcg gcgttgcat cgatcccgac 960
gctctgcggc gacggctccg gctcgggggc agcagaccgc tggcggtsgt catcaccgc 1020
attggtgccg ggtccttgag ccatgtgacc gctatgtgt gtcggccgtc ccgg 1074

```

<210> 93

<211> 471

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 93

```

Val Thr Glu Thr Ala Ser Glu Thr Gly Ser Trp Arg Glu Leu Leu Ser
1           5           10           15

```

```

Arg Tyr Leu Gly Thr Ser Ile Val Leu Ala Gly Gly Val Ala Leu Tyr
20           25           30

```

```

Ala Thr Asn Glu Phe Leu Thr Ile Ser Leu Leu Pro Ser Thr Ile Ala
35           40           45

```

```

Asp Ile Gly Gly Ser Arg Leu Tyr Ala Trp Val Thr Thr Leu Tyr Leu
50           55           60

```

```

Val Gly Ser Val Val Ala Ala Thr Thr Val Asn Thr Met Leu Leu Arg
65           70           75           80

```

```

Val Gly Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Met Gly Leu Ala Val Phe Gly Leu
85           90           95

```

```

Ala Ser Leu Val Cys Ala Ala Ala Pro Ser Met Gln Ile Leu Val Ala
100          105          110

```

```

Gly Arg Thr Leu Gln Gly Ile Ala Gly Gly Leu Leu Ala Gly Leu Gly
115          120          125

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-117-

Tyr Ala Leu Ile Asn Ser Thr Leu Pro Lys Ser Leu Trp Thr Arg Gly
 130 135 140
 Ser Ala Leu Val Ser Ala Met Trp Gly Val Ala Thr Leu Ile Gly Pro
 145 150 155 160
 Ala Thr Gly Gly Leu Phe Ala Gln Leu Gly Leu Trp Arg Trp Ala Phe
 165 170 175
 Gly Val Met Thr Leu Leu Thr Ala Leu Met Ala Met Leu Val Pro Val
 180 185 190
 Ala Leu Gly Ala Gly Gly Val Gly Pro Gly Gly Glu Thr Pro Val Gly
 195 200 205
 Ser Thr His Lys Val Pro Val Trp Ser Leu Leu Leu Met Gly Ala Ala
 210 215 220
 Ala Leu Ala Ile Ser Val Ala Ala Leu Pro Asn Tyr Leu Val Gln Thr
 225 230 235 240
 Ala Gly Leu Leu Ala Ala Ala Ala Leu Leu Val Ala Val Phe Val Val
 245 250 255
 Val Asp Trp Arg Ile His Ala Ala Val Leu Pro Pro Ser Val Phe Gly
 260 265 270
 Ser Gly Pro Leu Lys Trp Ile Tyr Leu Thr Met Ser Val Gln Met Ile
 275 280 285
 Ala Ala Met Val Asp Thr Tyr Val Pro Leu Phe Gly Gln Arg Leu Gly
 290 295 300
 His Leu Thr Pro Val Ala Ala Gly Phe Leu Gly Ala Ala Leu Ala Val
 305 310 315 320
 Gly Trp Thr Val Gly Glu Val Ala Ser Ala Ser Leu Asn Ser Ala Arg
 325 330 335
 Val Ile Gly His Val Val Ala Ala Ala Pro Leu Val Met Ala Ser Gly
 340 345 350
 Leu Ala Leu Gly Ala Val Thr Gln Arg Ala Asp Ala Pro Val Gly Ile
 355 360 365

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-118-

Ile Ala Leu Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ile Ile Gly Thr Gly Ile Gly
370 375 380

Ile Ala Trp Pro His Leu Thr Val Arg Ala Met Asp Ser Val Ala Asp
385 390 395 400

Pro Ala Glu Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ile Asn Val Val Gln Leu
405 410 415

Ile Ser Gly Ala Phe Gly Ala Gly Leu Ala Gly Val Val Val Asn Thr
420 425 430

Ala Lys Gly Gly Glu Val Ala Ala Ala Arg Gly Leu Tyr Met Ala Phe
435 440 445

Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly Val Ile Ala Ser Tyr Gln Ala Thr His
450 455 460

Arg Asp Arg Arg Leu Pro Arg
465 470

<210> 94

<211> 1413

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 94
gtgaccgaaa cagcgagcga gaccggcagc tggcgtgagc tactgagcag gtatctgggc 60
acctccatag tgctggcccg tggcgtcgcg ctttacgcca ccaacgagtt tctgacaatc 120
agcctgtgc cagcacaat cgcgcacatc ggggtagcc ggctgtacgc ctgggtgaca 180
acctgtatc tggtcgggtc ggtggtggcg ggcaccaccg tcaatacgat gttgctgcgc 240
gtcggggcgc gctcgtcgtg tctgatggcg ttggcgtctc tcggtctggc cagcctggta 300
tgtcggcgcg cgccgagcat gcagattctg gtggcgggc gtaccttgca aggaatagcc 360
ggtgggtgc tggcggscct aggcctacgc ctgateaact cgaccttgcc caagtcgctg 420
tggaccctg gctcagcact ggtgtcggcg atgtgggggg tcgcgacgct gatcggaccg 480
gcgaccggag gccttttcgc gcagctcggg ctgtggcgat gggcgttcgg cgtgatgacg 540

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-119-

```

ttgtctgaccg cgttgatggc catgttggtg ceggtcgcgc tgggtgccg gggggtcggc 600
cggggcggcg agacgccggt gggcagcaca cacaaggcgc cgggtgtggtc gctattgtctg 660
atggggggcg ccgcactggc gatcagcgtc gccgcgttc cgaactacct cgtccagacg 720
gccgggctgc tagccgcgc cgcgctgctg gttgcggtgt ttgtggtagt cgactggcgg 780
atacacgcag cgggtgtgcc gccacgcga ttgtgctcgc gaccgttgaa atggatttac 840
ctgaccatgt cgggtgcagat gattgcggca atggtcgata cctacgtgcc gctgttcggt 900
cagcgactgg gacacctgac cccgggtgca gccgggttct tgggtgccgc gctggcggcg 960
ggctggacgg tcggtgaggt ccgcagcgc tcgttgaaca gtgcacgagt tatcgggcat 1020
gtcgtggcag ccgcacgcgt ggtgatggcg tcggggttgg cgttaggcgc cgtcacccag 1080
cgcgcgatg ccgcggtggg gatcatcgcg ctgtgggcgc tggcgtgct gatcatcggg 1140
acggcatcg ggtatgcctg gcccatcta acggtgcgcg ctatggattc tgtcgcgcac 1200
ccggccgaga gcagcgcgcg gccgcggcg atcaatgtcg tacagctgat ctccggtgct 1260
ttcggcgccg ggtggcggg tgtggtggtc aacactgcca agggcgcgga agtggcggcg 1320
gctcgtggcg tatacatggc atttacggtg ctggccgcgc ctggtgtcat cgcctctac 1380
caggccacgc accgcgacgc gcgttaaccg cgt 1413

```

<210> 95

<211> 325

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 95

```

Met Thr Ser Ala Pro Ala Thr Met Arg Trp Gly Asn Leu Pro Leu Ala
1           5           10           15

```

```

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

```

```

Ala Leu Leu Ala Glu Ala Gly Val Asp Ser Ala Arg Cys Asp Ala Glu
35           40           45

```

```

Gln Leu Ala Ala His Leu Ala Gly Thr Asp Arg Gly Arg Leu Pro Leu
50           55           60

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-120-

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-121-

Leu Pro Leu Ala Gly Glu Asn Gly Ala Ile Asp Pro Arg Gln Arg Arg
 305 310 315 320

Cys Arg Ala Lys Arg
 325

<210> 96

<211> 975

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 96
 atgacctccg cgccggcgac gatcggtgg gggaaacctcc cgcttgccgg ggagagcggc 60
 acaatgacctc tgcgtcaggc gatcgacttg gctgctgcgc tatggccga agcgggggtc 120
 gactcggcgc gttgcgacgc tgaagcagtg gccgctcacc tagcgggcac agaccgcggt 180
 aggctacccc tgttcgagcc gcccgcgac gagttcttcg ggcgtatcgc cgacatcgtc 240
 accgctcgtg cgccggcgggt gccgttgtag catctcatcg ggactgtgtc gtttgggcc 300
 gtggtgtctc atgtcgcccc ggggtgtgtt gtaccgcgtc cggagaccga agccattttg 360
 gcctggggcca ccgcgcagtc gctgccggcg cggccgctga ttgtcgacgc atgcacggga 420
 tctggcgctg tggcggtcgc attggcccag caccgggcca accttggaact aaaggccgcg 480
 atcatcggga ttgacgactc cgactgcgcc ctgactatg ccgcccga tgccggcgggt 540
 accccgtag agttggtgcg tgcgacgtc accacgccc gcctgctccc cgaactcgac 600
 ggacaagtgc acctgatggt ttccaacccg cctacatcc ctgatgtgc tgttttgaa 660
 cctgaagtag cgcaacatga ccgcacacac gcgttgttcg gcggtccga cgggatgacg 720
 gtgatatccg cggctcgcg gcttgcgtgg cgtggctgc gtcccgttg cctgttcgcc 780
 gtgcgaacac acgacaccac gtctcgtca actgtcgatt tggtcagcag cacaacactt 840
 ttctgtgacg tacaagcccg gaaagatctg gccggacggc cgaggtttgt gacggcgatg 900
 aggtgggggc acctcccgct tgcaggggag aacggcgcca ttgacccgcg ccagcgacga 960
 tgcagagcga agcga 975

<210> 97

<211> 163

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-122-

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 97

Met Ser Pro Ser Pro Ala Ala Ala Asn Arg Ser Glu Val Gly Gly Pro
1 5 10 15

Leu Pro Gly Leu Gly Ala Asp Leu Leu Ala Val Val Ala Arg Leu Asn
20 25 30

Arg Leu Ala Thr Gln Arg Ile Gln Met Pro Leu Pro Ala Ala Gln Ala
35 40 45

Arg Leu Leu Ala Thr Ile Glu Ala Gln Gly Glu Ala Arg Ile Gly Asp
50 55 60

Leu Ala Ala Val Asp His Cys Ser Gln Pro Thr Met Thr Thr Gln Val
65 70 75 80

Arg Arg Leu Glu Asp Ala Gly Leu Val Thr Arg Thr Ala Asp Pro Gly
85 90 95

Asp Ala Arg Ala Val Arg Ile Arg Ile Thr Pro Glu Gly Ile Arg Thr
100 105 110

Leu Thr Ala Val Arg Ala Asp Arg Ala Ala Ala Ile Glu Pro Gln Leu
115 120 125

Ala Leu Leu Pro Pro Ala Asp Arg Arg Val Leu Ala Asp Ala Val Asp
130 135 140

Val Leu Arg Arg Leu Leu Asp His Ala Ala Thr Thr Pro Gly Arg Ala
145 150 155 160

Thr Arg Gln

<210> 98

<211> 489

<212> DNA

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-123-

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 98
 atgagtcctt cccccgcgc ccccaaccgc agcaggttcg gcgggccact accgggcttg 60
 ggagcggatc tgttggcagt ggtcgcgcgc ctcaaccgcc tagccacgca gcccatccag 120
 atgccactgc ccgcggctca agccagactg ctggccacca tcgaagccca gggggaagcc 180
 cggatcggcg acttggcgcg cgtcgatcac tgctcgcaac caacgatgac caccgagta 240
 cgacgactgc aggaacgtgg actggttacc cgaaccgcgc acccgggaga cgcccgggcg 300
 gtccgcatcc gcatcacgcc ggaaggcacc cgcacgttga ccgcggtgcg ggcagaccgc 360
 gcggctgcga tcgagcctca gctggccctg ctcccaccgc cggaccgcgc ggtgttggcg 420
 gatcggttag acgtgttgcg ccggctgctc gaccatgcgc ccaccacgcc gggccggcg 480
 acgcgggcaa 489

<210> 99

<211> 257

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 99

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-124-

Arg Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Gly Asn Gln His Asp Ala Glu Asp Leu
 100 105 110

Thr Gln Glu Thr Phe Ile Arg Val Phe Arg Ser Val Gln Asn Tyr Gln
 115 120 125

Pro Gly Thr Phe Glu Gly Trp Leu His Arg Ile Thr Thr Asn Leu Phe
 130 135 140

Leu Asp Met Val Arg Arg Arg Ala Arg Ile Arg Met Glu Ala Leu Pro
 145 150 155 160

Glu Asp Tyr Asp Arg Val Pro Ala Asp Glu Pro Asn Pro Glu Gln Ile
 165 170 175

Tyr His Asp Ala Arg Leu Gly Pro Asp Leu Gln Ala Ala Leu Ala Ser
 180 185 190

Leu Pro Pro Glu Phe Arg Ala Ala Val Val Leu Cys Asp Ile Glu Gly
 195 200 205

Leu Ser Tyr Glu Glu Ile Gly Ala Thr Leu Gly Val Lys Leu Gly Thr
 210 215 220

Val Arg Ser Arg Ile His Arg Gly Arg Gln Ala Leu Arg Asp Tyr Leu
 225 230 235 240

Ala Ala His Pro Glu His Gly Glu Cys Ala Val His Val Asn Pro Val
 245 250 255

Arg

<210> 100

<211> 771

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 100

atggaactcc tcggcggacc ccgggttggg aatacggaat cgcaactttg cgttgccgac 60

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-125-

```

ggtgacgact tgccaactta ttgcagtgc aattcggagg atctcaatat cacgaccatc 120
acgaccttga gtccgaccag catgtctcat cccaacagg tccgcatga ccagtgggtg 180
gagccgtctg accaattgca gggcaaccgc gtattogac ccaccgggga caaggccacc 240
atgccgtcct gggatgagct ggtccgtcag cagcgogac ggggtgtacc gctggcttat 300
cggctctccg gcaaccagca cgtatccgaa gacctgacc aggagacctt tatcagggtg 360
ttccggtcgg tccagaatta ccagccgggc accttcgaag gctggctaca ccgcatcacc 420
accaacttgt tcttgacat ggtccgccgc cgggctcgca tccgatgga ggcgttacc 480
gaggactacg accgggtgcc cggcgatgag cccaacccg agcagatcta ccacgacgca 540
cggctgggac ctgacctgca ggtcgcttg gcctcgctgc cgcggaggtt tcgtgccgcg 600
gtgggtctgt gtgacatcga gggctgtcgc tacgaggaga tcggcgccac actgggcgtg 660
aagctcggga cggtaactag ccggatacac cggcgacgcc aggcactgcg ggactacctg 720
gcagcgcaacc ccgaactagg cgagtgcga gttcactga acccagttcg c 771

```

<210> 101

<211> 472

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 101

```

Val Thr Arg Arg Gly Lys Ile Val Cys Thr Leu Gly Pro Ala Thr Gln
1           5           10           15

```

```

Arg Asp Asp Leu Val Arg Ala Leu Val Glu Ala Gly Met Asp Val Ala
20           25           30

```

```

Arg Met Asn Phe Ser His Gly Asp Tyr Asp Asp His Lys Val Ala Tyr
35           40           45

```

```

Glu Arg Val Arg Val Ala Ser Asp Ala Thr Gly Arg Ala Val Gly Val
50           55           60

```

```

Leu Ala Asp Leu Gln Gly Pro Lys Ile Arg Leu Gly Arg Phe Ala Ser
65           70           75           80

```

```

Gly Ala Thr His Trp Ala Glu Gly Glu Thr Val Arg Ile Thr Val Gly

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-126-

85

90

95

Ala Cys Glu Gly Ser His Asp Arg Val Ser Thr Thr Tyr Lys Arg Leu
 100 105 110

Ala Gln Asp Ala Val Ala Gly Asp Arg Val Leu Val Asp Asp Gly Lys
 115 120 125

Val Ala Leu Val Val Asp Ala Val Glu Gly Asp Asp Val Val Cys Thr
 130 135 140

Val Val Glu Gly Gly Pro Val Ser Asp Asn Lys Gly Ile Ser Leu Pro
 145 150 155 160

Gly Met Asn Val Thr Ala Pro Ala Leu Ser Glu Lys Asp Ile Glu Asp
 165 170 175

Leu Thr Phe Ala Leu Asn Leu Gly Val Asp Met Val Ala Leu Ser Phe
 180 185 190

Val Arg Ser Pro Ala Asp Val Glu Leu Val His Glu Val Met Asp Arg
 195 200 205

Ile Gly Arg Arg Val Pro Val Ile Ala Lys Leu Glu Lys Pro Glu Ala
 210 215 220

Ile Asp Asn Leu Glu Ala Ile Val Leu Ala Phe Asp Ala Val Met Val
 225 230 235 240

Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val Glu Leu Pro Leu Glu Glu Val Pro Leu
 245 250 255

Val Gln Lys Arg Ala Ile Gln Met Ala Arg Glu Asn Ala Lys Pro Val
 260 265 270

Ile Val Ala Thr Gln Met Leu Asp Ser Met Ile Glu Asn Ser Arg Pro
 275 280 285

Thr Arg Ala Glu Ala Ser Asp Val Ala Asn Ala Val Leu Asp Gly Ala
 290 295 300

Asp Ala Leu Met Leu Ser Gly Glu Thr Ser Val Gly Lys Tyr Pro Leu
 305 310 315 320

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-127-

Ala Ala Val Arg Thr Met Ser Arg Ile Ile Cys Ala Val Glu Glu Asn
 325 330 335

Ser Thr Ala Ala Pro Pro Leu Thr His Ile Pro Arg Thr Lys Arg Gly
 340 345 350

Val Ile Ser Tyr Ala Ala Arg Asp Ile Gly Glu Arg Leu Asp Ala Lys
 355 360 365

Ala Leu Val Ala Phe Thr Gln Ser Gly Asp Thr Val Arg Arg Leu Ala
 370 375 380

Arg Leu His Thr Pro Leu Pro Leu Leu Ala Phe Thr Ala Trp Pro Glu
 385 390 395 400

Val Arg Ser Gln Leu Ala Met Thr Trp Gly Thr Glu Thr Phe Ile Val
 405 410 415

Pro Lys Met Gln Ser Thr Asp Gly Met Ile Arg Gln Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Leu Leu Glu Leu Ala Arg Tyr Lys Arg Gly Asp Leu Val Val Ile Val
 435 440 445

Ala Gly Ala Pro Pro Gly Thr Val Gly Ser Thr Asn Leu Ile His Val
 450 455 460

His Arg Ile Gly Glu Asp Asp Val
 465 470

<210> 102

<211> 1416

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 102
 gtgacgagac gcgggaaaat cgtctgcact ctccggccgg ccaccacgag ggaacgaactg 60
 gtcagagcgc tggtcgaggc cggaaatggac gtcgcccga tgaacttcag ccacggcgac 120
 tacgacgac acaaggtcgc ctatgagcgg gtcggggtag cctccgacgc caccggggcg 180
 gcggtcggcg tgctcgccga cctgcagggc ccgaagatca ggttgggacg cttegcctcc 240

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-128-

```

ggggccaccc actgggcccga agggcgaacc gtccggatca ccgtgggcgc ctgcgagggc 300
agccacgacgc ggggtgtccac caccctacaaag cggctagccc aggacgcggt ggcgcggtgac 360
cgggtgctgg tcgacgacgg caaagtcgca ttggtggtcg acgccgtcga gggcgacgac 420
gtggtctgca ccgtcgtcga aggcggcccg gtcagcgaca acaagggcac ctctgtgcc 480
gsaatgaacg tgaccgcgcg ggcctgtcg gagaaggaca tcgaggatct cactgtcgcg 540
ctgaacctcg gctcgacat ggtggcgtt tcttctgtcc gctcccggc cgatgtcgaa 600
ctgtccacg aggtgatgga tcggatcgg cgacgggtgc cggatgacgc caagctggag 660
aagccggaag ccacgcacaa tctcgaagcg atcgtgctgg cgttcgacgc cgtcatggtc 720
gtcggggcg accatggtgt tgagctgcg ctccaagagg tcccgctggt acagaagcga 780
gccatccaga tggcccgga gaacgcgaag ccggtcattg tggcgacca gatgctcgac 840
tcgatgatgc agnactgcg gccgaccgga gctgaggcct ccgacgtgc caacgcggtg 900
ctcgatggcg ccgacgcgct gatgctgtcc ggggaaacct cggtagggaa gtaccocctt 960
gtcgcggtcc ggacaatgct gcgcacatc tgcgcggtcg aggagaactc cagggccgca 1020
ccgcggtga cacacattcc ccgaccaag cgtggggtca tctcgtatgc ggcccgtagc 1080
atcggcgaac gactcgacgc caaggccttg gtggccttca ctcagtcagg tgataccgtg 1140
cggcgactgg ccgcctgca taccctcggt ccgctgctgg ccttcaccgc gtggcccgag 1200
gtgcgcagcc aactggcgat gacctggggc accgagacgt tcacgtgccc gaagatgcag 1260
tccaccgatg gcctgatccg ccaggtcgac aaatcgctgc tcgaactcgc ccgtacaaag 1320
cgtggtgact tgggtggtcat cgtcgcggt gcgccgccag gcacagtggg ttcgaccaac 1380
ctgatccacg tgcaccggat cggggaagat gacgtc 1416

```

<210> 103

<211> 269

<212> FRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 103

```

Met Thr Ser Val Lys Leu Asp Leu Asp Ala Ala Asp Leu Arg Ile Ser
1          5          10          15

```

```

Arg Gly Ser Val Pro Ala Ser Thr Gln Leu Ala Glu Ala Leu Lys Ala

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-129-

```

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

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-130-

Gly Ser Gly Ala Gly Ile Ile Glu Lys Arg Asp Phe Ala
 260 265

<210> 104

<211> 807

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 104
 atgacatctg tcaagctgga cctggacgct gccgatctgc ggatatcgcg tggcagcggtg 60
 ccggcgagta cccagcttgc cgaggcgcta aaggcccaga tcatccagca gccgctgccg 120
 ccggcggggc gcttgcacag cgaacgagaa ttgatcgacc gttccgggtt gagcccggtg 180
 accgtgcgcg cggcggtcgg catgtgcaa cgtcagggat ggctagtgcg ccggcaaggc 240
 ttgggtacct tcgtcgccga tccggtggaa caggagctca gttgcggcgt gcgcaccatc 300
 acagaggtgt tgttgagctg tgggtgtacc ccgcaggtcg acgtgctgtc acaccagacc 360
 ggaccggcgc cgcaacggat ttccgagacg ctgggttttg ttgaggtctc ctgtattcgc 420
 cggcgcatcc gcactggcga tcaacccttg gccctggta cggcctatct tccgcccggc 480
 gtgggcccag ccgtcgagcc gttgtatcg ggcagcgccg acaccgaac cacatatcg 540
 atgtgggagc ggccgactggg tgtacgcatt gcacaggcta cccacgaat ccattgccgc 600
 ggggcctccc ccgacgtagc cgaacgcttg ggtctggcgg tgggttcgcc ggtactggtc 660
 gtccagcgca ccagctacac caatgacggc aagccccttg aagtggctgt gttccaccat 720
 cgcccagacg ggtaccagtt ctccgtcacg ttaccccga cgttgcccgg atcaggtgcc 780
 ggaattatcg agaaacgaga ttctgca 807

<210> 105

<211> 293

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 105

Val Phe Ala Leu Ser Asn Asn Leu Asn Arg Val Asn Ala Cys Met Asp
 1 5 10 15

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-131-

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-132-

245

250

255

Gln Trp Met Val Ala Ala Ile Arg Ser Ala Val Lys Leu Arg Val His
 260 265 270

His Leu Ala Gly Tyr Val Pro Ala Thr Leu Gln Pro Ile Met Asp Val
 275 280 285

Arg Leu Thr Lys Arg
 290

<210> 106

<211> 879

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 106
 gtgttttcgt tgagtaataa tctgaaccgt gtgaacgcat gcatggatgg attccttgcc 60
 cgtatccgct cacatgttga tgcgcacgcg ccagaattgc gttaactgtt cgatacagtg 120
 gggcccgagg ccgatttgc acgcgaactgg ctgtccgagg acctcgcgcg gttgctgtgc 180
 ggtgcagcat tgtggaagt gggcgggggg gtacttctgc tcagctgtca actggcggcg 240
 gagggatttg acatcaccgc catcgagccg acgggtgaag gttttggcaa gttagacag 300
 cttggcgaca tctgtctgga attggctgca gcacgaccca ccacgcgccc atgcaaggcg 360
 gaagacttta ttccgagaa gcggttcgac ttgccttct cgtgaatgt gatggagcac 420
 atcgaccttc cggatgaggc agtcaggcgg gtatcggaag tgctgaaacc gggggccagt 480
 taccacttcc tgtgcccgaa ttacgtattc ccgtacgaac cgcatttcaa tatcccaaca 540
 ttcttcacca aagagctgac atgccgggtg atgcgacatc gcacgaggg caatacgggc 600
 atggatgacc cgaaggaggt ctggcggttcg ctcaactgga ttacgggtcc caaggtgaaa 660
 cgcttttcgg cgaaggatgc gacgtgacc ttgcgttcc accgtgcaat gttggtatgg 720
 atgtggaac gcgcgctgac ggataaggaa ttcgctggtc gccgggcaca atggatggtc 780
 gctgctattc gtcggcggt gaaattgcgt gtgcacatc tggcaggcta tgttcccgct 840
 acgctgcagc ccacatgga tgtgcggcta acgaagagg 879

<210> 107

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-133-

<211> 412

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 107

Val Thr Pro His Tyr Arg Gln Ala Ala Ala Ser Arg Leu Asp Thr His
1 5 10 15

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

Gln Leu Thr Tyr Glu Gln Phe Ala Arg Met Leu Thr Leu Met Gly Pro
35 40 45

Ser Asp Leu Trp Thr Val Glu Arg Ala Ala Arg His Trp Gly Val Ser
50 55 60

Ala Ser Arg Ala Arg Ala Ile Leu Ser Ser Arg His Ile His Arg Val
65 70 75 80

Ser Gly Tyr Pro Ala Gln Ala Ile Lys Ala Val Thr Leu Arg Gln Gly
85 90 95

Ala Arg Thr Asp Leu Lys Thr Ala Asn His Leu Val Pro Ala Ala Gln
100 105 110

Ala Phe Thr Met Ala Glu Thr Gly Ala Ala Ile Gly Glu Thr Glu Asp
115 120 125

Glu Arg Ala Arg Leu Arg Ile Phe Phe Glu Phe Leu Arg Gly Ala Asp
130 135 140

Glu Thr Gly Thr Ser Ala Leu Asp Leu Ile Val Asp Glu Pro Ala Leu
145 150 155 160

Ile Gly Glu His Arg Phe Asp Ala Leu Leu Ala Ala Ala Glu Tyr
165 170 175

Ile Ser Ala Arg Trp Gly Arg Pro Gly Pro Leu Trp Ser Val Ser Ile
180 185 190

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-134-

Glu Arg Phe Leu Asp Thr Ala Trp Trp Val Ser Asp Leu Pro Ser Ala
195 200 205

Arg Ala Phe Ala Ala Val Trp Thr Pro Ala Pro Phe Arg Arg Arg Gly
210 215 220

Ile Tyr Leu Asp Arg His Asp Leu Thr Ser Asp Gly Val Cys Val Met
225 230 235 240

Pro Glu Pro Val Phe Asn Arg Thr Glu Leu Gln Arg Ala Phe Thr Ala
245 250 255

Leu Ala Ala Lys Leu Glu Arg Arg Gly Val Val Gly Gln Val His Val
260 265 270

Val Gly Gly Ala Ala Met Leu Leu Ala Tyr Asn Ser Arg Val Thr Thr
275 280 285

Arg Asp Ile Asp Ala Leu Phe Ser Thr Asp Gly Pro Met Leu Glu Ala
290 295 300

Ile Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly Trp Pro Arg Thr Trp Leu Asn
305 310 315 320

Asn Gln Ala Ser Gly Tyr Val Ser Arg Thr Pro Gly Glu Gly Ala Pro
325 330 335

Val Phe Asp His Pro Phe Leu His Val Val Ala Thr Pro Ala Gln His
340 345 350

Leu Leu Ala Met Lys Val Val Ala Ala Arg Gly Val Arg Asp Gly Glu
355 360 365

Asp Ile Arg Leu Leu Leu Asp Arg Leu Arg Ile Thr Ser Ala Ala Gly
370 375 380

Val Trp Glu Ile Val Ala Arg Tyr Phe Pro Ala Glu Thr Ile Thr Asp
385 390 395 400

Arg Ser Arg Leu Leu Val Glu Asp Leu Leu Asn Gln
405 410

<210> 108

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-135-

<211> 1236

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 108
gtgacccac actatcgcca agccgcgcg tcgcggtcg ataccaccg caegcaaaag 60
ctccgttccc agaccaacgg agggaaaggac cggcaccagt tgacatacga gcagttcgct 120
cgtatgttga cgtgatggg gccgagcgat ctgiggacgg tggaaacgcg ggcgcgccat 180
tggggcgtga ggcggtcgcg cgctcgcgct atcctgtcga gccgccaat tcaccgggtc 240
agcgggtacc ccgcgcgagg gatcaaggcg gtcaccctgc gccagggtgc gcgcaccgac 300
ctcaaaaacg ccaaccatct cgtgccggcc gcacaagcgt tcaccatggc cgagacgggt 360
gccgcatcg gagagaccga agatgagcgg gcacgaclgc gcattttctt caggttctct 420
cgcggcgccg atgagaccgg gacatccgcy ctcgatctca tegttagcga gcccgcgctg 480
atcggtgagc accggttcga tgctttgttg gcccgcgctg cggaatacat ttccggcgcg 540
tggggcgccg ctggaccctt gtggtcgggt agtatcgaa ggtttctgga caccggcctgg 600
tgggtcagcg acctcccgtc ggcacgagcg ttgcccgcg tgtggacgco ggcgccgttc 660
cggcgccgcy gcatttacct agatcgccac gacctoacga gcgatggagt gtgtgtcatg 720
ccgaaccgg tgttcaacg aacgagctc cagcggcgct tcactgcctt ggcgcccaag 780
ctggaacgca gaggcgttgt cggtcagggt caggttgtcg gcggggcgcg gatgctactc 840
gctacaact ccgtgtcac cactcgcgat atcgacgcyt tgttctcaa tgacgggcct 900
atgtcgaag cgattcgtga ggtcgctgac gaaatgggtt ggccgcgaac gtggctcaac 960
aatcaggcca gcggttacgt ctcccgcaca ccaggtgaag gcgccccgt tttcgatcac 1020
ccattcctgc atgtcgtagc cacaccgcy cagcaccttc tcgcgatgaa agtcgttgcg 1080
gcacgcggcg tgcgtgacgg cgaagacatt cgctcctgc tcgatcggct gcgaatcacc 1140
agcgggcgcg gcgtatggga gatgtcgca cgtacttct ccgcgaaac catcacggac 1200
cggtcgaggc tctcgtcga ggacctctc aaccaa 1236

<210> 109

<211> 328

<212> PRT

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-136-

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 109

Val Pro Gly Ala Arg Glu Leu Thr Leu Arg Val Glu Arg Gly Ala Leu
1 5 10 15

Phe Arg Arg Arg Trp Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ala Arg Ala Ala
20 25 30

Ile Arg Arg Asp Pro Arg Arg Cys Ala Leu Gly Thr Arg Pro Arg Trp
35 40 45

Val Ser Phe Leu Val Ile Val Leu Val Ile Met Asn Val Val Thr Ala
50 55 60

His Pro Lys Tyr Pro Asn Asp Pro Leu Ala Leu Val Leu Ile Glu Leu
65 70 75 80

Arg His Pro Arg Thr Glu Pro Pro Val Pro Ser Ala Ile Ser Ile Leu
85 90 95

Lys Glu Glu Leu Ala Arg Trp Thr Pro Ile Leu Glu Gln Glu Glu Val
100 105 110

Arg Gln Val Asn Leu Glu Thr Gly Glu His Thr Ala His Ser Gln Lys
115 120 125

Lys Leu Val Ala Arg Asp Arg Arg Thr Ala Ile Thr Phe Arg Pro Asp
130 135 140

Ala Met Thr Leu Glu Val Thr Asp Tyr Pro Gly Trp Glu Glu Phe Arg
145 150 155 160

Ser Ile Val His Ala Met Val Thr Ala Arg Gln Asp Val Ala Pro Val
165 170 175

Asp Gly Cys Ile Arg Ile Gly Leu Arg Tyr Ile Asn Glu Ile Arg Ala
180 185 190

Ser Leu Ala Glu Pro Ser Gly Trp Ala Tyr Trp Val Ala Glu Ser Leu
195 200 205

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-137-

Leu Gly Pro Gly Thr Gln Leu Ala Asp Leu Lys Leu Thr Thr Thr Ala
 210 215 220

Gln Arg His Val Ile Gln Cys Glu Gly Pro Glu Pro Gly Asp Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Leu Arg Tyr Ala Gly Ala Arg Gly Ala Val Ile Gln Ser Thr Pro
 245 250 255

Phe Leu Gln Arg Leu Lys Glu Pro Pro Ala Glu Gly Asp Phe Phe Leu
 260 265 270

Ile Asp Ile Asp Ser Ala Trp Ser Asp Pro Cys Lys Gly Ile Pro Ala
 275 280 285

Leu Asp Ala His Leu Val Asp Glu Val Ala Glu Arg Leu His Thr Pro
 290 295 300

Ile Gly Pro Leu Phe Glu Ser Leu Ile Thr Ser Glu Leu Arg Thr Lys
 305 310 315 320

Val Leu Gln Gln Pro Gly Gln Glu
 325

<210> 110

<211> 984

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 110
 gtgcccggcg cgcgcgagtt gacgctgcgc gtcgagcgcg gggctctatt tcggcgctga 60
 tgggcagcat cggcagcgtc atcagctcgc gcagcaattc gtcgtgatcc gcggcgcctgc 120
 gcgctgggta cccggcctcg atgggtatca tttttggtta tcgttctggt tatcatgaat 180
 gttgtgacgg cccatcccaa gtaccgcaat gacctcttg cgctgggtatt gattgaactg 240
 cgccatccgc ggaccgagcc gccggtgccca tctgctatct ccactcctgaa ggaggagctg 300
 gcgcgatgga ctcccatact cgaacaggag gaggtgcggc aggtcaacct agaaacgggc 360
 gaacataccg cacactcaca gaagaagctc gttgcccggt atcgccgcac cgcgatcacg 420
 ttctgaccgc acgccaatgac cctcgaagtc accgaactacc cgggctggga ggagtttcgg 480

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-138-

```

tccatcgttc acgcgatggt cacagccgc caggacgtgg cccacgtcga tggctgcato 540
cggatcggtc tgcgtacat caacgagatt cgggcatcgc tggcggagcc atccggctgg 600
ggtactggg tggcggaaag tctctcggg cctgggacac agcttgccga tctcaaaactc 660
accaccaccg cgcacacgca cgtcattcag tgcgaaggcc cggagccagg cgactccttg 720
acactgaggt acgcgggtgc gcgcggcgcg gtcattccagt caaccccggt tctccagcgg 780
ttgaaagaac ctccggcaga aggagatttc ttctcctcag atatcgacag cgcgtggagc 840
gacctctgca agggcatccc agcgtctgac gcccaacctg tggacgaggt cgcgaaagg 900
ctccacacac ccatcggtccc actgttcgaa tcgctgataa ctccggaact ccgtacaagg 960
gtgctgcaac aacctgggca ggag 984

```

<210> 111

<211> 463

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 111

```

Met Ala Ile Arg Gln His Val Gly Ala Leu Phe Thr Asp Leu Tyr Glu
1           5           10           15

```

```

Val Thr Met Ala Gln Ala Tyr Trp Ala Glu Arg Met Ser Gly Thr Ala
20           25           30

```

```

Val Phe Glu Ile Phe Phe Arg Lys Leu Pro Pro Gly Arg Ser Tyr Ile
35           40           45

```

```

Met Ala Ala Gly Leu Ala Asp Val Val Glu Phe Leu Glu Ala Phe Arg
50           55           60

```

```

Phe Asp Glu Gln Asp Leu Arg Tyr Leu Arg Gly Leu Gly Gln Phe Ser
65           70           75           80

```

```

Asp Glu Phe Leu Arg Trp Leu Ala Gly Val Arg Phe Thr Gly Asp Val
85           90           95

```

```

Trp Ala Ala Pro Glu Gly Thr Val Ile Phe Pro Asn Glu Pro Ala Val
100          105          110

```


WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-139-

Gln Leu Ile Ala Pro Ile Ile Glu Ala Gln Leu Val Glu Thr Phe Val
115 120 125

Leu Asn Gln Ile His Leu Gln Ser Val Leu Ala Ser Lys Ala Ala Arg
130 135 140

Val Val Ala Ala Ala Arg Gly Arg Pro Val Val Asp Phe Gly Ala Arg
145 150 155 160

Arg Ala His Gly Thr Asp Ala Ala Cys Lys Val Ala Arg Thr Ser Tyr
165 170 175

Leu Ala Gly Ala Ala Gly Thr Ser Asn Leu Leu Ala Ala Arg Gln Tyr
180 185 190

Gly Ile Pro Thr Phe Gly Thr Met Ala His Ser Phe Val Gln Ala Phe
195 200 205

Asp Ser Glu Val Ala Ala Phe Glu Ala Phe Ala Arg Leu Tyr Pro Ala
210 215 220

Thr Met Leu Leu Val Asp Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Val Asp His
225 230 235 240

Val Ile Glu Leu Ala Lys Arg Leu Gly Asn Arg Phe Asp Val Arg Ala
245 250 255

Val Arg Leu Asp Ser Gly Asp Leu Asp Glu Leu Ser Lys Ala Thr Arg
260 265 270

Ala Arg Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Gln Val Glu Ile Phe Ala Ser
275 280 285

Ser Gly Leu Asp Glu Asn Arg Ile Ala Ala Leu Leu Ala Ala Arg Cys
290 295 300

Pro Ile Asp Gly Phe Gly Val Gly Thr Gln Leu Val Val Ala Gln Asp
305 310 315 320

Ala Pro Ala Leu Asp Met Ala Tyr Lys Leu Val Ala Tyr Asp Gly Ser
325 330 335

Gly Arg Thr Lys Phe Ser Ser Gly Lys Val Ile Tyr Pro Gly Arg Lys
340 345 350

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-140-

Gln Val Phe Arg Lys Leu Glu His Gly Val Phe Cys Gly Asp Thr Leu
 355 360 365

Gly Glu His Gly Glu Asn Leu Pro Gly Asp Pro Leu Leu Val Pro Ile
 370 375 380

Met Thr Asn Gly Arg Arg Ile Arg Gln His Ala Pro Thr Leu Asp Gly
 385 390 395 400

Ala Arg Asp Trp Ala Arg Gln Gln Ile Asp Ala Leu Pro Pro Glu Leu
 405 410 415

Arg Ser Leu Glu Asp Thr Gly Tyr Ser Tyr Pro Val Ala Val Ser Asp
 420 425 430

Arg Ile Val Gly Glu Leu Ala Arg Leu Arg His Ala Asp Thr Ala Glu
 435 440 445

Ala His Pro Gly Ser Asn Val Val Gly Ala Lys Ala Lys Arg Pro
 450 455 460

<210> 112

<211> 1389

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 112
 atggcgatcc gccaacacgt cggcgcgctg ttcaccgacc tgtacgaggt gaogatggcc 60
 caggcctact gggccgaaag aatgtcgggc acagcggttt tcgagatatt cttccgcaag 120
 cttcgcctcg gcaggctcta catcatggcc gccgggctgg ccgatgtggt cgagttcctc 180
 gaagcgttcc gattcgacga gcaggatctg cgttacctgc gtggcctggg ccagttttcc 240
 gacgagttcc tgaggtaggt ggcgggagtg cgtttcaccg gagatgtctg ggccgcgcgc 300
 gaagggaaccg tgatttttcc gaacgaaccc gcggtccagc tgatcgcgcc aatcatcgag 360
 gccagcttg tcgagacgtt tgtgctgaac cagattcatc tgcaaacgtt gctcgcgagc 420
 aaggccgcgc gggtaggtgc cgcgcgcgcg ggacgaccgc tggtaggatt cggcgcgcgc 480
 cgcgctcagc gcaccgacgc ggctgcaag gtcgcgcgca ccagttatct cgcgggcgct 540

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-141-

```

gcgggcacgt cgaatctgct cgcggccgc caatatggga tcccgacgtt cggcaccatg 600
gcgcacagct ttgttcaagc cttcgacagt gaggtggcgc cgttcgagga gttcgcccgg 660
ctctacccag ccaccatgct gctcgtggac acctacgaca cgtacgcgg cgtcgatcac 720
gtcatcgagt tggccaagcg gctgggcaat cgcttcgatg tgcgcgcggt cgggtggat 780
tcggcgacc tcgatgagct gtccaaggcg acccgtgcac ggctcgacac cgcgggtctc 840
gagcaggctc agatcttcgc gtcgtcgggc ctcgacgaaa accgcatcgc cgcgcttttg 900
gtgcgccgct gtccgatcga cggcttcggc gtgggcaccc agctcgtcgt ggctcaagac 960
gcgcccgcgc tggacatggc ctacaagctg gtggcatacg acggcagcgg gcgcaccaag 1020
ttctocagcg gcaaggtgat ctacccggga cgcgaagcagg tgttcogtaa gctcgagcac 1080
ggagcttttt gcggcgacac gctcggcgag caggtgaaa accttcccg ggacccttg 1140
ctggtgcccc tcatgaccaa cggccgacgc atccggcagc atgcacccac attggacggc 1200
gcgcgggact ggcccgcca gcagatcgac gcgtccgc cggagctgcg ctgctcgag 1260
gacaccggtc actcgatcc ggtggcggtc agcgacagga tcgtggcgga actcgcccg 1320
ctgcggcagc cgcacacggc cgaagccac cccgggtcca acgtcgtcgg ggcgaaggcc 1380
aacgaccc 1389

```

<210> 113

<211> 138

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 113

```

Leu Gln Pro Asp Arg Asn Leu Leu Ala Asp Leu Asp His Ile Phe Val
1          5          10          15

Asp Arg Ser Leu Gly Ala Val Gln Val Pro Gln Leu Leu Arg Asp Ala
20          25          30

Gly Phe Arg Leu Thr Thr Met Arg Glu His Tyr Gly Glu Thr Gln Ala
35          40          45

Gln Ser Val Ser Asp His Lys Trp Ile Ala Met Thr Ala Glu Cys Gly
50          55          60

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-142-

Trp Ile Gly Phe His Lys Asp Ala Asn Ile Arg Arg Asn Ala Val Glu
65 70 75 80

Arg Arg Thr Val Leu Asp Thr Gly Ala Arg Leu Phe Cys Val Pro Arg
85 90 95

Ala Asp Ile Leu Ala Glu Gln Val Ala Ala Arg Tyr Ile Ala Ser Leu
100 105 110

Ala Ala Ile Ala Arg Ala Ala Arg Phe Pro Gly Pro Phe Ile Tyr Thr
115 120 125

Val His Pro Ser Lys Ile Val Arg Val Leu
130 135

<210> 114

<211> 414

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 114
ttgcagcctg atcggaatct cctcgccgac ctcgatcaca tctttgtcga ccggagtttg 60
ggcgctgtgc aagtcgccga actccttcgg gatgccgat tcggctgac aacgatggg 120
gagcactacg gcgagacgca ggtccagagt gtcagcgacc acaagtggat cgcaatgacc 180
gccgagtgcg gctggattgg atttcacaag gatgcccaata tccggcgcaa cgccgtcgag 240
cgaaggacgg tgcctgacac gggagcccg ctattctgtg tgccgcgggc cgacatcctg 300
gcagagcaag tcggggcacg gatatattcg tcccttgagg cgattgcccg tgccgcaaga 360
tttcggggac cattcatcta cagggttcac ccgagcaaga tcgttcgcgt gctc 414

<210> 115

<211> 288

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 115

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-143-

Met Asn Ser Pro Arg Glu Pro Leu Val Pro Pro Thr Pro Arg Pro
 1 5 10 15

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

Gly Leu Ala Val Phe Leu Met Arg Arg His Ala Ala Met Asp Phe Ala
 35 40 45

Ala Gly Val Met Val Phe Pro Gly Gly Gly Val Asp Asp Arg Asp Arg
 50 55 60

Asp Ala Asp Leu Gly Arg Leu Gly Ala Trp Ala Gly Pro Pro Pro Gln
 65 70 75 80

Trp-Trp Ala Gln Arg Phe Gly Ile Glu Pro Asp Leu Ala Glu Ala Leu
 85 90 95

Val Cys Ala Ala Ala Arg Glu Thr Phe Glu Glu Ser Gly Val Leu Phe
 100 105 110

Ala Gly Pro Val Asp Gln Asp His Ser Ala Pro Asn Ser Ile Val Ser
 115 120 125

Asp Ala Ser Val Tyr Gly Asp Ala Arg Arg Ala Leu Ala Asp Arg Thr
 130 135 140

Leu Ser Phe Ala Asp Phe Leu Gln Arg Glu Lys Leu Val Leu Arg Ser
 145 150 155 160

Asp Leu Leu Arg Pro Trp Ala Asn Trp Val Thr Pro Glu Ala Glu Leu
 165 170 175

Thr Arg Arg Tyr Asp Thr Tyr Phe Phe Val Gly Ala Leu Pro Glu Gly
 180 185 190

Gln Arg Ala Asp Gly Glu Asn Thr Glu Ser Asp Arg Ala Gly Trp Val
 195 200 205

Leu Pro Ala Asp Ala Ile Ala Asp Phe Ala Ala Gly Arg Asn Phe Leu
 210 215 220

Leu Pro Pro Thr Trp Thr Gln Leu Asp Ser Leu Ala Gly His Thr Val
 225 230 235 240

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-144-

Ala Asp Val Leu Ala Val Glu Arg Gln Ile Val Pro Val Gln Pro Gln
 245 250 255

Leu Ala Arg Asn Gly Asp Asn Trp Glu Ile Glu Phe Phe Asp Ser Asp
 260 265 270

Arg Tyr Asn Gln Ala Arg Arg Ser Gly Gly Ser Thr Gly Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> '116

<211> 864

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 116
 atgaattcac ctgcgagacc actggtaccc ccgcctacac cgaggccggc ggcgaccgtg 60
 atgttggtcc ggcaccggga cgcgggatca gcgtccggtc tggccgtctt cttgatgcgg 120
 cggcagcgtg cgaatggattt cgcgcgggg gtaatgggtt ttcccgccgg gggagtcgac 180
 gaccgcgacc gcgacgcoga cttgggcccgg ctgggggcat gggccggtaa gccgcgcag 240
 tggtaggggc agcgggttcgg catcgagcct gatctgcgcg aagccttggt ctgcgcggcg 300
 gcccgcgaga cgttcgagga gtcgggggtg ctattgcgcg ggcgggtoga tcaggaccat 360
 tcggcaccga acagcatcgt ctccgatgcc tcgggtgtacg gcgacgcgcg tcgcgcactg 420
 gccgaccgga cgtgtcctt cgcggacttc ctgcagcggg aaaagctggg gctgcgatcc 480
 gaactgctac ggccttgggc caactgggtc accccggagg ccgaactgac ccggcgctac 540
 gacacactact tctttgtggg tgcctacct gaaggtcagc gcgccgacgg cgagaacacc 600
 gaatccgacc gggctggttg ggtgttgcca gccgacgcta tcgccgactt cgcgcggcgc 660
 cgcgaacttct tgctgcgcgc gaactggaag caactggact cgtggcgagg tcataccgtt 720
 gccgacgtgc tggccgtoga acgcgaaatc gtcccgtgc agccacagct ggcgcgaac 780
 ggcgacaact gggagatoga gttcttcgat tccgaccgct ataaccaggc ccggagatcg 840
 ggcggatoga ccgggtggcc gctg 864

<210> 117

<211> 456

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-145-

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 117

Met Val Ser Thr His Ala Val Val Ala Gly Glu Thr Leu Ser Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Arg Phe Tyr Gly Asp Ala Glu Leu Tyr Arg Leu Ile Ala Ala
 20 25 30

Ala Ser Gly Ile Ala Asp Pro Asp Val Val Asn Val Gly Gln Arg Leu
 35 40 45

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

Ser Ala Leu Ala Leu Arg Phe Tyr Gly Asp Ala Glu Leu Asn Trp Leu
 65 70 75 80

Ile Ala Ala Ala Ser Gly Ile Ala Asp Pro Asp Val Val Asn Val Gly
 85 90 95

Gln Arg Leu Ile Met Pro Asp Phe Thr Arg Tyr Thr Val Val Ala Gly
 100 105 110

Asp Thr Leu Ser Ala Leu Ala Ala Arg Phe Tyr Gly Asp Ala Ser Leu
 115 120 125

Tyr Pro Leu Ile Ala Ala Val Asn Gly Ile Ala Asp Pro Gly Val Ile
 130 135 140

Asp Val Gly Gln Val Leu Val Ile Phe Ile Gly Arg Ser Asp Gly Phe
 145 150 155 160

Gly Leu Arg Ile Val Asp Arg Asn Glu Asn Asp Pro Arg Leu Trp Tyr
 165 170 175

Tyr Arg Phe Gln Thr Ser Ala Ile Gly Trp Asn Pro Gly Val Asn Val
 180 185 190

Leu Leu Pro Asp Asp Tyr Arg Thr Ser Gly Arg Thr Tyr Pro Val Leu
 195 200 205

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-146-

Tyr Leu Phe His Gly Gly Gly Thr Asp Gln Asp Phe Arg Thr Phe Asp
 210 215 220
 Phe Leu Gly Ile Arg Asp Leu Thr Ala Gly Lys Pro Ile Ile Ile Val
 225 230 235 240
 Met Pro Asp Gly Gly His Ala Gly Trp Tyr Ser Asn Pro Val Ser Ser
 245 250 255
 Phe Val Gly Pro Arg Asn Trp Glu Thr Phe His Ile Ala Gln Leu Leu
 260 265 270
 Pro Trp Ile Glu Ala Asn Phe Arg Thr Tyr Ala Glu Tyr Asp Gly Arg
 275 280 285
 Ala Val Ala Gly Phe Ser Met Gly Gly Phe Gly Ala Leu Lys Tyr Ala
 290 295 300
 Ala Lys Tyr Tyr Gly His Phe Ala Ser Ala Ser Ser His Ser Gly Pro
 305 310 315 320
 Ala Ser Leu Arg Arg Asp Phe Gly Leu Val Val His Trp Ala Asn Leu
 325 330 335
 Ser Ser Ala Val Leu Asp Leu Gly Gly Gly Thr Val Tyr Gly Ala Pro
 340 345 350
 Leu Trp Asp Gln Ala Arg Val Ser Ala Asp Asn Pro Val Glu Arg Ile
 355 360 365
 Asp Ser Tyr Arg Asn Lys Arg Ile Phe Leu Val Ala Gly Thr Ser Pro
 370 375 380
 Asp Pro Ala Asn Trp Phe Asp Ser Val Asn Glu Thr Gln Val Leu Ala
 385 390 395 400
 Gly Gln Arg Glu Phe Arg Glu Arg Leu Ser Asn Ala Gly Ile Pro His
 405 410 415
 Glu Ser His Glu Val Pro Gly Gly His Val Phe Arg Pro Asp Met Phe
 420 425 430
 Arg Leu Asp Leu Asp Gly Ile Val Ala Arg Leu Arg Pro Ala Ser Ile

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-147-

435

440

445

Gly Ala Ala Ala Glu Arg Ala Asp
 450 455

<210> 118

<211> 1368

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 118
 atgggtcagca cacatgcggt tgcgcgggg gagacgctgt cggcgttggc gttgcgcttc 60
 tatggcgacg cggaaactgta tcggctgata gccgcgccca gcgggatcgc cgatcccgac 120
 gtcgtcaatg tggggcagcg gctgattatg cctgacttca cgcgatcac cggtgttgcc 180
 ggggacacgc tgcgcggtt ggcgttgcgc ttctatggcg acgcggaatt gaattggctg 240
 atcgccgcgc ccagcgggat cgcgcgaccc gacgtcgta atgtgggca gcggctgatt 300
 atgcctgact tcacgcgata caccgttgtt gccggggaca cgcgtcggc attggtgctg 360
 cgcttctatg gcgacgcctc cctatatcgc cttatcgcc cggtcaatgg catcgccgat 420
 cctggcgta tcgacgtcgg gcaggtactg gtcatattca tcgggcgtag cagcgggttc 480
 ggcctaagga tcgtggaccg caacgagAAC gatcccgcc tgtggtacta ccggttccag 540
 acctccgcga tcggctggaa ccccgagtc aacgtcctgc ttccgatga ctaccgcacc 600
 agcggacgca cctatcccg cctctacctg ttccacggcg gcggcacgca ccaggatttc 660
 cgcacgttcg actttctggg catccgcgac ctgacgcgc gaaagccgat catcatcgtg 720
 atgcccgacg gcgggcacgc ggcctggtat tccaacccgg tcagctcgtt cgtcgcccca 780
 cggaaactgg agacattcca catcgcccag ctgctccct ggatcgaggc gaacttcga 840
 acctacgcgc aatacgacgg ccgcgcggtc gccgggtttt cgatgggtgg cttcggcgcg 900
 ctgaagtacg cagcaaaagta ctacggccac ttgcgctcgg cgagcagcca ctccggaccg 960
 gcaagtctgc gccgcgactt cggcctggta gtgcattggg caaacctgtc ctccggcggtg 1020
 ctggatctag gcggcgccac ggtttacggc gcgcgcgtct gggaccaagc tagggtcagc 1080
 gccgacaacc cggtcgagcg tatcgacagc taccgcaaca agcggatctt cctggtcgcc 1140
 ggcaccagtc cggaccggc caactgggtc gacagcgtga acgagaccca ggtgctagcc 1200

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-148-

gggcagaggg agttccgcga acgcctcagc aacgccggca tcccgcatga atcgacagag 1260
 gtgcctggcg gtcacgtctt ccggcccgac atgttccgto tcgacctega cggcatcgto 1320
 gcccggtgc gccccgcgag catcgggcg gccgcagaa gcgcgat 1368

<210> 119

<211> 224

<212> PRT

<213> 'Mycobacterium tuberculosis

<400> 119

Met Ser Gly Arg Ser Arg Leu Pro Gly Ser Ser Ser Arg Arg Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Ile Val Ala Glu Arg Val Val Ala Thr Val Ala Gly Val Ala
 20 25 30

Val Ala Val Asp Glu Val Asp Ala Ala Glu Ala Arg Leu Arg Asp Gly
 35 40 45

Pro Arg Ala Ala Ala Leu Pro Ala Ser Gly Thr Ser Glu Gly Arg Gln
 50 55 60

Leu Arg Arg Trp Leu Thr Gln Leu Ile Val Thr Glu Arg Val Val Ala
 65 70 75 80

Ala Glu Ala Ala Ala Arg Gly Leu Thr Ala Ala Gly Ala Pro Ala Glu
 85 90 95

Ala Asp Leu Leu Pro Asp Ala Thr Ala Arg Leu Glu Ile Gly Ser Val
 100 105 110

Ala Ala Ala Val Leu Ala Asp Pro Leu Ala Arg Ala Leu Phe Ala Ala
 115 120 125

Val Thr Ala Arg Val Ala Val Thr Asp Asp Ala Val Ala Asp Tyr His
 130 135 140

Ala Arg Asn Pro Leu Arg Phe Ala Ala Pro Cys Pro Gly Gln His Gly
 145 150 155 160

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-149-

Trp Arg Ala Pro Ala Ala Ala Ala Pro Pro Leu Asp Gln Val Arg Arg
165 170 175

Ala Ile Thr Glu His Leu Leu Gly Ala Ala Arg Arg Arg Ala Phe Arg
180 185 190

Val Trp Leu Asp Ala Arg Arg Asn Ala Leu Val Val Leu Ala Pro Gly
195 200 205

Tyr Glu His Pro Gly Asp Pro Arg Gln Pro Asp Asn Thr Arg Arg His
210 215 220

<210> 120

<211> 672

<212> ~DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 120
atgagcgggc gaagccgatt gcccggtccc tcctcacgcc gcgacgcggc gcgcacgtgc 60
gcgcagcggg tggtcgcgac cgtcgccggt gtcgcggtag cggtcgacga ggtcgacgcg 120
gccgaagcgc ggtcgcgca cggaccgcgc gccgcgcgc tcgcggcgag cggcaccagc 180
gagggaagcc aactgcggcg ctggctcacc caactgacgc tgaccgagcg ggtggtagcc 240
gccgagggcg ccgcacgtgg totgaccgc gcgggcgcgc ccgccgagcc ggacctgtcg 300
ccgcagcgca cggctcggct ggagatcgcc agcgtcgccg ccgcgggtgt gccggtacct 360
ttggcgcggg cgttgttcgc ccgcgtcacc gcgcgggtcg cggtaaccga cgacgcctgt 420
gccgactacc atgcccgcga cccgtgcgcg ttgcgcgcgc catgtcccg ccagcacggc 480
tggcgtgccc cggcggcgcc cgcgccacgc ctggatcagg tgcgcgcgc gatcacgcag 540
catctgttgg gggcgcgcgc ccgcgcgcgc ttccgggtgt ggctggagcg gcgcgggaac 600
gccttggtgg tgcgggcgcc cggctatgag cccccggcg acccgcgcca acccgacaac 660
accgcgcggc ac 672

<210> 121

<211> 307

<212> PRT

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-150-

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 121

```

Met Asp Arg Cys Cys Gln Arg Ala Thr Ala Phe Ala Cys Ala Leu Arg
1      5      10      15

Pro Thr Lys Leu Ile Asp Tyr Glu Glu Met Phe Arg Gly Ala Met Gln
20     25     30

Ala Arg Ala Met Val Ala Asn Pro Asp Gln Trp Ala Asp Ser Asp Arg
35     40     45

Asp Gln Val Asn Thr Arg His Tyr Leu Ser Thr Ser Met Arg Val Ala
50     55     60

Leu Asp Arg Gly Glu Phe Phe Leu Val Tyr Gln Pro Ile Ile Arg Leu
65     70     75     80

Ala Asp Asn Arg Ile Ile Gly Ala Glu Ala Leu Leu Arg Trp Glu His
85     90     95

Pro Thr Leu Gly Thr Leu Leu Pro Gly Arg Phe Ile Asp Arg Ala Glu
100    105    110

Asn Asn Gly Leu Met Val Pro Leu Thr Ala Phe Val Leu Glu Gln Ala
115    120    125

Cys Arg His Val Arg Ser Trp Arg Asp His Ser Thr Asp Pro Gln Pro
130    135    140

Phe Val Ser Val Asn Val Ser Ala Ser Thr Ile Cys Asp Pro Gly Phe
145    150    155    160

Leu Val Leu Val Glu Gly Val Leu Gly Glu Thr Gly Leu Pro Ala His
165    170    175

Ala Leu Gln Leu Glu Leu Ala Glu Asp Ala Arg Leu Ser Arg Asp Glu
180    185    190

Lys Ala Val Thr Arg Leu Gln Glu Leu Ser Ala Leu Gly Val Gly Ile
195    200    205

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-151-

Ala Ile Asp Asp Phe Gly Ile Gly Phe Ser Ser Leu Ala Tyr Leu Pro
 210 215 220

Arg Leu Pro Val Asp Val Val Lys Leu Gly Gly Lys Phe Ile Glu Cys
 225 230 235 240

Leu Asp Gly Asp Ile Gln Ala Arg Leu Ala Asn Glu Gln Ile Thr Arg
 245 250 255

Ala Met Ile Asp Leu Gly Asp Lys Leu Gly Ile Thr Val Thr Ala Lys
 260 265 270

Leu Val Glu Thr Pro Ser Gln Ala Ala Arg Leu Arg Ala Phe Gly Cys
 275 280 285

Lys Ala Ala Gln Gly Trp His Phe Ala Lys Ala Leu Pro Val Asp Phe
 290 295 300

Phe Arg Glu
 305

<210> 122

<211> 921

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 122
 atggatcgtt gttgtcagcg cgctacagcg ttcgcttgcg cgctcaggcc gaccaagttg 60
 atcgactacg aagagatggt tagggcgcg atgcaagcgc gagcgatggt agccaatcct 120
 gaccaatggg cggactccga ccgcgaccag gtcaacactc gccattatct gtccacttcg 180
 atgcgcgtgg cactggatcg cggatgaattc ttctcgtct accagccaat catccggctt 240
 gccgacaacc gcatcatcgg cgcgcaggcc ctgctgcgt gggaaacacc gacgttgggc 300
 acgctactcc cggcccggtt catcgaccgt gccgagaaca acggactgat ggtgccgctc 360
 acggccttcg tgcgcagca ggctgcccgc cagtcgcga gttggcgtga ccacagcacc 420
 gacccgcaac cgtttgtcag cgtcaacgtc tccgccagca ccactcgga tcccggcttc 480
 ctggtgctgg tcgaaggtgt gctcggcgaa accggcctgc ccgccatgc cctgcagctc 540
 gaactggcgc aggaacgcgc ccttagcaga gacgagaagg cggtagccag gctacaagaa 600

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-152-

```

ttgtccgctc tcggcgctcg catcgccatc gacgacttcg gcattggatt ctccagcctc 660
gcctaccttc ccgcctctcc cgtcgacttg gtcaaaactcg ggggaaagtt catcgagtgc 720
ctcgatggcg acattcaagc tcggtgggccc aacgaacaga tcaccggggc aatgatcgac 780
cttggcgaca agctcggtat caccgtcact gcaaagctag tcgaacccc cagccaagcc 840
gcccggttgc gcgccttcgg ctgtaagccc gcacaaggct ggcactttgc caaggcactg 900
cgggtcgact ttttcagaga g 921

```

<210> 123

<211> 379

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 123

```

Met Ser Val Arg Leu Ala Asp Val Ile Asp Val Leu Asp Gln Ala Tyr
1 5 10 15

```

```

Pro Pro Arg Leu Ala Gln Ser Trp Asp Ser Val Gly Leu Val Cys Gly
20 25 30

```

```

Asp Pro Asp Asp Val Val Asp Ser Val Thr Val Ala Val Asp Ala Thr
35 40 45

```

```

Pro Ala Val Val Asp Gln Val Pro Gln Ala Gly Leu Leu Leu Val His
50 55 60

```

```

His Pro Leu Leu Leu Arg Gly Val Asp Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro
65 70 75 80

```

```

Lys Gly Val Leu Val His Arg Leu Ile Arg Thr Gly Arg Ser Leu Phe
85 90 95

```

```

Thr Ala His Thr Asn Ala Asp Ser Ala Ser Pro Gly Val Ser Asp Ala
100 105 110

```

```

Leu Ala His Ala Val Gly Leu Thr Val Asp Ala Val Leu Asp Pro Val
115 120 125

```

```

Pro Gly Ala Ala Asp Leu Asp Lys Trp Val Ile Tyr Val Pro Arg Glu

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-153-

```

130          135          140

Asn Ser Glu Ala Val Arg Ala Ala Val Phe Glu Ala Gly Ala Gly His
145          150          155          160

Ile Gly Asp Tyr Ser His Cys Ser Trp Ser Val Ala Gly Thr Gly Gln
165          170          175

Phe Leu Ala His Asp Gly Ala Ser Pro Ala Ile Gly Ser Val Gly Thr
180          185          190

Val Glu Arg Val Ala Glu Asp Arg Val Glu Val Val Ala Pro Ala Arg
195          200          205

Ala Arg Ala Glu Val Leu Ala Ala Met Arg Ala Ala His Pro Tyr Glu
210          215          220

Glu Pro Ala Phe Asp Ile Phe Ala Leu Val Pro Pro Pro Val Gly Ser
225          230          235          240

Gly Leu Gly Arg Ile Gly Arg Leu Pro Lys Pro Glu Pro Leu Arg Thr
245          250          255

Phe Val Ala Arg Leu Glu Ala Ala Leu Pro Pro Thr Ala Thr Gly Val
260          265          270

Arg Ala Ala Gly Asp Pro Asp Leu Leu Val Ser Arg Val Ala Val Cys
275          280          285

Gly Gly Ala Gly Asp Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Ala Ala Asp Val
290          295          300

Gln Ala Tyr Val Thr Ala Asp Leu Arg His His Pro Ala Asp Glu His
305          310          315          320

Cys Arg Ala Ser Gln Val Ala Leu Ile Asp Val Ala His Trp Ala Ser
325          330          335

Glu Phe Pro Trp Cys Gly Gln Ala Ala Glu Val Leu Arg Ser His Phe
340          345          350

Gly Ala Ser Leu Pro Val Arg Val Cys Thr Ile Cys Thr Asp Pro Trp
355          360          365

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-154-

Asn Leu Asp His Glu Thr Gly Arg Asp Gln Ala
370 375

<210> 124

<211> 1137

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 124
atgagtggtgc ggctggcga tgtcatcgac gtgctggacc aggcctaccc gccgcggctt 60
gcccgagtcgt gggattcggg gggctcgggtg tgcggcgacc ccgacgacgt ggtggattcg 120
gtgaccgttg cggtggaacg gacgcggcgg gtggtggacc aggttcccca ggcgggactg 180
ctattggtag accaccggtt gttactgcgt ggggtcgata cggtcgaggc caacacgcca 240
aaggggtgtg tggtagcacc cctgatccgg accggtcgct cgttggttac cgcgcacacc 300
aacgcggact cggcgtcgcc ggggtgtgtcc gacgcgctgg cacacgctgt tggctctgacc 360
gtcgacgcgg ttctcgaccc ggtgcccggg gcggccgata tcgacaagtg ggtcatctat 420
gtgcgcgcgg agaactcaga ggcgggtcgg gcagcggctt ttgaggccgg tgcgggcat 480
atcggcgact actcgactg cagctggagt gtgcgggta ccgggcagtt cctggcgac 540
gacggggcgt cgcgcgccat aggcagcgtc ggtaccgtc aacgggtggc cggagaccgg 600
gtcgaggtcg tcgcaccgc acgagcgcgc gccgaggtgt tggcgcgat gcgcgcggcg 660
cacccttacg aggagcggc attcgacatc ttgcgcgtgg tacgaccgcc ggtcggcagc 720
gggttaggcc gattggcag actgccaaaa ccgaaccgc tgcgcacctt tgttgccctg 780
ctggaggcgg cgttgccgcc gactgcgacc ggtgtgcgcg ccgcggggg tcccgacctg 840
ctggtgtcgc ggtcggcgg ctgcggcggc gccggggact cgttgcttgc caccgtggcc 900
gccgcggacg tgcaagcgta cgttacggcc gatctgcgac atcatccagc cgcagagcat 960
tgccagcctt cgaagtggc cctgatcgac gtcgcgcatt gggcaagcga attcccgtag 1020
tgccgccagg ccgccaagt gttgcggctc catttcggcg cgtcgtgcc ggtgcgtgtg 1080
tgacccatct gcaccgacc gtggaacctc gatcacgaaa ctgggagaga tcaggca 1137

<210> 125

<211> 167

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-155-

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 125

Met Thr His Arg Ser Ser Arg Leu Glu Val Gly Pro Val Ala Arg Gly
1 5 10 15

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

Thr Thr Ser Gly Arg Ile Ser Gly Val Thr Glu Pro Gly Glu Leu Ser
35 40 45

Val His Tyr Pro Phe Pro Ile Ala Asp Leu Val Ala Leu Asp Asp Ala
50 55 60

Leu Thr Tyr Ser Ser Arg Ala Cys Gln Val Arg Phe Ala Ile Tyr Leu
65 70 75 80

Gly Asp Leu Gly Arg Asp Thr Ala Ala Arg Ala Arg Glu Ile Leu Gly
85 90 95

Lys Val Pro Thr Pro Asp Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Ser Pro Asn
100 105 110

Gln Cys Ala Ile Glu Val Val Tyr Gly Ser Gln Val Arg Gly Arg Gly
115 120 125

Ala Glu Ser Ala Ala Pro Leu Gly Val Ala Ala Ala Ser Ser Ala Phe
130 135 140

Glu Gln Gly Glu Leu Val Asp Gly Leu Ile Ser Ala Ile Arg Val Leu
145 150 155 160

Ser Ala Gly Ile Ala Pro Gly
165

<210> 126

<211> 501

<212> DNA

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-156-

<213> Mycobacterium tuberculosis

```

<400> 126
atgacgcacg ggagttcacg gttggaggcg gggccagtcg cactgggtga cgttgcgacg    60
attgagcacg ccgagctgcc gccgggttgg gtgctgacca ccagcggacg gatctcgggg    120
gtcaccgagc cgggggaact gtccgtgcac taccgttcc ccacgcaga tctcgtcgcc    180
ctggacgacg cgtgaccta cagctcgcgg gcgtgtcagg tgaggttcgc catctacctc    240
ggcgacttgg gtctgacac cgcgcgcggg gcccgcgaga tctggggcaa ggtgcccacg    300
ccggacaatg ctgtgctgct cgcggtctcg cccaaccagt gcgccatcga agtggtctac    360
ggctcgcaag tcccgggcgg cgggtccgag tcggcggttc cgtcgggggt tgccgcgcgt    420
tctcagcgt tcgagcaggg tgagctggta gatgggctga tcagcgcgat ccgctgctc    480
agcgcgggga tcgcgcgggg c                                     501

```

<210> 127

<211> 494

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 127

```

Met Thr Asp Ile Ile Arg Ser Asp Ala Ala Thr Leu Ala Ala Lys Ile
1      5      10      15

```

```

Ala Ile Lys Glu Val Ser Ser Ala Glu Ile Thr Arg Ala Cys Leu Asp
20      25      30

```

```

Gln Ile Glu Ala Thr Asp Glu Thr Tyr His Ala Phe Leu His Val Ala
35      40      45

```

```

Ala Asp Glu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ile Asp Lys Gln Val Ala
50      55      60

```

```

Ala Gly Glu Pro Leu Pro Ser Ala Leu Ala Gly Val Pro Leu Ala Leu
65      70      75      80

```

```

Lys Asp Val Phe Thr Thr Ser Asp Met Pro Thr Thr Cys Gly Ser Lys
85      90      95

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-157-

Ile Leu Glu Gly Trp Arg Ser Pro Tyr Asp Ala Thr Leu Thr Ala Arg
 100 105 110
 Leu Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ile Leu Gly Lys Thr Asn Met Asp Glu
 115 120 125
 Phe Ala Met Gly Ser Ser Thr Glu Asn Ser Ala Tyr Gly Pro Thr Arg
 130 135 140
 Asn Pro Trp Asn Leu Asp Arg Val Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Ala Pro Leu Ala Ile Gly Ser Asp
 165 170 175
 Thr Gly Gly Ser Ile Arg Gln Pro Ala Ala Leu Thr Ala Thr Val Gly
 180 185 190
 Val Lys Pro Thr Tyr Gly Thr Val Ser Arg Tyr Gly Leu Val Ala Cys
 195 200 205
 Ala Ser Ser Leu Asp Gln Gly Gly Pro Cys Ala Arg Thr Val Leu Asp
 210 215 220
 Thr Ala Leu Leu His Gln Val Ile Ala Gly His Asp Pro Arg Asp Ser
 225 230 235 240
 Thr Ser Val Asp Ala Glu Val Pro Asp Val Val Gly Ala Ala Arg Ala
 245 250 255
 Gly Ala Val Gly Asp Leu Arg Gly Val Arg Val Gly Val Val Arg Gln
 260 265 270
 Leu His Gly Gly Glu Gly Tyr Gln Pro Gly Val Leu Ala Ser Phe Glu
 275 280 285
 Ala Ala Val Glu Gln Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu Val Ser Glu Val
 290 295 300
 Asp Cys Pro His Phe Asp His Ala Leu Ala Ala Tyr Tyr Leu Ile Leu
 305 310 315 320
 Pro Ser Glu Val Ser Ser Asn Leu Ala Arg Phe Asp Ala Met Arg Tyr

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-158-

325

330

335

Gly Leu Arg Val Gly Asp Asp Gly Thr Arg Ser Ala Glu Glu Val Met
 340 345 350

Ala Met Thr Arg Ala Ala Gly Phe Gly Pro Glu Val Lys Arg Arg Ile
 355 360 365

Met Ile Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Ala Gly Tyr Tyr Asp Ala Tyr Tyr
 370 375 380

Asn Gln Ala Gln Lys Val Arg Thr Leu Ile Ala Arg Asp Leu Asp Ala
 385 390 395 400

Ala Tyr Arg Ser Val Asp Val Leu Val Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr
 405 410 415

Ala Phe Arg Met Gly Glu Lys Val Asp Asp Pro Leu Ala Met Tyr Leu
 420 425 430

Phe Asp Leu Cys Thr Leu Pro Leu Asn Leu Ala Gly His Cys Gly Met
 435 440 445

Ser Val Pro Ser Gly Leu Ser Pro Asp Asp Gly Leu Pro Val Gly Leu
 450 455 460

Gln Ile Met Ala Pro Ala Leu Ala Asp Asp Arg Leu Tyr Arg Val Gly
 465 470 475 480

Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Arg Gly Pro Leu Leu Ser Ala Ile
 485 490

<210> 128

<211> 1482

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 128

gtgacgggaca tcatccgatc cgacgccgcg acgctggccg ccaagatcgc catcaaggag 60

gtgtcgtcgg ccgagatcac ccgggcctgc ctggatcaga tcgaggcgac cgacgagacg 120

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-159-

taccaagcct tcctgcatgt ggaggccgat gaggcgctgg cggcggcggc cggccatcgac 180
aagcaggctgg ccgtgggaga acccttgccg tcggcgctgg ccgggggtgcc gctggcgctc 240
aaggacgtct tcaccaccag cgacatgccc accacctgcg ggtcaaaaat cctggaggga 300
tggtgatctc cctacgaagc cagctgacc gcgcggttgc gcgcgcggg gatcccgatc 360
ctgggcaaga ccaacatgga cgaattcgcg atgggctcgt cgacggagaa ctccgcttac 420
ggtcccccgc gcaaccctg gaattctgac cgggtaccgc cgggttccgc tggcggcagc 480
gcggcggcgc tggcgcgctt ccaggcgccg ctggccatcg gatccgacac cggggggtcg 540
atccgcagc cggcgcgct gaaccgagac gtgcgctca aaccaccta cggcacggtg 600
tcgcgctatg ggctgggtgg ctgcgctcc tcgctggatc agggcgsgcc gtgtgcgcgc 660
accgtcttgg acaccgcgct gttgcatcag gtgategcg gccacgaccc gcgcgactcc 720
acgtcggtcg acgcagaggt gcccgacgtg tgggcgccg ctaggcgccg cgcggtcggg 780
gatctgcgtg gctgctgggt cggcggtgtt cgacagctgc acggcggcga gggctaccag 840
ccggcgctgc tggcctcctt cgaggctgcc gtggagcagc taaccgcgt gggcgctgag 900
gtcagcgagg tcgactgccc gaacttcgac catgcctgg ccgcctatta cctgattctg 960
ccctcggagg tctcgagcaa tctggcgcg ttcgacgca tgcgtaagg gctgcgggtc 1020
ggcgacgacg gcaccgcag cgcgaggag gtgatggcga tgacccgggc cgcgggttcc 1080
gggcccagg tcaagcggcg catcatgac ggcacotacg cgttctcggc cggctactac 1140
gacgcctatt acaaccaggc gcagaaggcg cgcacgctga tcgccgcga cctcgacgcg 1200
gcgtatcggt ccgtcgacgt gctggtctcg ccacgaccc cgaccaccgc gttccggatg 1260
ggtgagaagg tggacgatcc gctggcgatg tacttgctcg acctgtcac gctgcgctg 1320
aacttggccg gccactgcgg catgtctgtg ccgtcggggc tctcccgga cgacgggttg 1380
ccggttggcc tacagatcat ggcccgga ttggcgacg accggctcta ccgggtgggg 1440
gcggcttatg agggcgcccg cggcccgcta ctgagcgca tt 1482

<210> 129

<211> 387

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 129

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-160-

Met Thr Val Gly Leu Gly Met Pro Gln Pro Pro Ala Pro Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Ala Thr Arg Gln Leu Met Val Gly Asn Val Gly Val Gly
 20 25 30

Ser Asp His Pro Val Ser Val Gln Ser Met Cys Thr Thr Lys Thr His
 35 40 45

Asp Val Asn Ser Thr Leu Gln Gln Ile Ala Glu Leu Thr Ala Ala Gly
 50 55 60

Cys Asp Ile Val Arg Val Ala Cys Pro Arg Gln Glu Asp Ala Asp Ala
 65 70 75 80

Leu Ala Glu Ile Ala Arg His Ser Gln Ile Pro Val Val Ala Asp Ile
 85 90 95

His Phe Gln Pro Arg Tyr Ile Phe Ala Ala Ile Asp Ala Gly Cys Ala
 100 105 110

Ala Val Arg Val Asn Pro Gly Asn Ile Lys Glu Phe Asp Gly Arg Val
 115 120 125

Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ile Pro Ile Arg Ile
 130 135 140

Gly Val Asn Ala Gly Ser Leu Asp Lys Arg Phe Met Glu Lys Tyr Gly
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Pro Glu Ala Leu Val Glu Ser Ala Leu Trp Glu Ala Ser
 165 170 175

Leu Phe Glu Glu His Gly Phe Gly Asp Ile Lys Ile Ser Val Lys His
 180 185 190

Asn Asp Pro Val Val Met Val Ala Ala Tyr Glu Leu Leu Ala Ala Arg
 195 200 205

Cys Asp Tyr Pro Leu His Leu Gly Val Thr Glu Ala Gly Pro Ala Phe
 210 215 220

Gln Gly Thr Ile Lys Ser Ala Val Ala Phe Gly Ala Leu Leu Ser Arg
 225 230 235 240

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-161-

Gly Ile Gly Asp Thr Ile Arg Val Ser Leu Ser Ala Pro Pro Val Glu
 245 250 255

Glu Val Lys Val Gly Asn Gln Val Leu Glu Ser Leu Asn Leu Arg Pro
 260 265 270

Arg Ser Leu Glu Ile Val Ser Cys Pro Ser Cys Gly Arg Ala Gln Val
 275 280 285

Asp Val Tyr Thr Leu Ala Asn Glu Val Thr Ala Gly Leu Asp Gly Leu
 290 295 300

Asp Val Pro Leu Arg Val Ala Val Met Gly Cys Val Val Asn Gly Pro
 305 310 315 320

Gly Glu Ala Arg Glu Ala Asp Leu Gly Val Ala Ser Gly Asn Gly Lys
 325 330 335

Gly Gln Ile Phe Val Arg Gly Glu Val Ile Lys Thr Val Pro Glu Ala
 340 345 350

Gln Ile Val Glu Thr Leu Ile Glu Glu Ala Met Arg Leu Ala Ala Glu
 355 360 365

Met Gly Glu Gln Asp Pro Gly Ala Thr Pro Ser Gly Ser Pro Ile Val
 370 375 380

Thr Val Ser
 385

<210> 130

<211> 1161

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 130
 gtgactgtag gcttgggcat gccgcagccc ccggcaccca cgctcgctcc ccggcgcgcc 60
 acccgtcagc tgatggtcgg caacgtcggc gtgggcagtg accatccggt ctcggtgcaa 120
 togatgtgca ccacaaaaac ccacgacgtc aactcgacat tgcaacaaat cgcgcagctg 180

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-162-

```

accgcggccg gatgcgacat cgtgcgggtg gctgcccgc gccaggagga cgcgcgcgcg 240
ctggcccgaga tcgcccgga cagccagatc ccggtagtcg cggacataca ttccagccg 300
cgctacatat tcgccgcat cgaagctgga tgcgcgcgcg tcggggtcaa ccggggcaac 360
atcaaggagt ttgacggccg ggtgggtgag gtcccaagg cggcgggtgc ggcgggagc 420
ccgatccgaa tcggtgtcaa cgcgggttcg ctggacaaac ggttcattga gaagtatggc 480
aaagccacgc cgcgggcgt ggttgagtcg gcgctgtggg aggttcgct ttccgaggag 540
catggttcg gtgacatcaa gatcagcgtc aagcacaac acccggtggt gatggtcgcc 600
gcctcagagc tgcctgctgc acggtgcgac taccactgc acctcggtgt caccgagcc 660
ggccctgctt tccagggcac catcaagtc gcggttcct tcggcggtt gctgtcgcg 720
ggcataggcg acaccatccg ggtgtcgttg tcggcccgcc cggtcgagga agtcaaggcg 780
ggcaatcagg ttctcagtc gttgaacctg cggcccggtt cgctcagat cgtgtcttcg 840
ccgtcgtgcg gtgcgcgca agtcgacgtc tacacctgg ccaacgaggt aacgcgcgc 900
ctggatggtc tcgatgtgcc gttcgggtg gccgtgatgg ggtgtgtcgt caatggtcgc 960
ggtgaagcac gtgaggccga cctgggcgtg gcgtccgca acggcaagg tcagatcttt 1020
gtacggggcg aagtgatcaa gaccgtgcc gaagcacaga tcgtcgagc gctgatcgag 1080
gaggcgatgc ggtggccgc cgaatgggc gagcaagtc cgggcgcgac accgagcggc 1140
tcgctattg tgaccgtaag c 1161

```

<210> 131

<211> 132

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 131

```

Met Thr Met Thr Asp Pro Ile Ala Asp Phe Leu Thr Arg Leu Arg Asn
1           5           10          15

```

```

Ala Asn Ser Ala Tyr His Asp Glu Val Ser Leu Pro His Ser Lys Leu
20          25          30

```

```

Lys Ala Asn Ile Ala Gln Ile Leu Lys Asn Glu Gly Tyr Ile Ser Asp
35          40          45

```


WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-163-

Phe Arg Thr Glu Asp Ala Arg Val Gly Lys Ser Leu Val Ile Gln Leu
50 55 60

Lys Tyr Gly Pro Ser Arg Glu Arg Ser Ile Ala Gly Leu Arg Arg Val
65 70 75 80

Ser Lys Pro Gly Leu Arg Val Tyr Ala Lys Ser Thr Asn Leu Pro Arg
85 90 95

Val Leu Gly Gly Leu Gly Val Ala Ile Ile Ser Thr Ser Ser Gly Leu
100 105 110

Leu Thr Asp Arg Gln Ala Ala Arg Gln Gly Val Gly Gly Glu Val Leu
115 120 125

Ala Tyr Val Trp
130

<210> 132

<211> 396

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 132
atgacgatga cggaccgat cgcagacttt ttgaccggtc tgcgtaacgc caactcggcg 60
..tatcacgacg aggtcagctt gccgactcc aagctcaagg ccaacatcgc gcagattctc 120
aagaacgagg ggtacatcag cgacttcga accgaggacg ctccgggtcgg taaatcgtg 180
gttatccagc tcaagtacgg cctagccgg gagcgagca tcgccgggtt gcggcgggtg 240
tccaagcccg gctgcgggt gtacgcgaaa tccaccaatc tgcgcgggt gctcggcggc 300
ctgggcgtgg cgatcatctc gacctctcg ggctgtctga ctgaccggca ggcagctaga 360
cagggcgtgg gcggcgaagt cctcgcatat gtctgg 396

<210> 133

<211> 388

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-164-

<400> 133

Met Ala Gly Ser Ala Thr Val Glu Lys Arg Leu Asp Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Pro Leu Gln Met Thr Ile Asp Gly Thr Pro Val Pro Ser Gly Thr
 20 25 30

Pro Lys Gln Arg Ala Val Leu Ala Met Leu Val Ile Asn Arg Asn Arg
 35 40 45

Pro Val Gly Val Asp Ala Leu Ile Thr Ala Leu Trp Glu Glu Trp Pro
 50 55 60

Pro Ser Gly Ala Arg Ala Ser Ile His Ser Tyr Val Ser Asn Leu Arg
 65 70 75 80

Lys Leu Leu Gly Gly Ala Gly Ile Asp Pro Arg Val Val Leu Ala Ala
 85 90 95

Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Ser Ile Pro Asp Asn Thr Cys Asp Leu
 100 105 110

Gly Arg Phe Val Ala Glu Lys Thr Ala Gly Val His Ala Ala Ala Ala
 115 120 125

Gly Arg Phe Glu Gln Ala Ser Arg His Leu Ser Ala Ala Leu Arg Glu
 130 135 140

Trp Arg Gly Pro Val Leu Asp Asp Leu Arg Asp Phe Gln Phe Val Glu
 145 150 155 160

Pro Phe Ala Thr Ala Leu Val Glu Asp Lys Val Leu Ala His Thr Ala
 165 170 175

Lys Ala Glu Ala Glu Ile Ala Cys Gly Arg Ala Ser Ala Val Ile Ala
 180 185 190

Glu Leu Glu Ala Leu Thr Phe Glu His Pro Tyr Arg Glu Pro Leu Trp
 195 200 205

Thr Gln Leu Ile Thr Ala Tyr Tyr Leu Ser Asp Arg Gln Ser Asp Ala
 210 215 220

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-165-

Leu Gly Ala Tyr Arg Arg Val Lys Thr Thr Leu Ala Asp Asp Leu Gly
 225 230 235 240

Ile Asp Pro Gly Pro Thr Leu Arg Ala Leu Asn Glu Arg Ile Leu Arg
 245 250 255

Gln Gln Pro Leu Asp Ala Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Ala Ala Gly
 260 265 270

Thr Val Thr Val Leu Asp Gln Arg Thr Met Ala Ser Gly Gln Gln Ala
 275 280 285

Val Ala Tyr Leu His Asp Ile Ala Ser Gly Arg Gly Tyr Pro Leu Gln
 290 295 300

Ala Ala Ala Thr Arg Ile Gly Arg Leu His Asp Asn Asp Ile Val Leu
 305 310 315 320

Asp Ser Ala Asn Val Ser Arg His His Ala Val Ile Val Asp Thr Gly
 325 330 335

Thr Asn Tyr Val Ile Asn Asp Leu Arg Ser Ser Asn Gly Val His Val
 340 345 350

Gln His Glu Arg Ile Arg Ser Ala Val Thr Leu Asn Asp Gly Asp His
 355 360 365

Ile Arg Ile Cys Asp His Glu Phe Thr Phe Gln Ile Ser Ala Gly Thr
 370 375 380

His Gly Gly Thr
 385

<210> 134

<211> 1164

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 134
 atggctggta ggcgcacagt ggagaagcgg ctgcacttcg gcctgcttgg accattgcag 60
 atgactatcg acggcaccac ggtgccatcg ggcaccccac agcaacgggc tgtgctagcc 120

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-166-

```

atgttggtca tcaaccgcaa caggcccgta ggagtcgacg cccataacac cgcctctctgg 180
gaggagtggc caccctcggg cgcacgcgcg agtatccact cctacgtgtc taatctcggt 240
aagctcctcg gtggcgcggg gatcgaccca cgggtggtgt tggccgcagc gccgcgggg 300
talcggtcca gcaccccca caacacttgc gatctggggc ggtttgttgc cgaaaaaacc 360
gcgggcgtgc acgcgcgcgc cgcgcgcgcg ttccaacaag ccagccgcca cctgtcggcc 420
gcattgagag aatggcgtgg gccggtgtc gatgacctgc gcgacttcca gttctcgaa 480
ccctttgcca cggcgtggt agaagacaag gttctgtccc ataccgcaa ggccgaggcc 540
gaaatcgctg gtgggggggc cagcgcagtg atcgccagc tcgaggctct gacattcgaa 600
caccctacc gggagccgct gtggacacag ctgataccg cctactacct ctccgacgg 660
caatccgatg cgtggggcgc ctatcgccgg gtgaagaca cactggcga cgacctggc 720
atcgacccgc gtccgagtt gccgcgtctc aacgagcga ttctgcgtca gcaaccgtg 780
gatgccaaga agtcgcgcaa aaccaccgct gccgcacgc tcacggtgct cgatcagcc 840
accatggcgt cggccagcca ggcggtggcc tacctgcacg acatcgctc gggtcgcggc 900
taccactgc aagccgcggc gaccggatc ggcgtctgc atgacaaga catcgtcta 960
gacagcgcca acgtcagcgc ccaccacgcc gtcacgtcg acacgggca ccaactacgtc 1020
atcaacgacc tccgatcgtc caacggcgtg catgtgcagc acgagcgaat ccgctccgcg 1080
gtcacgtga acgacggcga ccacattcgc atctgtgacc atgaattcac gttccagatc 1140
agcgcgggga cgcattggcg cacg 1164

```

<210> 135

<211> 441

<212> FRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 135

```

Met Pro Gly Asp Glu Lys Pro Val Gly Val Ala Val Leu Gly Leu Gly
1          5          10          15

Asn Val Gly Ser Glu Val Val Arg Ile Ile Glu Asn Ser Ala Glu Asp
20          25          30

Leu Ala Ala Arg Val Gly Ala Pro Leu Val Leu Arg Gly Ile Gly Val

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-167-

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

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-168-

Ala Leu Val Pro Leu Ser His Pro Leu Ala Ala Val Asn Gly Ala Phe
 275 280 285

Asn Ala Val Val Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg Leu Met Phe Tyr
 290 295 300

Gly Gln Gly Ala Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Thr Gly Asp
 305 310 315 320

Leu Val Met Ala Ala Arg Asn Arg Val Leu Gly Ser Arg Gly Pro Arg
 325 330 335

Glu Ser Lys Tyr Ala Gln Leu Pro Val Ala Pro Met Gly Phe Ile Glu
 340 345 350

Thr Arg Tyr Tyr Val Ser Met Asn Val Ala Asp Lys Pro Gly Val Leu
 355 360 365

Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Ala Lys Arg Glu Val Ser Ile Ala Glu
 370 375 380

Val Arg Gln Glu Gly Val Val Asp Glu Gly Gly Arg Arg Val Gly Ala
 385 390 395 400

Arg Ile Val Val Val Thr His Leu Ala Thr Asp Ala Ala Leu Ser Glu
 405 410 415

Thr Val Asp Ala Leu Asp Asp Leu Asp Val Val Gln Gly Val Ser Ser
 420 425 430

Val Ile Arg Leu Glu Gly Thr Gly Leu
 435 440

<210> 136

<211> 1323

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 136
 gtgcccgggtg acgaaaagcc ggtcggcgta gcggtactcg gtttgggcaa cgtcggcagc 60
 gaggttgctc gcatcatcga gaacagcgcc gaggatctcg cggctcgtgt cggtgcccca 120

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-169-

```

ttggctcctgc ggggcacccg cgtgcgccgc gtgacgaccg atcgccgctg gccgatcgaa 180
ttgttgaccg acgacaltga agagctcgtg gcccgcgagg atgtcgatat cgtggtggaa 240
gtgatggggc cgggtggaac gtccgcgaag gcgatcctgg gcgcccttga gcgcggcaag 300
tccgtcgtta cggcgaaaca ggctttactc gccacctcca ccggcggaatt ggcacaggcc 360
gccgaaagcg cccatgttga tctgtatttc gaggcggccg tggcgggcgc cattccggtc 420
atccgtccgc tcaccagtc gctggccggc gacacggtgc tgcgagtggc cgggatcgtc 480
aacggcacca ccaactacat cctctcggcg atggacagca ccggcgctga ctatgccago 540
gccctggccg acgcaagtgc gctgggctat gcggaggtcg atcccacgc agacgtcgaa 600
ggctacgacg ccgcggccaa ggcagcgatc ctggcataca ttgccttcca caccgggtg 660
accgcagacg acgtgtatcg cgaaggcacc aaccaaggtca ctccggcga cttcggatcc 720
gcgcacgcgc tgggttgca ccatcaaatg ctgtcgatct gtgagcgcat aaccacgac 780
gaaggttcgc agcgggtatc ggcgccgctc tatccggccc tggtaacctc gtgcacccg 840
cttgcccgcg tcaacggcgc gttcaatgcc gtggtggtcg aggcggaggc cgcggggcgg 900
ctgatgttct acggccaggc cgcgggcggc gcgcgcacgc cctctcggtg gaccggtgac 960
ctagtgtatg ccgcccgcaa ccgggtactc ggacgcgcgc gcccctgga gtctaaatac 1020
gtcaaatctc cggtggcacc aatgggttcc attgaaacgc gctattacgt cagcatgaac 1080
gtccgcgaca agcggggcgt cttgtccgcg gtggcgccgc aattcgccaa acgcgaggtg 1140
agcatcgccg aggtgcgcca ggagggcggt gtggacgaag gtggtcgacg ggtgggagcc 1200
cgaatcgtgg tggtcacgca cctcgccact gacgcgcgac tctcggaac cgttgatgca 1260
ctggacgact tggatgtcgt gcagggtgtg tccagcgtga tacgactgga aggaaccggc 1320
tta 1323

```

<210> 137

<211> 216

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 137

```

Met Ser Asn Pro Gln Pro Glu Lys Val Arg Val Val Val Gly Asp Asp
1          5          10          15

```

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-170-

His Pro Leu Phe Arg Glu Gly Val Val Arg Ala Leu Ser Leu Ser Gly
 20 25 30
 Ser Val Asn Val Val Gly Glu Ala Asp Asp Gly Ala Ala Ala Leu Glu
 35 40 45
 Leu Ile Lys Ala His Leu Pro Asp Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Met
 50 55 60
 Pro Gly Met Asp Gly Ala Gln Val Ala Ala Val Arg Ser Tyr Glu
 65 70 75 80
 Leu Pro Thr Arg Val Leu Leu Ile Ser Ala His Asp Glu Pro Ala Ile
 85 90 95
 Val Tyr Gln Ala-Leu-Gln Gln Gly Ala Ala Gly Phe Leu Leu Lys Asp
 100 105 110
 Ser Thr Arg Thr Glu Ile Val Lys Ala Val Leu Asp Cys Ala Lys Gly
 115 120 125
 Arg Asp Val Val Ala Pro Ser Leu Val Gly Gly Leu Ala Gly Glu Ile
 130 135 140
 Arg Gln Arg Ala Ala Pro Val Ala Pro Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg
 145 150 155 160
 Glu Val Leu Asn Arg Ile Ala Cys Gly Gln Ser Ile Pro Ala Ile Ala
 165 170 175
 Ala Glu Leu Tyr Val Ala Pro Ser Thr Val Lys Thr His Val Gln Arg
 180 185 190
 Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Val Ser Asp Arg Ala Ala Val Ala Glu
 195 200 205
 Ala Met Arg Gln Arg Leu Leu Asp
 210 215
 <210> 138
 <211> 648
 <212> DNA

WO 03/000721

PCT/GB02/02845

-171-

<213> Mycobacterium tuberculosis

```
<400> 138
atgagcaatc cgcagccgga gaaagtgcgc gtggtggtcg gcgacgacca cccgttattt    60
cgcgagggcg ttgtgcgagc gctttcgttg agtggctcgg tgaacgtggt cggcgaggcc    120
gacgaaggcg ccgcggccct ggagttgata aaggccatt tgcgcacgt cgcattgctg    180
gactaccgca tgcgcggcat ggaaggcgcg cagggttcgg cggcggtcgg cagctacgag    240
ttgccaaccg ggggtgctgt tatttcgcgc cgcgacgagc cggcgatcgt ctaccaggca    300
ctccaacagg gcgcgcgcgg attcctgctc aaggattcga ctgcaccca gatcgtcaag    360
cggtgctcgc attcgcgaa gggccgcgac gtggtggcgc cctcgtggt cgggggcctc    420
gccggggaga ttgcacagcg cgcggcaccg gtggcccggg tgctcagcgc gcgcgagcgc    480
gaggtgctca atcgcaatgc gtgcggtaaa agcctccccc cgatcgagc cgagctatat    540
gtggcgccgt cgacggtaaa gaccacgtg caacggttgt acgagaagct cggcgtcagc    600
gaccgagctg ccgcggtcgc cgaggcgatg cggcagaggc tgctcgac    648
```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000721 A3

(51) International Patent Classification: C07K 14/35

(21) International Application Number: PCT/GB02/02845

(22) International Filing Date: 21 June 2002 (21.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0115365.9 22 June 2001 (22.06.2001) GB
0121780.1 7 September 2001 (07.09.2001) GB(71) Applicant (for all designated States except US): MICRO-
BIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY [GB/GB];
CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (GB).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

Published:

with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
26 June 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): JAMES, Brian,
William [GB/GB]; Microbiological Research Authority,
CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (GB).
BACON, Joanna [US/US]; Microbiological Research
Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire
SP4 0JG (US). MARSH, Philip [GB/GB]; Microbiologi-
cal Research Authority, CAMR, Porton Down, Salisbury,
Wiltshire SP4 0JG (GB).(74) Agents: MACLEAN, Martin, Robert et al.; Mathys &
Squire, 100 Gray's Inn Road, London WC1X 8AL (GB).

WO 03/000721 A3

(54) Title: MYCOBACTERIAL ANTIGENS EXPRESSED UNDER LOW OXYGEN TENSION

(57) Abstract: A method is provided for identifying mycobacterial genes that are induced or up-regulated under continuous culture conditions defined by a dissolved oxygen tension of up to 10 % air saturation measured at 37 °C when compared with a dissolved oxygen tension of at least 40 % air saturation measured at 37 °C. Said induced or up-regulated genes form the basis of nucleic acid vaccines, or provide targets to allow preparation of attenuated mycobacteria for vaccines against mycobacterial infections. Similarly, peptides encoded by said induced or up-regulated genes are employed in vaccines. In a further embodiment, the identified genes/peptides provide the means for identifying the presence of a mycobacterial infection in a clinical sample by nucleic acid probe or antibody detection.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/02845
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/35		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online' 30 June 1996 (1996-06-30) COLE ST ET AL.: "Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 60/162" Database accession no. Z75555 XP002228576 see CDS 3078-3398; Rv1344 - & COLE ST ET AL.: "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence" NATURE, vol. 393, 11 June 1998 (1998-06-11), pages 537-544, XP002187736 --- -/--	1, 2, 12-27
X		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 January 2003		24. 04. 03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentstraet 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2340, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Morawetz, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Publication No. PCT/GB 02/02845
*C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHERMAN D R ET AL: "REGULATION OF THE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS HYPOXIC RESPONSE GENE ENCODING ALPHA-CRYSTALLIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, WASHINGTON, US, vol. 98, no. 13, 19 June 2001 (2001-06-19), pages 7534-7539, XP002228574 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,2, 12-27
X	YUAN ET AL: "The 16-kDa alpha-crystallin (ACR) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 95, no. 16, 4 August 1998 (1998-08-04), pages 9578-9583, XP002228575 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,2, 12-27
X	CUNNINGHAM A F ET AL: "Mycobacterial stationary phase induced low oxygen tension: Cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 180, no. 4, February 1998 (1998-02), pages 801-808, XP002217752 ISSN: 0021-9193 the whole document	1,2, 12-27
A	JAMES B W ET AL: "THE PHYSIOLOGY AND PATHOGENICITY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS GROWN UNDER CONTROLLED CONDITIONS IN A DEFINED MEDIUM" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, vol. 88, no. 4, 2000, pages 669-671, XP000929200 ISSN: 1364-5072 abstract page 676, left-hand column, paragraph 2	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat. application No. PCT/GB 02/02845
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☒ Claims Nos.: 9-11 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Claims 1, 2, 9-27 (all partially)	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/GB 02/02845

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 9-11

Present claim 1 relates to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely an isolated mycobacterial peptide or a fragment or variant or derivative thereof, wherein the peptide is encoded by a gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under defined conditions. The claim covers all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to SEQ ID NO: 1 (first invention). Similar objections apply to claims 9-11 which have not been searched since the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for any of such products, and claims 12, 16, 19, 22-27 which have been searched insofar relating to SEQ ID NO: 1 or 2 (first invention).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International application No.

PCT/GB 02/02845

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1, 2, 9-27 (all partially)

1.1. Claims: 1, 9-12, 14, 16, 19, 22, 23 and 18, 21, 24-27 (all partially)

An isolated mycobacterial peptide or fragment or variant or derivative thereof, wherein the peptide is encoded by a gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium under defined culture conditions; and subject-matter related thereto.

1.2. Claims: 2, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 24-27 (all partially)

An isolated peptide according to claim 1 wherein the peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1; and subject-matter related thereto.

Inventions 2-69: Claims 2, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 24-27 (all partially)

An isolated peptide according to claim 1 wherein the peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2 (Invention 2) - SEQ ID NO: 137 (Invention 69); and subject-matter related thereto.

Invention 70: Claims 3-8 (all completely)

A method for identifying a mycobacterial gene the expression of which is induced or up-regulated during culture of a mycobacterium, and subject-matter related thereto.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/06	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/35	A 6 1 P 31/06	
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 14/35	
C 1 2 N 1/21	C 0 7 K 16/12	
C 1 2 N 9/99	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 N 9/99	
G 0 1 N 33/569	C 1 2 Q 1/68	A
	G 0 1 N 33/569	F

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ベーコン, ジョアンナ

イギリス国 エスピー４ Ｏジェイジー ウィルトシャー, ソールズベリー, ポートン ダウン (番地なし), ヘルス プロテクション エージェンシー

(72)発明者 マーシュ, フィリップ

イギリス国 エスピー４ Ｏジェイジー ウィルトシャー, ソールズベリー, ポートン ダウン (番地なし), ヘルス プロテクション エージェンシー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 CA04 CA05 CA09 CA11 DA05 DA06 GA14
HA14 HA17
4B063 QA13 QA19 QQ06 QQ42 QQ43 QQ52 QQ53 QR32 QR35 QR36
QR38 QR55 QR62 QR75 QS25 QS34
4B065 AA26X AA36X AA36Y AB01 BA02 BA14 BC14 CA24 CA44 CA46
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB352
4C085 AA03 AA14 AA15 CC02 CC23 EE01 GG02 GG06 GG10
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA75 DA86 EA29 EA52 FA74