

ÖZET**REAKTİVASYONU ÖNLEMEK ÜZERE BİR TÜBERKÜLOZ TB AŞISI**

Mevcut buluş, tüberküloz kompleksi mikroorganizmalarının (*Mycobacterium tuberculosis*., *M.bovis*, *M.africanum*) türlerinden kaynaklanan latent tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyonunu önlemek üzere latent olarak enfekte bireylere uygulanabilen bir aşığı veya immünojenik bileşimi açıklar, Buluş, enfeksiyonun farklı aşamalarında temel olarak ifade edilen birçok *M. tuberculosis* derive protein ve protein fragmanına bağlıdır. Buluş, bu polipeptidler, bunların immünolojik olarak aktif fragmanları ve aşılar gibi immünolojik bileşimlere yönelik bunları kodlayan genlerin kullanımı ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. M.tuberculosis enfeksiyonu sırasında temel olarak ifade edilen bir antijen veya söz konusu antijeni kodlayan bir nükleik asidi içeren, M.tuberculosis ile latent olarak enfekte bireylerde tüberkülozun reaktivasyonunun önlenmesine kullanıma yönelik bir aşı olup, özelliği ESX-1 salgılama sistemine ait olan antijenin, aşağıdaki unsurlardan oluşan gruptan seçilmesidir
 - i) ESAT6, CFP10, Rv3614c, Rv3615c, EspR, Rv3868, Rv3869, Rv3870, Rv3871, Rv3872, Rv3873, Rv3876, Rv3877, Rv3878, Rv3879c, Rv3880c, Rv3881c, Rv3882c, Rv3883c ve Rv3865,
 - ii) (i)'deki dizilerin herhangi birine ait bir B-hücre veya T-hücreye yönelik bir epitop içeren bir immünojenik parça; ve
 - iii) (i) veya (ii)'deki dizilerin herhangi birine en az %90'lık dizi özdeşliğine sahip olan ve aynı zamanda bir terapötik aşı olarak uygulanması durumunda latent tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyonunu önlemesi aracılığıyla immünojenik olan bir amino asit dizisi analogu.
2. İstem 1'e göre kullanıma yönelik aşı olup, özelliği polipeptidlerin mikobakteriler familyasının içinde bakteriler aracılığıyla ifade edilen bir antijene kaynaşık olmasıdır.
3. İstem 2'ye göre kullanıma yönelik aşı olup, özelliği füzyon partnerinin, temel olarak ifade edilen bir antijen olmasıdır.
4. CFP10'a kaynaşık ESAT6 içeren, istem 3'e göre kullanıma yönelik aşıdır.
5. Mikobakteriyel genleri ifade eden bakteriler veya virüsler gibi geni değiştirilmiş organizmalar olan canlı rekombinant aşılardan veya yukarıda açıklanan proteinlere yönelik genleri veya gen fragmanlarını ifade eden plazmidler olan DNA aşılardan veya immünojenik dağıtım sistemleri veya bir adjuvan gibi bir dağıtım sisteminde dağıtılan proteinlerin kendileri veya proteinlerin kendilerinden derivate edilen sentetik peptidler olan protein aşılardan arasından seçilen ek bir dağıtım sistemi içeren, önceki istemlerden herhangi birine göre kullanıma yönelik aşıdır.

6. İstem 5'e göre kullanıma yönelik aşı olup, özelliği adjuvanın DDA/TDB ve/veya poli I:C içermesidir.
- 5 7. Önceki istemlerden herhangi birine göre kullanıma yönelik aşı olup, özelliği polipeptidin kendini destekleyici bir etkisine imkan sağlamak amacıyla amino asit dizisinin lipidlenmesidir.
8. Latent tüberküloz tedavisinde kullanıma yönelik istemler 1 - 4'ten herhangi birinde tanımlanan gruptan seçilen bir antijendir.
- 10 9. Mycobacterium tuberculosis, M.bovis ve M.africanum'dan oluşan gruptan seçilen tüberküloz kompleksi türlerinden kaynaklanan latent enfeksiyonların reaktivasyonuna karşı bir aşının üretiminde kullanıma yönelik istemler 1 - 7'den herhangi birinde tanımlanan gruptan seçilen bir antijendir.
- 15 10. İstem 9'a göre kullanıma yönelik antijen olup, özelliği söz konusu aşının akut aşamalı enfeksiyon sonrasında ve/veya latent aşamalı enfeksiyon sırasında uygulamaya yönelik olmasıdır.
- 20 11. İstemler 9-10'dan herhangi birine göre kullanıma yönelik antijen olup, özelliği aşının istem 1-4'te tanımlandığı üzere bir veya daha fazla immünojenik parça içermesidir.

TARİFNAME

REAKTİVASYONU ÖNLEMELİK ÜZERE BİR TÜBERKÜLOZ TB AŞISI

Buluş Sahası

5

Mevcut buluş, ESAT6, CFP10 gibi temel olarak ifade edilen antijenleri ve ESX-1 salgılama sisteminden diğer antijenleri hedefleme aracılığıyla, tüberküloz kompleksi mikroorganizmalarının (*Mycobacterium tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*) türlerinden kaynaklanan latent tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyonunu önlemek üzere latent olarak enfekte bireylere uygulanabilen bir aşığı açıklar.

10

Genel Altyapı

15

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) kaynaklanan insan tüberküloz, WHO'ya göre yıllık olarak yaklaşık 3 milyon ölümden sorumlu olan, ciddi bir küresel sağlık sorunudur. Yeni tüberküloz (TB) vakalarının dünya çapında görülme sıklığı 1960'lar ve 1970'ler sırasında düşmüştür, ancak son on yıllarda bu eğilim, kısmen AIDS'in gelmesi ve *M. tuberculosis*'in çoklu ilaca dirençli suşlarının görülmesi nedeniyle belirgin şekilde değişmiştir.

20

Tüberküloz kompleksi organizmaları çeşitli hastalıklara neden olabilir, ancak en yaygın invazyon şekli bakterinin inhalasyonu aracılığıyla. Bu, akciğerde sonuç olarak vücudun diğer bölümlerine yayılabilen bir enfeksiyon başlatır. Genelde bu enfeksiyon, immün sistem aracılığıyla büyürken kısıtlanır, böylece enfekte bireylerin çoğunluğu en sonunda geçecek olan öksürük ve ateş dışında az belirti gösterir. Bireylerin yaklaşık olarak %30'u enfeksiyonu kontrol altına alamaz ve bunlar birincil hastalığa yakalanacaktır, bu çoğu vakada en sonunda ölümcül olacaktır. Ancak, görünür bir şekilde enfeksiyonu kontrol altına alan bu bireylerin dahi, büyük olasılıkla hayatlarının geri kalanı boyunca enfekte kalacağına inanılır. Şüphesiz yıllar veya on yıllar boyunca sağlıklı olan bireyler, aniden tüberküloza yakalanabilir, bunun birçok yıl önce enfekte oldukları aynı organizmadan kaynaklandığı kanıtlanmıştır. *M. tuberculosis* ve TB kompleksinin diğer organizmaları, mikobakterilerin immün yanıtı kaçabilmesi ve refrakter bir çoğalmama veya yavaş çoğalma aşamasında uzun süreler boyunca sağ kalabilmesi bakımından eşsizdir. Bu latent TB olarak refere edilir ve şu anda, dünya

25

30

nüfusunun yaklaşık olarak 1/3'ünü etkilediği tahmin edilen oldukça önemli bir küresel sağlık sorunudur (Anon., 2001).

Klinik kullanıma yönelik halihazırda mevcut olan tek aşı, etkinliği bir tartışma konusu olarak kalan bir aşı olan BCG'dir. BCG'nin birincil enfeksiyon hayvan modellerinde devamlı olarak iyi performans göstermesine rağmen, açık bir şekilde TB salgınına kontrol altına alamamıştır. Bununla uyumlu olarak BCG aşısının, yetişkin hastalığına (bu çoğu zaman çocuklukta kazanılan latent enfeksiyonun reaktivasyonudur) karşı az veya sıfır koruma sunarken, pediatrik TB'ye (bu birincil enfeksiyondan kaynaklanır) karşı koruma sağlar gibi görünür. Ayrıca halihazırda mikobakterilere alerjisi olan veya latent olarak enfekte olan bireylerin aşılmasının, etkisiz olduğu gösterilmiştir.

Bir *M. tuberculosis* enfeksiyonunun gidişatı, şekil 1'de açıklandığı üzere esas olarak 3 faz aracılığıyla ilerler. Akut faz sırasında, immün yanıt enfeksiyonu kontrol altına alabildiği, bundan dolayı bakteri yüklemesinin pik yaptığı ve azalmaya başladığı noktaya artana kadar bakteriler organlarda çoğalır. Bunun sonrasında, bakteri yüklemesinin düşük bir seviyede sabit tutulduğu bir latent faz oluşturulur. Bu fazda, *M. tuberculosis*'in aktif çoğalmadan bir uyku hali durumuna geçtiği, esas olarak çoğalmayan hale geldiği ve granülom içinde kaldığı, mevcut düşünce olmuştur.

Ancak yakın zamanda, sabit düşük bakteri sayısı ile karakterize edilen enfeksiyon aşamasında dahi, bakteri popülasyonunun en az bir kısmının bir aktif metabolizma durumunda kaldığı anlaşılır hale gelmiştir (Talaat AM et al. 2007). Bu bakteriler dolayısıyla sağ kalır, bir aktif metabolizmayı sürdürür ve güçlü bir immün yanıt karşısında çoğalır. Enfekte bireyde dolayısıyla çoğalmayan bakteriler (bunların intraselüler olarak bulunması nedeniyle, immün sistemin saptaması oldukça zor olabilir) ile immün konakçıda karşılaşılan düşman ortama uyum sağlamak amacıyla aktif ancak değişmiş bir ifade profiline sahip olan, yavaş çoğalan bakteriler arasında bir denge vardır. Bu aşamada bakteriler tipik olarak, klasik önleyici aşılarda latent olarak enfekte deney hayvanlarına verilmesi durumunda aktivite eksikliği aracılığıyla örneklendirildiği üzere TB alanında halihazırda gelişme halinde olan önleyici aşılarda çoğu tarafından hedeflenmez (Turner 2000).

Bazı durumlarda denge, patojen yararına eğilir ve enfeksiyon, bakterilerin hızlı bir şekilde çoğalmaya başladığı ve enfekte bireyde bakteri sayısının arttığı reaktivasyon

fazına geçer. Oldukça güçlü immün basınç altında latent olarak enfekte bireylerde çoğalan bakteriler, mevcut buluşta aşılama stratejisine yönelik hedeftir. Bu latent enfektif aşamada bakteriler tipik olarak, önleyici aşının latent olarak enfekte deney hayvanlarına verilmesi durumunda aktivite eksikliği aracılığıyla örneklendirildiği üzere

5 TB alanında halihazırda gelişme halinde olan önleyici aşının çoğu tarafından hedeflenmez (Turner et al 2000). Bu noktada, güçlü bir konakçı immün yanıtının başlıca önleyici aşı antijeni Ag85 ve PstS gibi birçok antijenin aşağı regülasyonu ile sonuçlandığının bilinmesi nedeniyle bu şaşırtıcı değildir (Rogerson, BJ et al 2006). Ag85B'ye yönelik olarak, enfeksiyon sonrasında Ag85B ifadesinde bir başlangıç geçici

10 artış olduğu ancak iki hafta enfeksiyon sonrasında bakteriyel Ag85B ifadesinin, pik süresi boyunca M.tb.'nin CFU'su başına 0.3 transkriptten CFU başına 0.02 transkripte düştüğü ve bu düşük seviyenin, enfeksiyon sonrası en az 100 güne kadar sürdürüldüğü gösterilmiştir. Dolayısıyla enfeksiyonun 2'nci haftası sonrasında herhangi bir zaman noktasında, bakterilerin %2'sinden azı aktif olarak Ag85B (ibid.) ifade eder. Düşük

15 Ag85B ifadesi, enfeksiyon sonrası 3'üncü hafta veya daha sonrasında akciğerdeki Ag85B'ye karşılık olarak IFN-g yapabilen T hücrelerinin sayısında hızlı bir düşüş ile desteklenir.

Aksine, bazı antijenler enfeksiyonun farklı aşamaları sırasında daha stabil şekilde

20 (temel olarak) ifade edilir ve bunun bir örneği, ESAT6'dır. Başlangıç enfeksiyon fazı sonrasında ESAT-6 ifadesi seviyesi, başına 0.8 transkriptte dengelenir. Bu, Ag85B'ye yönelik olandan daha yüksek bir transkripsiyon seviyesidir ve bu seviye, enfeksiyon sonrasında en az 100 güne kadar stabil şekilde sürdürülür (Rogerson, BJ et al 2006). Transkripsiyon verisi, enfeksiyon alanında (ibid.) enfeksiyonun sonraki aşamalarında

25 ESAT-6'nın güçlü T hücresi tanımasını gösteren immün veri ile desteklenir. Bu temel ifade paterni, bu moleküllerin patojene yönelik kritik önem taşıyan temel fonksiyonları, patojenin immün konakçıda sağ kalması için temel olarak ifade edilmesi gereken genlere dayalı fonksiyonları yeri getirdiğini açıklayan önemli bir özelliktir. Bu moleküller mevcut buluşa yönelik temeldir ve bakteri yaşam tarzının tüm aşamalarını

30 hedeflemeleri ve dolayısıyla aktiviteye yönelik en geniş olası temele sahip olmaları nedeniyle latent olarak enfekte bireylere uygulanan aşılarla yönelik özellikle önemli antijenlerdir. Bu, çoğalmayan persistans boyunca mikobakteriler aracılığıyla yukarı regüle edilen antijenlerin tanımlanmasına odaklanan mevcut düşünceden farklıdır (Andersen, P. 2007, WO02048391, WO04006952, Lin MY and Ottenhoff TH 2008;

35 Leyten EM. et al. 2006). Bu tür antijenlerin çoğalmayan persistans boyunca yukarı

regüle edilmesine rağmen, çoğalmayan bakterilerden temin edilebilen miktarların, saptamaya veya koruyucu immün efektör fonksiyonların tetiklenmesine yönelik uygun bir eşiğin altında olması nedeniyle bunlar her zaman immün tanımaya yönelik temin edilemeyebilir.

5

Aksine, ESX-1 salgılama sisteminden birkaç proteinin oldukça immünojenik olduğu ve yüksek seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir. ESX-1 birkaç patojenik mikobakteride muhafaza edilir ve tubercle bacilli'nin virülansına dahil edilir. ESAT-6, CFP10 ve EspA salgılanmasında bireysel ESX-1 proteinlerinin katkısı, iyi bir şekilde belgelenmiştir (Pym AS et al 2003; Guinn KI et al, 2004; Stanley, SA et al. 2003; Brodin, P. et al. 2006; MacGurn JA et al. 2005; Raghavan, S. et al. 2008) ve efektör moleküllerin fonksiyonu, membran lizisi olduğu, fagozom ve bakteriyel yayılmadan kaçtığı gösterilmiştir (Gao LY et al 2004; Smith J. et al. 2008).

10

15

Latent enfeksiyonu kontrol altına alan immün yanıtın tam yapısı ve reaktivasyona yol açan faktörler, büyük ölçüde bilinmez. Ancak, sorumlu olan baskın hücre türlerinde bir kaymaya yönelik bazı kanıtlar vardır. CD4 T hücreleri, akut faz sırasında enfeksiyonun kontrolüne yönelik gerekli ve yeterli olurken, çalışmalar CD8 T hücresi yanıtlarının latent fazda daha önemli olduğunu öne sürer (van Pinxteren LA et al. 2000).

20

Teknikte uzman bir kişinin kolay bir şekilde anlayacağı üzere, bir genin ifadesi bunu iyi bir aşı adayı yapmak için yeterli değildir. Bir proteinin, *M. Tuberculosis* ile bir latent enfeksiyon sırasında immün sistem aracılığıyla tanınıp tanınmadığını belirlemenin tek yolu, verilen proteini üretmek ve burada açıklandığı üzere uygun bir analizde bunu test etmektir. Bu bakımından, ESAT-6 (Erken Sekretuar Antijen Hedefi-6) gibi mikobakteriler aracılığıyla güçlü bir şekilde ifade edilen antijenlerin, enfeksiyonun tüm aşamalarında bireylerde ve aslında özellikle latent olarak enfekte bireylerde tanındığı gösterilmiştir (Boesen , Ravn, Doherty 2002). Ancak doğal enfeksiyon sırasında hazırlanan ESAT-6'ya spesifik T hücreleri, büyük miktarlarda mevcut olabilmelerine rağmen, neredeyse yalnızca bulaşıcı hastalıklara karşı koruyucu T hücreleri olarak oldukça sınırlı bir ömre sahip ve düşük aktiviteli olan, terminal olarak farklılaştırılmış T hücreleri olan söz konusu efektör fenotipten oluşur. Bu, TB'nin reaktivasyonuna karşı korumak sağlamak üzere mevcut çalışmada gösterilen aşı aracılığıyla artırılan yüksek kaliteli, söz konusu polifonksiyonel T hücrelerinden belirgin şekilde farklıdır.

25

30

Bu, çoğunun hipersensitivite reaksiyonlarına neden olacak ve böylece bunun karşılığında durumu kötüleştirecek olması nedeniyle, maruziyet sonrası aşılar olarak faydalı olan, yüksek şekilde ifade edilen ve immünojenik proteinlerin tamamından uzaktır. Bu açık bir şekilde, Kock'un orijinal tüberkülin aşısının klinik deneyinde 5 gösterilmiştir. Aşı, deri ve akciğer TB'si dahil farklı hastalık formlarından muzdarip olan hastalara bir maruziyet sonrası aşı olarak verilmiştir. Deney, tamamen başarısız olmuştur ve kayıt olan hastaların birkaçı şiddetli hipersensitivite reaksiyonları nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Guttstadt A. 1891). Birincil enfeksiyon sırasında ifade edildiği bilinen ve aşılar olarak test edilen birkaç yüz antijen arasından, bir yarım düzineden azı 10 kayda değer potansiyel göstermiştir. Bu zamana dek yalnızca bir antijenin, bir maruziyet sonrası aşı olarak herhangi bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Lowrie, 1999). Ancak bu aşı yalnızca bir DNA aşısı olarak verilmesi halinde işe yaramıştır, bu zamana dek insanlarda kullanıma yönelik deneysel bir teknik onaylanmamıştır. Ayrıca teknik, bu protokolü kullanan aşılamının spesifik olmayan 15 korumayı indüklediğini veya hastalığı kötüleştirdiğini öne süre diğer gruplar ile tartışmalı bulunmuştur (Turner, 2000).

WO 2004/006952 A2, düşük oksijen koşulları altında indüklenen bir polipeptid antijeni içeren, latent veya aktif tüberküloz enfeksiyonuna karşı bir terapötik aşığı açıklar.

20

Henao-Tamayo et al., Tuberculosis 89 (2009) 142-148, *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı kobaylarda bir maruziyet sonrası aşılama çalışmasını açıklar. Bu çalışma aşılamanın başlangıçta hastalık prosesini yavaşlatabildiği, ancak etkinin geçici olduğu sonucuna varılmıştır.

25

Dolayısıyla hastalığın reaktivasyonuna karşı enfekte bireyleri korumak üzere etkili bir maruziyet sonrası aşılama stratejisi, oldukça istenendir.

Buluşun kısa açıklaması

30

Buluş, ESAT6 ve CFP10 gibi temel olarak ifade edilen antijenlerin hedeflenmesi aracılığıyla, tüberküloz kompleksi mikroorganizmalarının (*Mycobacterium tuberculosis*., *M.bovis*, *M.africanum*) türlerinden kaynaklanan latent tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyonunu önlemek üzere latent olarak enfekte bireylere uygulanabilen bir aşı 35 aracılığıyla tüberküloz kompleksi (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*)

türlerinden kaynaklanan enfeksiyonların tedavi edilmesi ile ilgilidir. ESAT6 ve CFP10'un tamamı, salgılamaya yönelik bağımsız olarak gereklidir ve tamamı virülansa yönelik gerekli olduğu bilinen ESX-1 salgılama sistemine aittir. Bu salgılanan antijenler, bakteriyel yayılma ve selüler membranların lizisine yönelik kritiktir. ESAT6 ve CFP10 ayrıca farklı hastalık aşamalarında temel olarak ifade edilen antijenlerdir - böylece örneğin Ag85'in ifadesi, enfeksiyondan kısa süre sonra aşağı regüle edilir. Şaşırtıcı bir şekilde immünojenik temel olarak ifade edilen antijenler, bir maruziyet sonrası aşı olarak uygulanması durumunda latent tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyonunu önler, böylece enfeksiyonu latent halde tutar.

10

Buluşun detaylı açıklaması

Buluş, M.tuberculosis enfeksiyonu sırasında temel olarak ifade edilen bir antijen veya söz konusu antijeni kodlayan bir nükleik asit içeren, tüberkülozun reaktivasyonunu önleyen, latent olarak enfekte bireylere maruziyet sonrası uygulanan bir aşı veya immünojenik bileşimi açıklar.

Buluş özellikle, M.tuberculosis enfeksiyonu sırasında temel olarak ifade edilen bir antijen veya söz konusu antijeni kodlayan bir nükleik asit içeren, M.tuberculosis ile latent olarak enfekte bireylerde tüberkülozun reaktivasyonunun önlenmesinde kullanıma yönelik bir aşı ile ilgilidir, burada ESX-1 salgılama sistemine ait olan antijen, aşağıdaki unsurlardan oluşan gruptan seçilir

- i) ESAT6, CFP10, Rv3614c, Rv3615c, EspR, Rv3868, Rv3869, Rv3870, Rv3871, Rv3872, Rv3873, Rv3876, Rv3877, Rv3878, Rv3879c, Rv3880c, Rv3881c, Rv3882c, Rv3883c ve Rv3865,
- ii) (i)'deki dizilerin herhangi birine ait bir B-hücre veya T-hücreye yönelik bir epitop içeren bir immünojenik parça; ve
- iii) (i) veya (ii)'deki dizilerin herhangi birine en az %90'lık dizi özdeşliğine sahip olan ve aynı zamanda bir terapötik aşı olarak uygulanması durumunda latent tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyonunu önlemesi aracılığıyla immünojenik olan bir amino asit dizisi analogu.

Tercihen bileşim, ESX-1 salgılama sistemine ait olan temel olarak ifade edilen antijenler, ESAT6, CFP10, Rv3614c, Rv3615c, EspR, Rv3868, Rv3869, Rv3870,

Rv3871, Rv3872, Rv3873, Rv3876, Rv3877, Rv3878, Rv3879c, Rv3880c, Rv3881c, Rv3882c, Rv3883c, Rv3865c veya bir immünojenik parça, örneğin bu dizilerden herhangi birine ait bir T-hücresi epitopu veya dizilerin herhangi birine en az %90'lık dizi özdeşliğine sahip olan ve aynı zamanda immünojenik olan bir amino asit dizisi
5 analogunu içerir.

Ayrıca burada, tercihen SEQ ID NO. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ve 31'den oluşan gruptan seçilen immünojenik parçaların bir karışımını içeren bir bileşim açıklanır.

10

Buluşun diğer bir düzenlemesi, söz konusu polipeptidlerin mikobakteriler familyasının içinde mikobakteriler aracılığıyla ifade edilen bir antijene kaynaşık olduğu, tercihen füzyon partnerinin, temel olarak ifade edilen bir antijen olduğu bir bileşimdir. Tercih edilen bir füzyon proteini, CFP10'a kaynaştırılan ESAT6'yı içerir.

15

Buluşa göre bileşim tercihen mikobakteriyel genleri ifade eden bakteriler veya virüsler gibi geni değiştirilmiş organizmalar olan canlı rekombinant aşılı veya yukarıda açıklanan proteinlere yönelik genleri veya gen fragmanlarını ifade eden plazmidler olan DNA aşılı gibi immünojenik dağıtım sistemleri veya bir adjuvan gibi bir dağıtım sisteminde dağıtılan proteinlerin kendileri veya proteinlerin kendilerinden derive edilen sentetik peptidler olan protein aşılılarından seçilen ek bir dağıtım sistemi içerir. Adjuvan tercihen dimetildiokta-desilamonyum bromür (DDA), Quil A, poli I:C, alüminyum hidroksit, Freund'un tam olmayan adjuvanı, IFN- γ , IL-2, IL-12, monofosforil lipid A (MPL), Treholoz Dimikolat (TDM), Trehaloz Dibehepat ve muramil dipeptid (MDP) en çok tercih edildiği üzere DDA/TDB ve IC31 gibi bir polifonksiyonel T-hücresi
20 yanıtını artıran bir adjuvandan oluşan gruptan seçilir.

25

En çok tercih edilen adjuvan DDA/TDB ve/veya poli I:C içerir. Alternatif olarak amino asit dizisi, polipeptidin kendini destekleyici bir etkisine imkan sağlamak amacıyla lipidlenir.

30

Buluş ayrıca latent tüberkülozun tedavisinde ve enfeksiyonun reaktivasyonunu önlemede kullanıma yönelik yukarıda açıklanan antijenleri açıklar.

Hayvana, yukarıda açıklanan aşı veya immünojenik bileşimin uygulanmasını içeren virülen mikobakterilerden, örneğin *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium*
35

africanum veya *Mycobacterium bovis*'ten kaynaklanan tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyonuna karşı, bir insan dahil olmak üzere bir hayvanın tedavi edilmesine yönelik bir yöntem ayrıca açıklanır, burada söz konusu aşı veya immünojenik bileşim akut aşamalı enfeksiyon sırasında veya sonrasında ve/veya latent aşamalı enfeksiyon sırasında gibi enfeksiyon sonrasında uygulanır.

Yöntem örneğin Mantoux tüberkülin deri testi (TST), Quantiferon testi, HBHA'ya karşı yanıtların in vitro saptanması veya temel olarak ifade edilen bir antijen ile stimülasyon sonrasında IP10 saptanması gibi bir diyagnostik prosedür aracılığıyla bir virulan mikobakteri ile latent olarak enfekte bir öznenin tanımlanmasının bir adımını içerebilir.

Tüberküloz kompleksi türlerinden örneğin *Mycobacterium tuberculosis*, *M.bovis* and *M.africanum*'dan kaynaklanan latent enfeksiyonların reaktivasyonuna karşı bir maruziyet sonrası aşı veya immünojenik bileşimin üretimine yönelik yukarıda açıklanan bir antijenin kullanımı ayrıca açıklanır, burada söz konusu aşı veya immünojenik bileşim yukarıda açıklanan bir veya daha fazla immünojenik parçayı içeren, akut aşamalı enfeksiyon sırasında veya sonrasında ve/veya latent aşama sırasında gibi enfeksiyon sonrası uygulamaya yöneliktir.

Bir patojenin olarak mikobakterilerin başarısının nedeni, bunun konakçısı ile etkileşime girdiği kompleks yöntem - özelleştirilmiş ESX-1 bakteriyel protein salgılama sistemi aracılığıyla kısmen kontrol edilen bir prosestir. ESX-1 sistemi, bakteriyel proteinleri (örneğin ESAT-6, CFP10 ve EspA) konakçı hücrelere dağıtır ve virülansa yönelik kritiktir. Basilden salgılanması sonrasında ESAT-6 proteini, basilin bunların fagozomda bulundukları yerden sitozola sızmasına imkan sağlayarak fagozomal membranda gözenekler oluşturur ve böylece hücreden hücreye yayılmayı kolaylaştırır.

Temel ifade paterni, bu moleküllerin patojene yönelik kritik önem taşıyan temel fonksiyonları, patojenin immün konakçıda sağ kalması için temel olarak ifade edilmesi gereken genlere dayalı fonksiyonları yeri getirdiğini açıklayan önemli bir özelliktir. Bu moleküller mevcut buluşa yönelik temeldir ve bakteri yaşam tarzının tüm aşamalarını hedeflemeleri ve dolayısıyla aktiviteye yönelik en geniş olası temele sahip olmaları nedeniyle latent olarak enfekte bireylere uygulanan aşılarla yönelik özellikle önemli antijenlerdir.

ESAT6, CFP10 ve EspA'nın tamamı, salgılamaya yönelik bağımsız olarak gereklidir ve tamamı virülansa yönelik gerekli olduğu bilinen ESX-1 salgılama sistemine aittir. Bu salgılanan antijenler, bakteriyel yayılma ve selüler membranların lizisine yönelik kritiktir. ESAT6, CFP10 ve EspA ayrıca farklı hastalık aşamalarında temel olarak ifade edilen antijenlerdir - böylece örneğin Ag85'in ifadesi, enfeksiyondan kısa süre sonra aşağı regüle edilir. İmmünojenik temel olarak ifade edilen antijenler, bir terapötik aşı olarak uygulanması durumunda latent tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyonunu önler, böylece enfeksiyonu latent halde tutar.

10 Tanımlar

Polifonksiyonel T hücreleri

Polifonksiyonel T hücreleri ifadesi ile eşzamanlı olarak sitokinler IFN- γ , IL-2 ve TNF- α 'nın tümü veya IL-2 ayrıca diğer iki sitokin IFN- γ ve TNF- α 'dan en az birini ifade eden T hücreleri olarak anlaşılr.

Polipeptider

Mevcut buluşta "polipeptid" kelimesi, olağan anlamına sahip olacaktır. Diğer bir deyişle tam uzunluklu bir protein, oligopeptidler, kısa peptidler ve bunun fragmanları dahil olmak üzere herhangi bir uzunluktaki bir amino asit zinciridir, burada amino asit kalıntıları kovalent peptid bağları aracılığıyla bağlanır.

Polipeptid, glikozillenmesi, lipidlenmesi (örneğin Mowat et al. 1991 tarafından açıklandığı üzere palmitoiloksi süksinimid ile veya Lustig et al. 1976 tarafından açıklandığı üzere dodekanoil klorür ile kimyasal lipidasyon aracılığıyla), protestetik gruplar içermesi veya örneğin bir his-etiketi veya bir sinyal peptidi gibi ek amino asitler içermesi aracılığıyla kimyasal olarak modifiye edilebilir.

30

Her bir polipeptid böylece spesifik amino asitler ile karakterize edilebilir ve spesifik nükleik asit dizileri ile kodlanabilir. Bu tür dizilerin, bu tür polipeptid dizilerinin, rekombinant polipeptiddeki bir veya daha fazla amino asit kalıntısının süstitüsüonu, araya katılması, eklenmesi veya delesyonu aracılığıyla modifiye edildiği rekombinant veya sentetik yöntemler aracılığıyla üretilen analoglar ve varyantlar içerdiği ve burada

35

açıklanan herhangi bir biyolojik analizde immünojenik olmayan devam edeceği anlaşılabacaktır. Sübstitüsyonlar tercihen “konservatiftir”. Bunlar aşağıdaki tabloya göre tanımlanır. İkinci sütundaki aynı blokta ve tercihen üçüncü sütundaki aynı satırda olan amino asitler, birbirine yönelik olarak sübstitüe edilebilir. Üçüncü sütundaki amino asitler, tek harfli kod halinde gösterilir.

ALİFATİK	Polar olmayan	GAP
		ILV
	Polar-yüksüz	CSTM
		NQ
	Polar-yüklü	DE
		KR
AROMATİK		HFYW

Mevcut buluş içinde tercih edilen bir polipeptid, organizmanın latent enfeksiyon ile ilişkili streslere maruz bırakılması durumunda üretilen *M. tuberculosis*'ten bir immünojenik antijendir. Bu tür antijen ayrıca örneğin *M. tuberculosis* hücresi ve/veya *M. tuberculosis* kültürlü filtrattan derive edilebilir. Dolayısıyla yukarıdaki antijenlerden birinin bir immünojenik parçasını içeren bir polipeptid, tamamen immünojenik parçadan oluşabilir veya ek diziler içerebilir. Ek diziler, natif *M. tuberculosis* antijeninden derive edilebilir veya heterolog olabilir ve bu tür diziler, gerekli olmamasına karşın, immünojenik olabilir.

Her bir polipeptid bir spesifik nükleik asit dizisi ile kodlanır. Bu tür dizilerin, bu tür nükleik asit dizilerinin bir veya daha fazla nükleik asidin sübstitüsyon, araya katılması, eklenmesi veya delesyonu aracılığıyla modifiye edildiği analogları ve varyantları içerdiği anlaşılabacaktır. Sübstitüsyonlar tercihen amino asit dizisinde herhangi bir değişikliğe yol açmayacak olan, ancak proteinin ifadesini geliştirmek üzere eklenebilen kodon kullanımdaki sessiz sübstitüsyonlardır.

Mevcut bağlamda “büyük oranda saf polipeptid fragmanı” ifadesi, natif olarak ilişkili olduğu diğer polipeptid materyalin ağırlıkça en fazla %5'ini içeren bir polipeptid hazırlanışı anlamına gelir (diğer polipeptid materyalin düşük yüzdeleri tercih edilir,

örneğin en fazla %4, en fazla %3, en fazla %2, en fazla %1 ve en fazla %½). Büyük oranda saf polipeptidin en az %96 saf olması, *diğer bir deyişle* polipeptidin hazırlanışta mevcut olan toplam polipeptid materyalin ağırlıkça en az %96'sını oluşturması tercih edilir ve en az %97, en az %98, en az %99, en az %99,25, en az %99,5 ve en az %99,75 gibi daha yüksek yüzdeler tercih edilir. Polipeptid fragmanının “temel olarak saf formda” olması, *diğer bir deyişle* polipeptid fragmanının, natif olarak ilişkili olduğu herhangi bir diğer antijeni, *diğer bir deyişle* tüberküloz kompleksi veya bir virülan mikobakteriye ait bakteriden gelen herhangi bir diğer antijeni temel olarak içermemesi tercih edilir. Bu, aşağıda detaylı olarak açıklanacağı üzere mikobakteriyel olmayan bir konakçı hücrede rekombinant yöntemler ile polipeptid fragmanının hazırlanması aracılığıyla veya katı veya sıvı faz peptid sentezinin iyi bilinen yöntemleri, örneğin Merrifield tarafından açıklanan yöntem veya bunun varyasyonları ile polipeptid fragmanının sentezlenmesi aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Mevcut buluşun amacına yönelik olarak yukarıdaki “büyük oranda saf polipeptid veya polipeptid fragmanı” tanımının, mikobakteriyel veya mikobakteriyel olmayan kökenli saflaştırılmış veya sentetik diğer antijenler ile kombinasyon halinde mevcut olması durumunda bu tür polipeptidler veya polipeptid fragmanlarını hariç tutmadığı anlaşılabacaktır.

“Virülan mikobakteri” ifadesi ile bir hayvanda veya bir insanda tüberküloz hastalığına neden olabilen bir bakteri anlaşılır. Virülan mikobakteri örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, *M. tuberculosis*, *M. africanum* ve *M. bovis'i* içerir. İlgili hayvanların örnekleri sığır, keseli sıçangiller, porsuklar ve kanguruları içerir.

“Bir enfekte birey” ile virülan mikobakteri ile kültür veya mikroskopik olarak kanıtlanan enfeksiyona sahip bir birey ve/veya klinik olarak TB teşhisi koyulan ve anti-TB kemoterapisine yanıt veren bir birey anlaşılır. TB kültürü, mikroskopisi ve klinik teşhisi, teknikte uzman herhangi bir kişi tarafından iyi bilinir.

“PPD-pozitif birey” ifadesi ile pozitif bir Mantoux testine sahip bir birey veya PPD'nin (saflaştırılmış protein derivativesi) IFN- γ salınımı aracılığıyla belirlenen pozitif bir *in vitro* hatırlama yanıtı indüklediği bir birey anlaşılır.

“Latent olarak enfekte bir birey” ile bir virülan mikobakteri, örneğin *M. Tuberculosis* ile enfekte olan, ancak herhangi bir aktif tüberküloz belirtisi göstermeyen bir birey anlaşılır. TB'ye yönelik örneğin BCG ile aşılanmış veya tedavi edilmiş bireylerin, bu tür bireylerin

PPD aktivitesine yönelik test edilmesi halinde pozitif olmasının beklenmesi nedeniyle bunu kanıtlamanın halihazırda imkansız olmasına rağmen vücutlarında mikobakteriyi tutabilmesi olasıdır. Bununla beraber, en doğru anlamda “latent olarak enfekte”, dokularında bulunan *M. tuberculosis*’e sahip olan ancak klinik olarak hasta olmayan bir bireyi tanımlamak üzere kullanılabilir. Latent olarak enfekte bir birey, Mantoux tüberkülin deri testi (TST), Quantiferon testi gibi günümüzde klinik kullanımda olan birçok yöntem aracılığıyla tanımlanabilir ve gelecekte, yakın zamanda öne sürülen HBHA’ya karşı yanıtların in vitro saptanması (Hougardy 2007) veya ESAT6 ile in vitro stimülasyon sonrasında IP10’un saptanması (Ruhwald 2008) gibi enfeksiyonun bu belirli aşamasının teşhis edilmesine dair daha hassas araçlar olabilir.

“Reaktivasyon” ifadesi ile çoğalmayan bakteriler (bunların intraselüler olarak bulunması nedeniyle, immün sistemin saptaması oldukça zor olabilir) ile immün konakçıda karşılaşılan düşman ortama uyum sağlamak amacıyla aktif ancak değişmiş bir ifade profiline sahip olan, yavaş çoğalan bakteriler arasındaki dengenin patojen yararına eğildiği ve enfeksiyonun, bakterilerin tekrar hızlı bir şekilde çoğalmaya başladığı ve enfekte bireyde bakteri sayısının arttığı faza geçtiği durum anlaşılır. Oldukça güçlü immün basınç altında latent olarak enfekte bireylerde çoğalan bu bakteriler, mevcut buluşta aşılama stratejisine yönelik hedeftir.

20

“IFN- γ ” ifadesi ile interferon-gama anlaşılır. IFN- γ ’nin ölçümü bir immünolojik yanıtın bir göstergesi olarak kullanılır.

“Nükleik asit fragmanı” ve “nükleik asit dizisi” ifadeleri ile DNA, RNA, LNA (kilitli nükleik asitler), PNA, RNA, dsRNA ve RNA-DNA-melezleri dahil olmak üzere herhangi bir nükleik asit molekülü anlaşılır. Ayrıca doğal yolla meydana gelmeyen nükleozidler içeren nükleik asit molekülleri dahildir. İfade, kullanıma bağlı olarak örneğin 10 ila 10000 nükleotid arasında herhangi bir uzunluktaki nükleik asit moleküllerini kapsar. Nükleik asit molekülünün örneğin DNA terapisinde bir farmasötik olarak kullanıma yönelik veya buluşa göre bir polipeptid üretilmesine yönelik bir yöntemde kullanıma yönelik olması durumunda, en az bir epitopu kodlayan, yaklaşık 18 ila yaklaşık 1000 nükleotidlik bir uzunluğa sahip olan bir molekül tercihen kullanılır, molekül isteğe bağlı olarak bir vektöre yerleştirilir.

35 Bu spesifikasyon boyunca, bağlam aksini gerektirmedikçe, “içermek” kelimesi veya

“içerir” veya “içeren” gibi varyasyonlarının, herhangi bir diğer eleman veya tam sayı veya eleman veya tam sayı grubu hariç tutulmadan, belirtilen bir elemanın veya tam sayının veya eleman veya tam sayı grubunun dahil edilmesini belirttiği anlaşılabacaktır.

- 5 Temel olarak ifade edilen genler, bir popülasyon seviyesinde detaylı bir mRNA analizi sonrasında, akciğerde *M. tb* CFU sayılarına yönelik ilişkilendirilmesi akabinde, enfeksiyon sonrası üçüncü haftadan sonraki zaman noktalarında akciğerde eşit ölçüde iyi şekilde in vivo ifade edilen genler olarak tanımlanır. Bu tanımdan, bir temel genin tek bir bakteri seviyesinde farklı olarak ifade edilebileceği sonucu çıkarılır. Gen ifadesinin
- 10 miktarını ölçme yöntemi, nicel PCR'dir. “Eşit ölçüde iyi” ifadesi önceki ölçümden elde edilen seviyenin +/- 5 katı aralığında olması olarak tanımlanır Karşılaştırma her zaman, mevcut andan hemen önce gelen zaman noktasına yöneliktir. Ölçümler arasındaki süre, enfeksiyon ile önceki ölçüm arasındaki süreden daha uzun olamaz. Örneğin bir gen ifadesinin ilk olarak enfeksiyon sonrası 3'üncü haftada ölçülmesi halinde, ikinci
- 15 ölçüm enfeksiyon sonrası 6'ncı haftadan ve üçüncüsü enfeksiyon sonrası 12'nci haftadan daha sonra yapılamaz.

Temel olarak ifade edilen antijenler, temel olarak ifade edilen genlerin ürünleri olan polipeptidler veya bu polipeptidlerin kısmıdır.

20

Dizi özdeşliği

- “Dizi özdeşliği” ifadesi eşit uzunluklu iki amino asit dizisi arasında veya eşit uzunluklu iki nükleotid dizisi arasındaki homoloji derecesinin nicel bir ölçümünü belirtir.
- 25 Karşılaştırılacak iki dizinin, boşlukların yerleştirilmesine veya alternatif olarak protein dizilerinin uçlarında kesmeye imkan sağlayarak en iyi olası uydurmaya hizalanması gerekir. Dizi özdeşliği aşağıdaki gibi hesaplanabilir

$$\frac{(N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}}) \cdot 100}{N_{\text{ref}}},$$

30

burada N_{dif} hizalanması durumunda iki dizideki özdeş olmayan kalıntıların toplam sayısıdır ve burada N_{ref} dizilerin birindeki kalıntıların sayısıdır. Dolayısıyla DNA dizisi AGTCAGTC, dizi AATCAATC ile %75'lik bir dizi özdeşliğine sahip olacaktır ($N_{\text{dif}}=2$ ve $N_{\text{ref}}=8$). Bir boşluk spesifik kalıntı(ların) özdeş olmaması olarak sayılır, diğer bir deyişle

35 DNA dizisi AGTGTC, DNA dizisi AGTCAGTC ile %75'lik bir dizi özdeşliğine sahip

olacaktır ($N_{dir}=2$ ve $N_{ref}=8$). Dizi özdeşliği alternatif olarak BLAST programı, örneğin BLASTP programı (Pearson, 1988 veya www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST) aracılığıyla hesaplanabilir. Buluşun bir açısında hizalama, <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/> adresinde mevcut olan, Thompson J., *et al* 1994 tarafından açıklandığı üzere saptanmış parametreler ile dizi hizalama yöntemi ClustalW ile gerçekleştirilir.

Dizi özdeşliğinin tercih edilen bir minimum yüzdesi en az %80, örneğin en az %85, en az %90, en az %91, en az %92, en az %93, en az %94, en az %95, en az %96, en az %97, en az %98, en az %99 ve en az %99.5'tir.

İmmünojenik parça

Buluşun tercih edilen bir düzenlemesinde polipeptid, bir B-hücre veya T-hücreye yönelik bir epitop gibi polipeptidin bir immünojenik bölümünü içerir. Bir polipeptidin immünojenik parçası, bir hayvanda veya bir insanda ve/veya burada açıklanan biyolojik analizlerin herhangi biri aracılığıyla belirlenen bir biyolojik numunede bir immün yanıt sağlayan bir polipeptid kısmıdır. Bir polipeptidin immünojenik parçası bir T-hücre epitopu veya bir B-hücre epitopu olabilir. İmmünojenik parçalar, polipeptidin nispeten küçük olan bir veya birkaç kısmı ile ilişkili olabilir, bunlar polipeptid dizisi boyunca saçılabilir veya polipeptidin spesifik kısımlarında bulunabilir. Birkaç polipeptide yönelik olarak epitopların, tüm diziyi kaplayarak polipeptid boyunca saçılmış olduğu gösterilmiştir (Ravn *et al* 1999). Bir immün yanıt sırasında tanınan ilgili T-hücre epitoplarını tanımlamak amacıyla, polipeptidden derive örneğin 20 amino asit kalıntısı olan bir uzunluğa sahip olan, tercihen sentetik, MHC sınıf II epitoplarının saptanmasına yönelik örtüşen oligopeptidleri kullanmak mümkündür. Bu peptidler biyolojik analizlerde (örneğin burada açıklandığı üzere IFN- γ analizi) test edilebilir ve bunların bir kısmı, peptidde bir T hücre epitopunun varlığına yönelik kanıt olarak bir pozitif yanıt verecektir (ve böylece immünojenik olacaktır). ESAT-6 ve CFP10'a yönelik bu tür çalışmalar, antijenin her kısmının T-hücre epitopları içerdiğini göstermiştir (Mustafa *et al.* 2000, Arend SM *et al.* 2000). MHC sınıf I epitoplarının saptanmasına yönelik, bağlanacak olan peptidleri öngörmek (Stryhn *et al.* 1996) ve bundan sonra bu peptidleri sentetik olarak üretmek ve bunları ilgili biyolojik analizlerde örneğin burada açıklandığı üzere IFN- γ analizinde test etmek mümkündür. Tercihen örneğin 8 ila 11 amino asit kalıntısı arasında bir uzunluğa sahip peptidler, polipeptidden derive edilir. B-

hücresi epitopları, örneğin Harboe et al 1998 içinde açıklandığı üzere söz konusu polipeptidi kaplayan örtüşen peptidlere yönelik B hücresi tanınmasının analiz edilmesi aracılığıyla belirlenebilir. Bu tanımla tutarlı olarak burada açıklandığı üzere bir polipeptidin bir immünojenik parçası, bir immün yanıt sağlayan bir parça olarak tanımlanabilir, karşılaştırınız aşağıdaki “immün yanıt” tanımı.

Bir T-hücresi epitopunun minimum uzunluğunun en az 6 amino asit olduğunun gösterilmesine rağmen, bu tür epitopların daha uzun amino asit bölümlerinden oluşturulması normaldir. Dolayısıyla, buluşun polipeptid fragmanının en az 7 amino asit kalıntısı, örneğin en az 8, en az 9, en az 10, en az 12, en az 14, en az 16, en az 18, en az 20, en az 22, en az 24, and en az 30 amino asit kalıntısı olan bir uzunluğa sahip olması tercih edilir. Dolayısıyla buluş niteliğindeki yöntemin önemli düzenlemelerinde, polipeptid fragmanının en fazla 50 amino asit kalıntısı örneğin en fazla 40, 35, 30, 25 ve 20 amino asit kalıntısı olan bir uzunluğa sahip olması tercih edilir. 10 ile 20 amino asit kalıntısı arasında bir uzunluğa sahip olan peptidlerin, MHC sınıf II epitopları olarak en etkililer olmaları beklenir ve dolayısıyla buluş niteliğindeki yöntemde kullanılan polipeptid fragmanlarının özellikle tercih edilen uzunlukları, 18, örneğin 15, 14, 13, 12 ve 11 amino asit kalıntısıdır. 7 ile 12 amino asit kalıntısı arasında bir uzunluğa sahip olan peptidlerin, MHC sınıf I epitopları olarak en etkililer olmaları beklenir ve dolayısıyla buluş niteliğindeki yöntemde kullanılan polipeptid fragmanlarının özellikle tercih edilen uzunlukları, 11, örneğin 10, 9, 8 ve 7 amino asit kalıntısıdır.

Polipeptidlerin immünojenik parçaları, genetik olarak heterojen insan popülasyonunun geniş bir kısmı (yüksek frekans) veya küçük bir kısmı tarafından tanınabilir. Ek olarak bazı immünojenik parçalar yüksek immünolojik yanıtlar (dominant) indüklerken, diğerleri daha düşük, ancak kayda değer, yanıtlar subdominant) indükler. Yüksek frekans>düşük frekans, geniş ölçüde dağıtılan MHC moleküllerine (HLA tipi) veya birçok MHC molekülüne (Sinigaglia, 1988, Kilgus, 1991) bağlanan immünojenik parça ile ilişkili olabilir.

30

Tüberküloza karşı yeni bir aşıya yönelik aday moleküllerin sağlanması bağlamında, bu kadar kuvvetli veya geniş şekilde tanınmamasına bakılmaksızın bu tür epitopların koruma indükleyebilmesinin gösterilmesi (Olsen, 2000) nedeniyle, subdominant epitoplar, buna rağmen dominant epitoplar kadar ilişkilidir.

35

Varyantlar

Buluşun polipeptidlerinin ortak bir özelliği, örneklerde açıklandığı üzere bunların bir immünolojik yanıt indükleme kapasitesidir. Süstitüsyon, araya katma, ekleme veya
5 delesyon aracılığıyla üretilen bir buluş polipeptidinin bir varyantının, burada açıklanan analizlerden herhangi biri aracılığıyla belirlendiği üzere ayrıca immünojenik olabileceği anlaşılır.

İmmün birey

10

Bir immün birey, virülan mikobakterili bir enfeksiyonu geçirmiş veya kontrol altına almış veya *M.bovis*BCG ile aşılama gibi bir profilaktik aşılama almış bir kişi veya bir hayvan olarak tanımlanır.

İmmün yanıt

İmmün yanıt aşağıdaki yöntemlerden biri aracılığıyla gözlemlenebilir:

- Bir in vitro selüler yanıt, halihazırda veya önceden virülant mikrobakteri ile
20 enfekte olmuş veya ilgili polipeptid bağışıklığı kazanmış bir hayvan veya insandan alınan, IFN- γ gibi ilgili bir sitokin salımının indüksiyonu veya alınan lenfositlerde proliferasyon indüksiyonu aracılığıyla belirlenir. İndüksiyon, polipeptid veya polipeptidin immünojenik parçasının göz başına 2×10^5 hücre ile 4×10^5 hücre içeren bir süspansiyona eklenmesi aracılığıyla gerçekleştirilir.
25 Hücreler, kan, dalak, karaciğer veya akciğerden izole edilir ve polipeptid veya immünojenik parçanın eklenmesi, ml başına 20 μg 'den fazla olmayan bir süspansiyon konsantrasyonu ile sonuçlanır ve stimülasyon iki ila beş gün arasında gerçekleştirilir. Hücre proliferasyonunun gözlemlenmesine yönelik olarak hücreler, radyoaktif etiketli Timidin ile doldurulur ve inkübasyonun 16-22
30 saat sonrasında sıvı sintilasyon sayımı aracılığıyla profilerasyon saptanır. Bir pozitif yanıt, zemin değer ve iki standart sapmadan daha fazla bir yanıt olarak tanımlanır. IFN- γ salımı, teknikte uzman bir kişi tarafından iyi bilinen ELISA yöntemi aracılığıyla belirlenebilir. Bir pozitif yanıt, zemin değer ve iki standart sapmadan daha fazla bir yanıttır. IL-12, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF- β
35 gibi IFN- γ dışındaki diğer sitokinler, polipeptide karşı immünolojik yanıtın

- gözlemlenmesi durumunda ilgili olabilir. İmmün yanıtın saptanmasına yönelik diğer ve daha hassas bir yöntem, IFN- γ üreten hücrelerin frekansının belirlendiği ELISpot yöntemidir. Anti-murin IFN- γ antikorları (PharMingen) ile önceden kaplanmış bir ELISpot plakasında (MAHA, Millipore), kan, dalak veya akciğerden (tipik olarak 1 ila 4 x 10⁵ hücre/göz) izole edilen hücrelerin kademeli sayıları, ml başına 20 μ g'den fazla olmayan bir konsantrasyon ile sonuçlanarak polipeptid veya immünojenik parça varlığında 24-32 saat boyunca inkübe edilir. Plakalar akabinde biyotinlenmiş anti-IFN- γ antikorları ile inkübe edilir, bunu bir streptavidin-alkalin fosfataz inkübasyonu izlemiştir. IFN- γ üreten hücreler BCIP/NBT (Sigma) eklenmesi aracılığıyla tanımlanır, ilgili substrat lekelerine neden olur. Bu lekeler bir kesme mikroskobu kullanılarak numaralandırılabilir. PCR tekniğinin kullanımı ile ilgili sitokine yönelik kodlama yapan mRNA varlığını belirlemek ayrıca bir olasılıktır. Genellikle, örneğin PCR, ELISPOT veya ELISA kullanılarak bir veya daha fazla sitokin ölçülecektir. Spesifik bir polipeptid aracılığıyla indüklenen bu sitokinlerin herhangi birinin miktarındaki kayda değer bir artış veya azalışın, polipeptidin immünolojik aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılabileceği teknikte uzman bir kişi tarafından anlaşılabacaktır.
- Bir *in vitro* selüler yanıt ayrıca bir immün birey veya bir *M. tuberculosis*-enfekte kişiden derive edilen T hücresi hatlarının kullanımı aracılığıyla belirlenebilir, burada T hücresi hatları, IL-2 eklenmesi ile 10 ila 20 gün boyunca bakteri hücrelerinden canlı mikobakteri ekstraktları veya kültür filtratı ile tahrik edilmiştir. İndüksiyon göz başına 1x10⁵ hücre ila 3x10⁵ hücre içeren T hücresi hatlarına ml başına 20 μ g'den fazla olmayan polipeptid süspansiyonunun eklenmesi aracılığıyla gerçekleştirilir ve inkübasyon, iki ila altı gün gerçekleştirilir. IFN- γ indüksiyonu veya diğer bir ilgili sitokin salımı, ELISA ile saptanır. T hücrelerinin stimülasyonu ayrıca yukarıda açıklandığı üzere radyoaktif olarak etiketlenen Timidin kullanılarak hücre proliferasyonunun saptanması aracılığıyla gözlemlenebilir. Her iki analize yönelik olarak bir pozitif yanıt, zemin değer ve iki standart sapmadan daha fazla olan bir yanıttır.
 - Bir *in vivo* selüler yanıt, klinik veya subklinik olarak bir virülan mikobakteri ile enfekte olan bir bireye en fazla 100 μ g polipeptid veya immünojenik parçanın intradermal enjeksiyonu veya lokal uygulama yaması sonrasında bir pozitif DTH yanıtı olarak belirlenebilir, bir pozitif yanıt enjeksiyon veya uygulamadan 72-96 saat sonra en az 5 mm'lik bir çapa sahiptir.

- Bir *in vitro* humoral yanıt, bir immün veya enfekte bireyde spesifik bir antikor yanıtı aracılığıyla belirlenir. Antikorların varlığı bir ELISA tekniği veya bir Western blot aracılığıyla belirlenebilir, burada polipeptid veya immünojenik parça bir nitroselüloz membran veya bir polistiren yüzeye absorbe edilir. Serum tercihen 1:10 ila 1:100 olarak PBS'de seyreltilir ve absorbe edilen polipeptide eklenir ve inkübasyon 1 ila 12 saat arasında gerçekleştirilir. Etiketlenmiş ikincil antikorların kullanımı aracılığıyla spesifik antikorların varlığı, OD'nin ölçülmesi aracılığıyla örneğin ELISA aracılığıyla belirlenebilir, burada bir pozitif yanıt zemin değer ve iki standart sapmadan fazla olan bir yanıt veya alternatif olarak bir Western blot'ta bir görsel yanıttır.
- Diğer bir ilgili parametre, bir adjuvan içinde polipeptid ile aşılama sonrası veya DNA aşılması sonrası indüklenen, hayvan modellerinde korumanın ölçümüdür. Uygun hayvan modelleri, bir virülen *Mycobacterium*'un bir enfeksiyonu verilen primatlar, kobaylar veya fareleri içerir. İndüklü proteine yönelik okuma, aşılammamış hayvanlar ile karşılaştırıldığında hedef organlardaki bakteri yükünde azalma, aşılammamış hayvanlar ile karşılaştırıldığında uzatılmış sağkalım süreleri ve aşılammamış hayvanlar ile karşılaştırıldığında azalan kilo kaybı olabilir.

20 **Hazırlanış yöntemleri**

Genelde *M. tuberculosis* antijenleri ve bu tür antijenleri kodlayan DNA dizileri, birçok prosedürden herhangi biri kullanılarak hazırlanabilir. Bunlar, yukarıda açıklananlar gibi prosedürler aracılığıyla *M. tuberculosis* hücreleri veya kültür filtratından natif proteinler olarak saflaştırılabilir. İmmünojenik antijenler ayrıca bir ifade vektörüne yerleştirilmiş ve uygun bir konakçıda ifade edilmiş, antijen kodlayan bir DNA dizisinin rekombinant olarak kullanılması ile üretilir. Konakçı hücrelerin örnekleri *E. coli*'dir. Polipeptidler veya bunun immünojenik parçası ayrıca yaklaşık 100'den az amino asit ve genellikle 50'den az amino aside sahip olarak sentetik olarak üretilir ve amino asitlerin ardışık olarak büyüyen bir amino asit zincirine eklendiği, ticari olarak temin edilebilen katı-faz teknikleri gibi teknikte uzman kişilerce iyi bilinen teknikler kullanılarak oluşturulabilir.

DNA aşılmasına yönelik tanımlandığı üzere polipeptidi kodlayan plazmid DNA'nın yapımı ve hazırlanışında *E. coli* gibi bir konakçı suş kullanılabilir. Plazmid DNA akabinde söz konusu plazmidi taşıyan konakçı suş kültürlerinden hazırlanabilir ve bir

endotoksin uzaklaştırma adımı dahil olarak örneğin Qiagen Giga -Plasmid kolon kiti (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) kullanılarak saflaştırılabilir. DNA aşılmasına yönelik kullanılan plazmid DNA'nın endotoksin içermemesi tercih edilir.

5 **Füzyon proteinleri**

İmmünojenik polipeptidler ayrıca, buluşun polipeptidinin üstün karakteristiklerinin elde edilebileceği yöntemler aracılığıyla füzyon proteinleri olarak üretilir. Örneğin, rekombinant olarak üretilmesi durumunda polipeptidin dışa aktarımını kolaylaştıran füzyon partnerleri, polipeptidin saflaştırılmasını kolaylaştıran füzyon partnerleri ve buluşun polipeptid fragmanının immünojenisitesini artıran füzyon partnerlerinin tümü ilgi çekici olasılıklardır. Dolayısıyla buluş ayrıca, yukarıda tanımlanan en az bir polipeptid veya immünojenik parça ve en az bir füzyon partneri içeren bir füzyon polipeptidi ile ilgilidir. İmmünojenisiteyi artırmak amacıyla füzyon partneri, örneğin ESAT-6, CFP10, TB10.4, RD1-ORF5, RD1-ORF2, Rv1036, MPB64, MPT64, Ag85A, Ag85B (MPT59), MPB59, Ag85C, 19kDa lipoprotein, MPT32 ve alfa-kristalin gibi tüberküloz kompleksine ait olan bir bakteriden derive edilen bir polipeptid fragmanına ait *M. tuberculosis*'ten derive edilen diğer bir polipeptid veya yukarıda bahsedilen antijenlerden herhangi birinin en az bir T-hücresi epitopu olabilir (Skjöt et al 2000; WO0179274; WO01 04151; US patent başvurusu 09/0505,739; Rosenkrands et al 1998; Nagai et al 1991). Buluş ayrıca, buluşun iki veya daha fazla polipeptidinin (veya bunun immünojenik parçalarının) karşılıklı füzyonlarını içeren bir füzyon polipeptidi ile ilgilidir.

Ürünün immünojenisitesini artırabilen diğer füzyon partnerleri, IFN- γ , IL-2 ve IL-12 gibi lenfokinlerdir. İfade ve/veya saflaştırmayı kolaylaştırmak amacıyla füzyon partneri örneğin, bir bakteriyel fimbrial protein, örneğin pilus bileşenleri pilin ve papA; protein A; ZZ-peptidi (ZZ-füzyonlar İsveç'te Pharmacia tarafından pazarlanır); maltoz bağlama proteini; glutatyon S-transferaz; β -galaktosidaz; veya poli-histidin olabilir. Füzyon proteinleri, *E. coli* olabilen bir konakçı hücrede rekombinant olarak üretilir ve farklı füzyon partnerleri arasında bir bağlayıcı bölgeyi indüklemek için bir olasılıktır.

Diğer ilgi çekici füzyon partnerleri, immünojenik polipeptidin immün sisteme uygun bir şekilde sunulacağı şekilde lipidlenen polipeptidlerdir. Bu etki örneğin WO 96/40718 A içinde açıklandığı üzere örneğin *Borrelia burgdorferi* OspA polipeptidine bağlı aşılardan veya *Pseudomonas aeruginosa* Oprl lipoproteinine (Cote-Sierra J 1998) bağlı aşılardan bilinir. Diğer bir olasılık, bilinen bir sinyal dizisi ve bir N-terminal sisteininin

immünojenik polipeptide N-terminal füzyonudur. Bu tür bir füzyon, uygun bir üretim konakçısında üretilmesi durumunda N-terminal sisteininde immünojenik polipeptidin lipidasyonu ile sonuçlanır.

5 **Kullanımlar**

Aşı

Bir aşı, belirli bir hastalığa karşı bağışıklık oluşturan veya geliştiren biyolojik bir
10 hazırlanıştır. Aşılar profilaktik (örneğin herhangi bir doğal veya “yabani” patojen ile
gelecekteki bir enfeksiyonun etkilerini önlemek veya hafifletmek üzere), maruziyet
sonrası (örneğin klinik semptomlar olmadan latent olarak enfekte bireylerde
reaktivasyonu önlemek üzere) veya terapötik (örneğin tedaviyi kısaltmak üzere tek
başına veya antibiyotik tedavisi ile kombine olarak aktif hastalığını tedavi etmek üzere
15 kullanılan aşılar) olabilir

Latent TB’ye yönelik bir hayvan modeli

Düşük dereceli bir latent M.tb enfeksiyonunu indüklemek üzere hayvanlara, *M.tb’nin*
20 normal bir dozu kullanılarak ilk olarak bir aerosol enfeksiyon verilir (akciğerlerde
yaklaşık olarak 150 bakteri). Enfeksiyonun 6 haftası sonrasında hayvanlara,
bakterilerinin tamamı olmamak üzere çoğunun yok edildiği, 6 haftalık yetersiz bir
kemoterapi tedavisi verilir. Geri kalan bakteriler bir latent enfeksiyon oluşturacaktır.
Kemoterapi tedavisi akabinde bazı hayvanlar, aşının, kemoterapi tedavisinden 5-15
25 hafta sonra kendiliğinden meydana gelecek olan latent enfeksiyonun reaktivasyonunu
önleme yeteneğini değerlendirmek üzere aşılanacaktır. Bakınız şekil 2.

Protein Aşısı

Buluşun diğer bir kısmı, buluşa göre bir polipeptid (veya bunun en az bir immünojenik
30 parçası) veya füzyon polipeptidi içeren bir aşı bileşimi ile ilgilidir. Bu tür bir aşı
bileşiminin optimum performansını sağlamak amacıyla, bunun immünolojik olarak ve
farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, araç veya adjuvan içermesi tercih edilir.

35 Buluşun bir polipeptidinin hayvan tarafından tanındığı etkili bir aşı, aşılanmamış

hayvanlar ile karşılaştırıldığında, bir virulan Mycobacterium verilmesi sonrasında bir hayvan modelinde hedef organlardaki bakteri yükünü azaltabilecek, sağkalım sürelerini uzatabilecek ve/veya kilo kaybını azaltabilecektir.

- 5 Uygun taşıyıcılar, polipeptid(lerin) hidrofobik kovalent olmayan etkileşim aracılığıyla bağlanan bir polimer, örneğin polistiren gibi bir plastik veya polipeptid(lerin) kovalent olarak bağlandığı bir polimer, örneğin bir polisakkarit veya bir polipeptid, örneğin bovin serum albumin, ovalbumin veya anahtar deliği limpet hemosiyaninden oluşan gruptan seçilir. Uygun araçlar bir dilüent ve bir süspanse edici ajandan oluşan gruptan seçilir.
- 10 Adjuvan tercihen dimetildioktadesilamonyum bromür (DDA), Quil A, poli I:C, alüminyum hidroksit, Freund'un tam olmayan adjuvanı, IFN- γ , IL-2, IL-12, monofosforil lipid A (MPL), Trehaloz Dimikolat (TDM), Trehaloz Dibehepat ve muramil dipeptiden (MDP) oluşan gruptan seçilir.
- 15 Aktif içerik maddeleri olarak peptid dizileri içeren aşılarda hazırlanışı, U.S. Patentler 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231 ve 4,599,230 aracılığıyla örneklendirildiği üzere genellikle teknikte iyi anlaşılır.

- 20 Aşıya yönelik adjuvan etkisi elde edilmesinin diğer yöntemleri, alüminyum hidroksit veya fosfat (şap), sentetik şeker polimerleri (Carbopol) gibi ajanların kullanımı, ısıtma işlemi ile aşıda proteinin agregasyonu, albumine pepsin ile işlem uygulanmış (Fab) antikorlar ile reaktif edilmesi ile agregasyon, C. parvum veya gram-negatif bakterilerin endotoksinleri veya lipopolisakkarit bileşenleri gibi bakteri hücreleri ile karışım, mannid mono-oleat (Aracel A) gibi fizyolojik olarak kabul edilebilir yağ araçları içinde emülsiyon veya bir blok süstitüsü olarak kullanılan yüzde 20'lik bir perflorokarbon (Fluosol-DA) solüsyonu ile emülsiyonu içerir. Diğer olasılıklar, yukarıda bahsedilen adjuvanlar ile kombinasyon halinde immün modüle edici maddeler örneğin sitokinler veya sentetik IFN- γ indükleyiciler örneğin poli I:C kullanımını kapsar.

- 30 Adjuvan etkisinin elde edilmesine yönelik diğer bir ilgi çekici olasılık, Gosselin *et al.*, 1992 içinde açıklanan tekniği kullanmaktır. Kısaca, mevcut buluşun bir antijeni gibi ilgili bir antijen monositler/makrofajlar üzerinde Fc γ reseptörlerine karşı bir antikora (veya antijen bağlayan antikor fragmanı) konjuge edilebilir.

- 35 Aşılar dozaj formülasyonu ile uyumlu bir şekilde ve reaktivasyonun önlenmesinde

immünojenik ve etkili olacağı bir miktarda uygulanır. Uygulanacak miktar örneğin, bireyin immün sisteminin bir immün yanıt başlatma kapasitesi dahil olarak tedavi edilecek özne ve istenen koruma derecesine bağlıdır. Uygun dozaj aralıkları aşılama başına birkaç yüz mikrogram aktif içerik maddesi sırasındadır, tercih edilen bir aralık

5 yaklaşık 0.1 µg ila 1000 µg arasında, örneğin yaklaşık 1 µg ila 300 µg aralığında ve özellikle yaklaşık 10 µg ila 50 µg aralığındadır. Başlangıç uygulaması ve rapel aşılarla yönelik uygun rejimler ayrıca değişkendir ancak, bir başlangıç uygulaması, akabinde sonraki inokülasyonlar veya diğer uygulamalar aracılığıyla tipikleştirilir.

10 Uygulama şekli geniş ölçüde değiştirilebilir. Bir aşının uygulanmasına yönelik geleneksel yöntemlerden herhangi biri uygulanabilir. Bunların, enjeksiyon veya benzeri aracılığıyla parenteral olarak, katı bir fizyolojik olarak kabul edilebilir taban üzerinde veya fizyolojik olarak kabul edilebilir bir dispersiyonda oral uygulamayı içerdiğine inanılır. Aşının dozajı uygulama yoluna bağlı olacaktır ve aşılacak kişinin yaşı ve

15 daha az bir dereceye kadar, aşılacak kişinin boyutuna göre değişiklik gösterecektir.

Aşılar geleneksel olarak intra pulmoner, örneğin aerosol veya inhalasyon aracılığıyla, parenteral olarak, enjeksiyon aracılığıyla, örneğin subkütanöz veya intramüsküler olarak uygulanır. Diğer uygulama modlarına uygun olan ek formülasyonlar

20 supozituarları ve bazı durumlarda, oral formülasyonları içerir. Supozituarlara yönelik olarak geleneksel bağlayıcılar ve taşıyıcılar, örneğin, polialkilen glikoller veya trigliseridleri içerebilir; bu tür supozituarlar %0.5 ila %10, tercihen %1-2 aralığında aktif katkı maddesi içeren karışımlardan oluşturulabilir. Oral formülasyonlar, örneğin,

25 mannitol, laktoz, nişasta, magnezyum stearat, sodyum sakkarin, selüloz, magnezyum karbonatın farmasötik dereceleri ve benzeri gibi genellikle kullanılan bu tür eksipiyenleri içerir. Bu formülasyonlar, solüsyonlar, süspansiyonlar, tabletler, haplar, kapsüller, sürekli salımlı formülasyonlar veya tozlar formunu alır ve avantajlı olarak aktif içerik maddesinin %10-95, tercihen %25-70'ini içerir.

30 Birçok durumda, birçok aşı uygulamasına sahip olmak gerekli olacaktır. Bireyin halihazırda enfekte olduğu veya enfekte hale gelmesinden şüphelenildiği durumlarda, önceki aşılama birincil hastalığı önlemek üzere yeterli bağışıklık sağlamış olabilir, ancak daha önce açıklandığı üzere bu immün yanıtın artırılması latent enfeksiyona karşı yardımcı olmayacaktır. Bu tür bir durumda aşının zorunlu olarak, latent

enfeksiyon aşaması veya yeniden ortaya çıkan aktif tüberküloz enfeksiyonuna karşı etkinliğe yönelik tasarlanan bir maruziyet sonrası aşı olması gerekli olmayacaktır.

Genetik varyasyon nedeniyle farklı bireyler, aynı polipeptide değişen dayanımlara sahip
5 immün yanıtlar ile tepki verebilir. Dolayısıyla buluşa göre aşı, immün yanıtı artırmak amacıyla birkaç farklı polipeptid içerebilir. Aşı iki veya daha fazla polipeptid veya immünojenik parça içerebilir, burada polipeptidlerin tümü yukarıda tanımlandığı gibidir veya tümü olmamak üzere bazı peptidler virülan mikobakteriden derive edilebilir. İkinci
10 örnekte polipeptidlere yönelik yukarıda belirtilen kriterleri zorunlu olarak yerine getirmeyen polipeptidler, kendi immünojenisitesi nedeniyle etki edebilir veya yalnızca adjuvanlar olarak etki edebilir.

Aşı 1-20, örneğin 2-20 veya 3-20 farklı polipeptid veya füzyon polipeptidi, örneğin 3-10 farklı polipeptid veya füzyon proteini içerebilir.

15

DNA Aşısı.

Buluşun nükleik asit fragmanları, antijenlerin *in vivo* ifadesinin etkilenmesine yönelik kullanılabilir, *diğer bir deyişle* nükleik asit fragmanları Imer et al 1993 içinde ele alındığı
20 üzere söz konusu DNA aşılarında kullanılabilir.

Dolayısıyla burada ayrıca buluşa göre bir nükleik asit fragmanı içeren bir maruziyet sonrası aşı açıklanır, aşı bir insan dahil olmak üzere, aşının uygulandığı bir hayvan tarafından antijenin *in vivo* ifadesini etkiler, ifade edilen antijen miktarı bir insan dahil
25 olmak üzere bir hayvanda virülan mikobakteriden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisini vermek üzere etkilidir.

Bu tür bir DNA aşısının etkinliği bir immün yanıt modüle etme yeteneğine sahip olan, bir polipeptid kodlayan bir DNA fragmanı ile birlikte ifade ürününü kodlayan genin
30 uygulanması aracılığıyla ihtimal dahilinde geliştirilebilir.

Canlı rekombinant aşıları

Bir maruziyet sonrası aşısıya yönelik bir selüler immün yanıtın etkili bir şekilde aktive
35 edilmesine yönelik bir olasılık, patojenik olmayan bir mikroorganizma veya virüste ilgili

antijenin ifade edilmesi aracılığıyla elde edilebilir. Bu tür mikroorganizmaların iyi bilinen örnekleri *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella* ve *Pseudomona*'dır ve virüslerin örnekleri Vaksinya virüsü ve Adenovirüstür.

- 5 Dolayısıyla, ayrıca burada halihazırda temin edilebilen canlı BCG aşısının bir gelişimi açıklanır, burada yukarıda açıklandığı üzere bir veya daha fazla polipeptidi kodlayan bir DNA dizisinin bir veya daha fazla kopyası, mikro-organizmanın polipeptid ifade etmesi ve salgılamasını sağlayan bir şekilde mikro-organizmanın genomuna yerleştirilmiştir. Buluşun bir nükleotit dizisinin birden fazla kopyasının eklenmesi, immün yanıtı artırmak
10 üzere tasarlanır.

- Diğer bir olasılık, buluşa göre polipeptid kodlayan DNA'nın vaksinya virüsü veya Adenovirüs gibi atenüe bir virüse birleştirilmesidir (Rolph et al 1997). Rekombinant vaksinya virüsü enfekte konakçı hücrenin sitoplazması içinde çoğalabilir ve söz konusu
15 polipeptid dolayısıyla, TB'ye karşı koruma indüklemesi tasarlanan bir immün yanıtı indükleyebilir.

Buluş bu noktada sınırlandırıcı olmayan örneklerde daha detaylı olarak açıklanacaktır.

20 **Şekil açıklamaları**

Şekil 1: Bir *M. tuberculosis* enfeksiyonunun gidişatı, esas olarak 3 faz aracılığıyla ilerler.

- 25 Şekil 2: Reaktivasyonu önlemek üzere maruziyet sonrası aşılama yönelik model

Şekil 3: TB aşılama modeli.

- Maruziyet sonrası aşılamanın test edilmesine yönelik SSI'da kullanılan modelin şematik bir genel taslağı. Fareler aerosol yöntem aracılığıyla virülen *M.tb* ile enfekte edilir. Enfeksiyon sonrası 6'ncı hafta ile 12'nci hafta arasında fareler bir
30 latent TB durumu oluşturmak üzere antibiyotik ile tedavi edilir. Fareler, maruziyet aşısı adayları ile enfeksiyon sonrası 10'uncu haftada başlatılan 3 haftalık aralıklarda 2 ila 3 kez aşılanır. Farelerin hastalığı reaktif etmesi için zaman verilir ve yaklaşık olarak 20 hafta sonra akciğerler aşının koruyucu etkinliğini değerlendirmek üzere bakteri sayısına yönelik değerlendirilir.

Şekil 4: Ag85 olmamak üzere ESAT6 aracılığıyla maruziyet sonrası aşı indüklü koruma.

Fareler örnek 1'deki şematik genel taslağa göre enfekte edilmiştir, işlenmiştir ve aşılanmıştır. Fareler enfeksiyon sonrası 30-40'ıncı haftalar arasında öldürülmüştür ve bu zaman noktasında, bakteri yüküne (Şekil A, C-E) yönelik değerlendirilmiştir veya şekil 4B'de gösterildiği üzere burada bakteri yükü, ESAT6'ya yönelik enfeksiyon boyunca birkaç zaman noktasında belirlenmiştir. (A ve B) Kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında ESAT6 aşılanmış bakteri yükü. (C) Kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında Ag85B aşılanmış bakteri yükü. (D) Ag85B aşılanmış ve kontrol hayvanlarının her ikisi ile karşılaştırıldığında ESAT-6 pepmix aşılanmış (tüm ESAT6 dizisini kaplayan örtüşen peptidler havuzu) bakteriyel yükü. (E) Aşılanmamış kontrol fareler ile karşılaştırıldığında Ag85B-ESAT-6 (H1) ile aşılanmış maruziyet sonrası aşılama izleyen reaktivasyona karşı koruma. Şekil 4A, C-E'deki tüm veriler gösterilen ortalama ile her bir ayrı hayvanı temsil eden noktasal grafik olarak gösterilirken, şekil 4B'deki her bir zaman noktası 6 ayrı hayvanı temsil eder ve ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası (SEM) olarak gösterilir (B). Tüm istatistiksel analizler bir eşleştirilmemiş t-testi (Şekil A-C ve E) veya Türkiye çoklu karşılaştırma testi (şekil D) kullanılarak gerçekleştirilmiştir, burada $p < 0.05$ anlamlı olarak düşünülmüştür.

Şekil 5: ESAT-6 maruziyet sonrası aşılama polifonksiyonel T hücrelerini indükler.

Aşılanmamış veya ESAT-6 aşılanmış hayvanlardan alınan enfekte akciğerlerden hücreler, anti-CD4, -CD8, -IFN- γ , -TNF- α ve -IL-2 ile boyama öncesinde ESAT-6 ile in vitro stimüle edilmiştir. (A ve B) Sitokin profilleri ilk olarak CD4 T hücrelerinin IFN- γ pozitif (+) veya IFN- γ negatif (-) hücrelere bölünmesi aracılığıyla belirlenmiştir. IFN- γ + ve IFN- γ - hücrelerinin her ikisi TNF- α ve IL-2 üretimine göre analiz edilmiştir. Dilim grafikleri (A ve B) profil üretimi profiline göre renk kodludur ve belirli bir sitokin üretim profiline yönelik pozitif olan CD4⁺ T hücresi yanıtının (ESAT-6'ya spesifik CD4 T hücrelerinin dışında) fraksiyonlarını özetler. (C) sitokinler mümkün olan her kombinasyonu çubuk grafiğinin x-ekseni üzerinde gösterilir ve aşılanmamış farelerde (gri çubuklar) veya sitokinlerin herhangi bir kombinasyonunu ifade eden ESAT-6 aşılanmış farelerde (Siyah çubuklar) ESAT-6'ya spesifik CD4⁺ T hücrelerinin yüzdesi her bir immünizasyon grubuna yönelik verilir. D. Latent olarak enfekte fareler iki kez

ESAT-6 ile aşılanmıştır ve son aşılamaadan 20 hafta sonra akciğerler koruyucu etkinliği belirlemek üzere bakteri sayısına yönelik değerlendirilmiştir. (** $p<0.01$, Tek yönlü ANOVA Türkiye çoklu karşılaştırma testi).

Şekil 6: Tüm maruziyet sonrası deneylerin toplanmış analizi

5 Maruziyet sonrası aşılamaaya yönelik ESAT6, Rv3871, Ag85B, Rv3905, Rv3445, Rv0569 veya Rv2031c (Şekil A), Ag85B-ESAT6 (H1) veya Ag85B-ESAT6-Rv2660'dan (H56) (Şekil B) birinin kullanıldığı ayrı bir deneye yönelik, adjuvan kontrol grubunun bakteri yükünün medyanı, yukarıda bahsedilen antijenlerden herhangi biri ile aşılanmış olan bir aşılanmış gruptaki her bir ayrı
10 farenin bakteri yükü ile karşılaştırılmıştır. Şekil A ve B'de her bir nokta koruma seviyesine, diğer bir deyişle adjuvan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aşılama aracılığıyla verilen ΔLog_{10} CFU'ya karşılık gelir ve birkaç bağımsız deneyden oluşur. (A) Tekli antijenler ESAT6, Rv3871, Ag85B, Rv3905, Rv3445, Rv0569 veya Rv2031c'ye yönelik (B) veya tek başına ESAT6 ile
15 karşılaştırıldığında melez antijenler H1 ve H56'ya yönelik Log_{10} koruması. Bir istatistiksel analiz Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farklı gruplar arasında medyanların karşılaştırılmasına yönelik uygulanmıştır. $p<0.05$ anlamlı olarak düşünülmüştür.

Şekil 7: ESAT6 ve kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında Rv3871 ile
20 maruziyet sonrası aşılamanın etkisi.

Fareler enfeksiyon sonrası 10, 13 ve 18'inci haftada enfekte edilmiştir, işlenmiştir ve aşılanmıştır. Enfeksiyon sonrası 36'ncı haftada fareler kesilmiştir ve aşılanmış ve aşılanmamış salin kontrol farelerinden akciğer lenfositleri Rv3871 (Şekil 7A) veya ESAT6 (Şekil 7B) ile in vitro yeniden stimüle edilmiştir.
25 IFN- γ salınımları ELISA ile değerlendirilmiştir ve numuneler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilir. Aşılar aracılığıyla verilen koruyucu etkinlik, tam akciğer homojenatından kültürlenen akciğerdeki bakterilerin sayılması aracılığıyla belirlenmiştir ($n=16-18$). Veriler bir noktasal grafik olarak gösterilir, burada her bir nokta ayrı bir hayvanı temsil eder ve
30 medyan (kırmızı çizgi) ile gösterilir.

Örnekler

ÖRNEK 1: Aşılamaya yönelik murin TB modeli

Cornell modeli, latent TB çalışmasına yönelik bir murin modeli olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Bu model laboratuvarıda reaktivasyonu önlemek üzere aşı adaylarının yeteneğinin test edilmesine yönelik uyarlanmıştır. Fareler başlangıçta virülan *M.tb.* ile aerosol olarak enfekte edilir ve enfeksiyon sonrası 6'ncı haftada antibiyotik tedavisi bakteri yükünü azaltmak üzere başlatılır. Bu, farelerde kendiliğinden meydana gelmeyen bir insan enfeksiyonunun latent aşamasını taklit etmek içindir. Bu latent aşama (sürekli düşük bakteri sayısına sahip bir aşama) boyunca farelere iki kez bağışıklık kazandırılır ve aşı ile reaktivasyonu önleme yeteneği, son immünizasyondan 20 hafta sonra canlı *M.tb.*'ye yönelik dalak ve akciğerlerin kültürlenmesi aracılığıyla belirlenir. Deneylerin uzun süresi, hastalığın reaktivasyonuna yönelik yeterli süreyi sağlamak üzere gereklidir, bu aşı etkinliğinin okunmasına yönelik bir ön koşuldur (Şekil 3).

ÖRNEK 2 : Ag85 olmamak üzere ESAT6 aracılığıyla maruziyet sonrası aşı indüklü koruma.

ESAT-6 ve Ag85B'nin tek bileşenler olarak ve ayrıca füzyon molekülü Ag85B-ESAT6 (H1) olarak profilaktik aşılamada koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. Ancak bu antijenlerin maruziyet sonrası modelde test edilmesi durumunda (yukarıdaki örnek 1'de açıklandığı üzere), yalnızca ESAT6 bir koruyucu etkiye sahiptir ve reaktivasyon fazı boyunca bakteri büyümesini kontrol altına alır (Şekil 4). Ayrıca şekil 4B'de görüldüğü üzere, reaktivasyona karşı ESAT6 koruması, enfeksiyon sonrası 18'inci hafta kadar erken kendini gösterir ve bu koruma deney süreci boyunca sürdürülmüştür (enfeksiyon sonrası 40'ıncı haftaya kadar). Bu, kontrol ile karşılaştırıldığında bakteri yükünde herhangi bir kayda değer azalma olmadığı, Ag85B'nin bir maruziyet sonrası aşı (Şekil 4C ve D) olarak kullanılması durumunda gözlenenin aksinedir. Ek olarak, bir profilaktik ortamda umut verici etkinlik gösteren, TB antijenleri Ag85B ve ESAT-6'dan oluşan H1 füzyon proteini değerlendirilmiştir. Bu molekülün SSI maruziyet sonrası modelde bir maruziyet sonrası aşı olarak kullanılması durumunda bu, bakteri sayısını büyük oranda azaltabilmiştir (Şekil 4E).

ÖRNEK 3: ESAT6 peptid karışımı aracılığıyla maruziyet sonrası aşı indüklü koruma

Yukarıdaki örneklerde gösterildiği üzere ESAT-6 molekülü, maruziyet sonrası verilmesi durumunda oldukça aktiftir, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ve ayrıca Ag85B ile

karşılaştırıldığında bakteri yükünde bir azalma ile sonuçlanır. Aynı zamanda bir rekombinant protein yerine örtüşen peptidlerin bir havuzu olarak verilen ESAT-6'nın ayrıca kontrol grubu ve Ag85B'nin her ikisi ile karşılaştırıldığında, güçlü ESAT6 aktivitesi ve bir maruziyet sonrası aşı olarak fonksiyon gösterme yeteneği sergileyerek reaktivasyona karşı daha iyi bir korumaya yol açtığı gösterilmiştir (Şekil 4D).

Koruma deneyine yönelik kullanılan örtüşen ESAT-6 peptidleri (P1-P13):

- P1 MTEQQWNFAGIEAAA (SEQ ID NO. 19)
- P2 NFAGIEAAASAIQGN (SEQ ID NO. 20)
- P3 ASAIQGNVTSIHSLL (SEQ ID NO. 21)
- P4 NVTISIHSLLDEGKQS (SEQ ID NO. 22)
- P5 SLLDEGKQSLTKLAA (SEQ ID NO. 23)
- P6 KQSLTKLAAAWGGSG (SEQ ID NO. 24)
- P7 AAWGGSGSEAYQGVQ (SEQ ID NO. 25)
- P8 GSEAYQGVQQKWDAT (SEQ ID NO. 26)
- P9 QQKWDATATELNNAL (SEQ ID NO. 27)
- P10 TATELNNALQNLART (SEQ ID NO. 28)
- P11 ALQNLARTISEAGQA (SEQ ID NO. 29)
- P12 TISEAGQAMASTEGRN (SEQ ID NO. 30)
- P13 QAMASTEGRNVTGMFA (SEQ ID NO. 31)

ÖRNEK 5: ESAT-6 indüklü polifonksiyonel T hücreleri ile maruziyet sonrası aşılama

ESAT-6'ya spesifik hücrelerin sitokin ifadesi profilin üzerinde ESAT-6 ile bir maruziyet sonrası aşılamanın etkisini belirlemek üzere fareler ilk olarak, virülan *M.tb.* ile aerosol olarak enfekte edilmiştir ve enfeksiyon sonrası 6'ncı haftada antibiyotik tedavisi bakteri yükünü azaltmak ve bir latent enfeksiyon oluşturmak üzere başlatılır. Latent aşama sırasında fareler 3 haftada 3 kez olan aralıklarda aşılanmıştır (şekil 3'te gösterildiği üzere) ve ESAT-6 aşısının polifonksiyonel T hücrelerinin sayısını etkileme ve *M.tb.*'nin reaktivasyonunu önleme yeteneği, son aşılamadan 20 hafta sonra belirlenmiştir. Sonuçlar, aşılanmamış grupta büyük oranda bir ESAT-6 yanıtı olduğunu, ancak sitokin ifadesi profilinin, özellikle polifonksiyonel T hücreleri (IFN- γ +TNF- α +IL-2+ CD4 T hücreleri) bakımından ESAT-6 aşılanmış grup (Şekil 5) ile karşılaştırıldığında belirgin

şekilde farklı olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla aşılammamış grup ile karşılaştırıldığında, azalan IFN- γ /TNF- α CD4 T hücreleri sayıları ve IFN- γ /TNF- α /IL-2'yi birlikte ifade edilen üçlü pozitif polifonksiyonel CD4 T hücrelerinin artan sayısı gözlemlenmiştir. Polifonksiyonel T hücrelerinin artan varlığı ESAT-6 aşılammış hayvanların akciğerlerindeki azalan bakteri sayısı ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 5D).

ÖRNEK 6: ESAT6 ile maruziyet sonrası aşılama erken ve geç aşama enfeksiyonunun her ikisi ile ilişkili diğer antijenler ile karşılaştırıldığında reaktivasyona karşı daha tutarlı bir koruma sağlar.

10

Hangi antijenlerin reaktivasyona karşı daha tutarlı koruma sağladığını belirlemek üzere, yürütülen tüm maruziyet sonrası deneylere bağlı olarak normalize verilerin toplanmış bir analizi yapılmıştır. Ayrı deneylerden veri takımları bir grup içindeki her bir ayrı farenin bakteri yükünün kontrol grubunun medyanı ile karşılaştırılması aracılığıyla normalize edilmiştir, diğer bir deyişle her bir veri noktası kontrol medyan CFU'su ile her bir ayrı hayvanın CFU'su arasındaki farklılığı (Log10 CFU kontrol medyan-Log10CFU aşı grubu) temsil eder (Şekil 6). Şekil 6A'da, bunlardan ikincisinin ESAT6 familyası proteinleri olduğu, latans ilişkili antijenler Rv0569, Rv2031c ve erken antijenler Ag85B, ESAT6, Rv3871, Rv3905 ve Rv3445'e yönelik korumaya yönelik toplanan veri takımının karşılaştırılması, ESAT aşılammış hayvanların değerlendirilen diğer antijenler ile karşılaştırıldığında reaktivasyona karşı büyük oranda daha iyi korunduğunu gösterir. Aynı zamanda bir ESX-1 proteini olan Rv3871 ile maruziyet sonrası aşılama akabinde elde edilen koruyucu seviyeler ayrıca diğer antijenler ile karşılaştırıldığında yüksek gibi görünür (Şekil 6A). Özellikle ESAT6 aktivitesini daha fazla göstermek üzere, ESAT6 ile verilen korumu ile her ikisi ESAT6 içeren iki füzyon yapısı H1 (Ag85B-ESAT6) ve H56 (Ag85B-ESAT6-Rv2660) ile karşılaştırılmıştır (şekil 6B). Analiz, ESAT6 aktivitesinin yukarıda bahsedilen iki füzyon yapısına dahil edilmesi durumunda reaktivasyona karşı koruma ile sonuçlandığını gösterir.

ÖRNEK 7: Rv3871 olan ESX-1 familyasının diğer bir üyesi ile maruziyet sonrası aşılama reaktivasyon prosesi üzerinde inhibitör bir etkiye sahip gibi görünür

ESAT6 ile paralel olarak ESX-1 familyasının diğer üyeleri değerlendirilmiştir ve Rv3871 maruziyet sonrası aşılamanın ESAT6 indüklü immün yanıt derecesine kadar olmamasına rağmen (Şekil 7A), Rv3871'e spesifik immün yanıtın bir indüksiyonuna yol

35

açtığı (Şekil 7B) bulunmuştur. Bununla beraber ESAT6 ve Rv3871 indüklü immün yanıtların her ikisi, salin kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında daha fazla olmuştur. Aşıya spesifik immün yanıtın indüksiyonu, salin grubu ile karşılaştırıldığında her iki aşı grubundaki azaltılan (medyan) bir bakteri yükü ile ilişkilendirilmiştir. Bu, kontrol grubunda bir şekilde artan seviye ile karşılaştırıldığında bu iki gruptaki bakteri sayılarının benzer seviyeleri aracılığıyla gösterilen, Rv3871'in ESAT6 ile karşılaştırıldığında reaktivasyona karşı korumada benzer bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (Şekil 7C)

Referanslar

- Andersen, P. 2007 15(1), 7-13
- Anon. 2001. Global Tuberculosis Control. WHO Report.
- 5 Arend, SM., *Infect Immun.* 2000 68(6): 3314-3321.
- Brodin, P. et al. *Infect Immun.* 2006, 74, 88-98
- Cote-Sierra J, et al 1998, *Gene* Oct 9;221(1):25-34
- Doherty TM et al., 2002, *J Clin Microbiol.* Feb;40(2):704-6.
- Gao LY et al 2004, *Molecular Microbiology* 1677-93
- 10 Gosselin et al., 1992. *J. Immunol.* 149: 3477-3481
- Guinn KI et al, 2004, *Mol Microbiol.* 51, 359-70
- Guttstadt, A 1891. Die Wirksamkeit des Koch'schen Heilmittels gegen
Tuberculosis, Po-lykliniken und Pathologisch/Anatomischen Institute der
Preussischen Universitaten. Springer, Berlin.
- 15 Harboe, M., et al 1998 *Infect. Immun.* 66:2; 717-723
- Hougardy et al 2007, *PLoS ONE.* Oct 3;2(10):e926
- Kilgus J et al, *J Immunol.* 1991 Jan 1;146(1):307-15
- Leyten EM. Et al. *Microbes Infect.* 2006 8(8):2052-60.
- Lin MY and Ottenhoff TH, *Biol. Chem.* 2008, 389 (5): 497-511
- 20 Lowrie, D.B. et al 1999, *Nature* 400: 269-71
- Lustig et al 1976, *Cell Immunol* 24(1):164-7
- MacGurn JA et al. *Mol Microbiol.* 2005, 57:1653-63
- Merrifield, R. B. *Fed. Proc. Am. Soc. Ex. Biol.* 21: 412, 1962 and *J. Am. Chem.*
Soc. 85: 2149, 1963
- 25 Mowat et al 1991, *Immunology* 72(3):317-22
- Mustafa, AS et al. 2000, *Clin. Infect. Dis.* 30 (suppl. 3) S201-S205
- Nagai et al 1991, *Infect. Immun* 59:1; 372-382
- Olsen AW et al, *Eur J Immunol.* 2000 Jun; 30(6):1724-32
- Pym AS et al *Nat Med* 2003, 9, 533-9;
- 30 Pearson, WR. et al. 1988. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 2444-2448.
- Raghavan, S. et al. 2008, *Nature* 454, 717-721
- Ravn, P. et al 1999. *J.Infect.Dis.* 179:637-645
- Rolph, MS, and I. A. Ramshaw. 1997. *Curr.Opin.Immunol.*9:517-24
- Rogerson, BJ et al *Immunology* 2006, 118, 195-201
- 35 Rosenkrands, I., et al 1998, *Infect. Immun* 66:6; 2728-2735

- Ruhwald M. et al 2008 PLoS ONE. Aug 6;3(8):e2858
- Sambrook et al Molecular Cloning; A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1989
- Seder, Nat. Rew. Immunol. 2008;8(4):247-58
- 5 Sinigaglia F et al. Nature 1988 Dec 22-29;336(6201):778-80
- Skj t, RLV., et al 2000, Infect. Immun 68:1; 214-220
- Smith J. et al. 2008, Infect Immun 76, 5478-87
- Stanley, SA et al. 2003 Proc Natl Acad. Sci USA 100:12420-5
- Stryhn, A., et al 1996 Eur. J. Immunol. 26:1911-1918
- 10 Turner, OC et al 2000 Infect Immun. 68:6:3674-9.
- Talaat AM et al. 2007, J of Bact 189, 4265-74
- Thompson J., et al Nucleic Acids Res 1994 22:4673-4680
- Ulmer J.B et al 1993, Curr. Opin. Invest. Drugs 2(9): 983-989
- van Pinxteren LA et al. 2000. Eur. J. Immunol. 30: 3689-98.

15

DİZİ LİSTESİ

- <110> Statens Serum Institut
- <120> Reaktivasyonu  nlemek  zere bir tüberküloz a ısı
- 20 <130> 15034
- <160> 34
- <170> PatentIn versiyon 3.1
- <210> 1
- <211> 95
- 25 <212> PRT
- <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
1 5 10 15

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

Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
35 40 45

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu
50 55 60

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
65 70 75 80

Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
85 90 95

<210> 2

<211> 100

5

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2

Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val
20 25 30

Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly
35 40 45

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys
50 55 60

Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly
65 70 75 80

Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser
85 90 95

Gln Met Gly Phe
100

10

<210> 3

<211> 392

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 3

Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
1 5 10 15

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala
50 55 60

Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu
65 70 75 80

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val
100 105 110

Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala
115 120 125

Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val
130 135 140

Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala
145 150 155 160

Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala
165 170 175

Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr

180	185	190
Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys		
195	200	205
Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg		
210	215	220
Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr		
225	230	235
Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala		
245	250	255
Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser		
260	265	270
Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe		
275	280	285
Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln		
290	295	300
Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln		
305	310	315
Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met		
325	330	335
Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser		
340	345	350
Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr		
355	360	365
Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln		
370	375	380
Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val		
385	390	

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

Val Asp Leu Pro Gly Asn Asp Phe Asp Ser Asn Asp Phe Asp Ala Val
1 5 10 15

Asp Leu Trp Gly Ala Asp Gly Ala Glu Gly Trp Thr Ala Asp Pro Ile
 20 25 30
 Ile Gly Val Gly Ser Ala Ala Thr Pro Asp Thr Gly Pro Asp Leu Asp
 35 40 45
 Asn Ala His Gly Gln Ala Glu Thr Asp Thr Glu Gln Glu Ile Ala Leu
 50 55 60
 Phe Thr Val Thr Asn Pro Pro Arg Thr Val Ser Val Ser Thr Leu Met
 65 70 75 80
 Asp Gly Arg Ile Asp His Val Glu Leu Ser Ala Arg Val Ala Trp Met
 85 90 95
 Ser Glu Ser Gln Leu Ala Ser Glu Ile Leu Val Ile Ala Asp Leu Ala
 100 105 110
 Arg Gln Lys Ala Gln Ser Ala Gln Tyr Ala Phe Ile Leu Asp Arg Met
 115 120 125
 Ser Gln Gln Val Asp Ala Asp Glu His Arg Val Ala Leu Leu Arg Lys
 130 135 140
 Thr Val Gly Glu Thr Trp Gly Leu Pro Ser Pro Glu Glu Ala Ala Ala
 145 150 155 160
 Ala Glu Ala Glu Val Phe Ala Thr Arg Tyr Ser Asp Asp Cys Pro Ala
 165 170 175
 Pro Asp Asp Glu Ser Asp Pro Trp
 180

<210> 5

<211> 103

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

Met Thr Glu Asn Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala
 20 25 30
 Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys
 35 40 45
 Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala

50 55 60
 Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys
 85 90 95
 Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr
 100

<210> 6

<211> 132

5

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 6

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

<210> 7

10

<211> 573

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 7

Met Thr Asp Arg Leu Ala Ser Leu Phe Glu Ser Ala Val Ser Met Leu
1 5 10 15

Pro Met Ser Glu Ala Arg Ser Leu Asp Leu Phe Thr Glu Ile Thr Asn
20 25 30

Tyr Asp Glu Ser Ala Cys Asp Ala Trp Ile Gly Arg Ile Arg Cys Gly
35 40 45

Asp Thr Asp Arg Val Thr Leu Phe Arg Ala Trp Tyr Ser Arg Arg Asn
50 55 60

Phe Gly Gln Leu Ser Gly Ser Val Gln Ile Ser Met Ser Thr Leu Asn
65 70 75 80

Ala Arg Ile Ala Ile Gly Gly Leu Tyr Gly Asp Ile Thr Tyr Pro Val
85 90 95

Thr Ser Pro Leu Ala Ile Thr Met Gly Phe Ala Ala Cys Glu Ala Ala
100 105 110

Gln Gly Asn Tyr Ala Asp Ala Met Glu Ala Leu Glu Ala Ala Pro Val
115 120 125

Ala Gly Ser Glu His Leu Val Ala Trp Met Lys Ala Val Val Tyr Gly
130 135 140

Ala Ala Glu Arg Trp Thr Asp Val Ile Asp Glu Val Lys Ser Ala Gly
145 150 155 160

Lys Trp Pro Asp Lys Phe Leu Ala Gly Ala Ala Gly Val Ala His Gly
165 170 175

Val Ala Ala Ala Asn Leu Ala Leu Phe Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu
180 185 190

Thr Glu Ala Asn Asp Ser Pro Ala Gly Glu Ala Cys Ala Arg Ala Ile
195 200 205

Ala Trp Tyr Leu Ala Met Ala Arg Arg Ser Gln Gly Asn Glu Ser Ala
210 215 220

Ala Val Ala Leu Leu Glu Trp Leu Gln Thr Thr His Pro Glu Pro Lys
225 230 235 240

Val Ala Ala Ala Leu Lys Asp Pro Ser Tyr Arg Leu Lys Thr Thr Thr
245 250 255

Ala Glu Gln Ile Ala Ser Arg Ala Asp Pro Trp Asp Pro Gly Ser Val

260	265	270
Val Thr Asp Asn Ser Gly Arg Glu Arg Leu Leu Ala Glu Ala Gln Ala 275 280 285		
Glu Leu Asp Arg Gln Ile Gly Leu Thr Arg Val Lys Asn Gln Ile Glu 290 295 300		
Arg Tyr Arg Ala Ala Thr Leu Met Ala Arg Val Arg Ala Ala Lys Gly 305 310 315 320		
Met Lys Val Ala Gln Pro Ser Lys His Met Ile Phe Thr Gly Pro Pro 325 330 335		
Gly Thr Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg Val Val Ala Asn Ile Leu Ala 340 345 350		
Gly Leu Gly Val Ile Ala Glu Pro Lys Leu Val Glu Thr Ser Arg Lys 355 360 365		
Asp Phe Val Ala Glu Tyr Glu Gly Gln Ser Ala Val Lys Thr Ala Lys 370 375 380		
Thr Ile Asp Gln Ala Leu Gly Gly Val Leu Phe Ile Asp Glu Ala Tyr 385 390 395 400		
Ala Leu Val Gln Glu Arg Asp Gly Arg Thr Asp Pro Phe Gly Gln Glu 405 410 415		
Ala Leu Asp Thr Leu Leu Ala Arg Met Glu Asn Asp Arg Asp Arg Leu 420 425 430		
Val Val Ile Ile Ala Gly Tyr Ser Ser Asp Ile Asp Arg Leu Leu Glu 435 440 445		
Thr Asn Glu Gly Leu Arg Ser Arg Phe Ala Thr Arg Ile Glu Phe Asp 450 455 460		
Thr Tyr Ser Pro Glu Glu Leu Leu Glu Ile Ala Asn Val Ile Ala Ala 465 470 475 480		
Ala Asp Asp Ser Ala Leu Thr Ala Glu Ala Ala Glu Asn Phe Leu Gln 485 490 495		
Ala Ala Lys Gln Leu Glu Gln Arg Met Leu Arg Gly Arg Arg Ala Leu 500 505 510		
Asp Val Ala Gly Asn Gly Arg Tyr Ala Arg Gln Leu Val Glu Ala Ser 515 520 525		

Glu Gln Cys Arg Asp Met Arg Leu Ala Gln Val Leu Asp Ile Asp Thr
530 535 540

Leu Asp Glu Asp Arg Leu Arg Glu Ile Asn Gly Ser Asp Met Ala Glu
545 550 555 560

Ala Ile Ala Ala Val His Ala His Leu Asn Met Arg Glu
565 570

<210> 8

<211> 480

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 8

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

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

Phe Asp Asp Pro Leu Gln Phe Tyr Ser Arg Ser Ile Ala Leu Gly Ile
35 40 45

Val Val Ala Val Leu Ile Leu Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Tyr Phe
50 55 60

Lys Pro Gln Gly Lys Leu Gly Gly Thr Ser Leu Phe Thr Asp Arg Ala
65 70 75 80

Thr Asn Gln Leu Tyr Val Leu Leu Ser Gly Gln Leu His Pro Val Tyr
85 90 95

Asn Leu Thr Ser Ala Arg Leu Val Leu Gly Asn Pro Ala Asn Pro Ala
100 105 110

Thr Val Lys Ser Ser Glu Leu Ser Lys Leu Pro Met Gly Gln Thr Val
115 120 125

Gly Ile Pro Gly Ala Pro Tyr Ala Thr Pro Val Ser Ala Gly Ser Thr
130 135 140

Ser Ile Trp Thr Leu Cys Asp Thr Val Ala Arg Ala Asp Ser Thr Ser
145 150 155 160

Pro Val Val Gln Thr Ala Val Ile Ala Met Pro Leu Gln Ile Asp Ala
165 170 175

Ser Ile Asp Pro Leu Gln Ser His Glu Ala Val Leu Val Ser Tyr Gln
 180 185 190

Gly Glu Thr Trp Ile Val Thr Thr Lys Gly Arg His Ala Ile Asp Leu
 195 200 205

Thr Asp Arg Ala Leu Thr Ser Ser Met Gly Ile Pro Val Thr Ala Arg
 210 215 220

Pro Thr Pro Ile Ser Glu Gly Met Phe Asn Ala Leu Pro Asp Met Gly
 225 230 235 240

Pro Trp Gln Leu Pro Pro Ile Pro Ala Ala Gly Ala Pro Asn Ser Leu
 245 250 255

Gly Leu Pro Asp Asp Leu Val Ile Gly Ser Val Phe Gln Ile His Thr
 260 265 270

Asp Lys Gly Pro Gln Tyr Tyr Val Val Leu Pro Asp Gly Ile Ala Gln
 275 280 285

Val Asn Ala Thr Thr Ala Ala Ala Leu Arg Ala Thr Gln Ala His Gly
 290 295 300

Leu Val Ala Pro Pro Ala Met Val Pro Ser Leu Val Val Arg Ile Ala
 305 310 315 320

Glu Arg Val Tyr Pro Ser Pro Leu Pro Asp Glu Pro Leu Lys Ile Val
 325 330 335

Ser Arg Pro Gln Asp Pro Ala Leu Cys Trp Ser Trp Gln Arg Ser Ala
 340 345 350

Gly Asp Gln Ser Pro Gln Ser Thr Val Leu Ser Gly Arg His Leu Pro
 355 360 365

Ile Ser Pro Ser Ala Met Asn Met Gly Ile Lys Gln Ile His Gly Thr
 370 375 380

Ala Thr Val Tyr Leu Asp Gly Gly Lys Phe Val Ala Leu Gln Ser Pro
 385 390 395 400

Asp Pro Arg Tyr Thr Glu Ser Met Tyr Tyr Ile Asp Pro Gln Gly Val
 405 410 415

Arg Tyr Gly Val Pro Asn Ala Glu Thr Ala Lys Ser Leu Gly Leu Ser
 420 425 430

Ser Pro Gln Asn Ala Pro Trp Glu Ile Val Arg Leu Leu Val Asp Gly

435 440 445
 Pro Val Leu Ser Lys Asp Ala Ala Leu Leu Glu His Asp Thr Leu Pro
 450 455 460

Ala Asp Pro Ser Pro Arg Lys Val Pro Ala Gly Ala Ser Gly Ala Pro
 465 470 475 480

<210> 9

<211> 747

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

Met Thr Thr Lys Lys Phe Thr Pro Thr Ile Thr Arg Gly Pro Arg Leu
 1 5 10 15

Thr Pro Gly Glu Ile Ser Leu Thr Pro Pro Asp Asp Leu Gly Ile Asp
 20 25 30

Ile Pro Pro Ser Gly Val Gln Lys Ile Leu Pro Tyr Val Met Gly Gly
 35 40 45

Ala Met Leu Gly Met Ile Ala Ile Met Val Ala Gly Gly Thr Arg Gln
 50 55 60

Leu Ser Pro Tyr Met Leu Met Met Pro Leu Met Met Ile Val Met Met
 65 70 75 80

Val Gly Gly Leu Ala Gly Ser Thr Gly Gly Gly Gly Lys Lys Val Pro
 85 90 95

Glu Ile Asn Ala Asp Arg Lys Glu Tyr Leu Arg Tyr Leu Ala Gly Leu
 100 105 110

Arg Thr Arg Val Thr Ser Ser Ala Thr Ser Gln Val Ala Phe Phe Ser
 115 120 125

Tyr His Ala Pro His Pro Glu Asp Leu Leu Ser Ile Val Gly Thr Gln
 130 135 140

Arg Gln Trp Ser Arg Pro Ala Asn Ala Asp Phe Tyr Ala Ala Thr Arg
 145 150 155 160

Ile Gly Ile Gly Asp Gln Pro Ala Val Asp Arg Leu Leu Lys Pro Ala
 165 170 175

Val Gly Gly Glu Leu Ala Ala Ala Ser Ala Ala Pro Gln Pro Phe Leu
 180 185 190

Glu Pro Val Ser His Met Trp Val Val Lys Phe Leu Arg Thr His Gly
 195 200 205
 Leu Ile His Asp Cys Pro Lys Leu Leu Gln Leu Arg Thr Phe Pro Thr
 210 215 220
 Ile Ala Ile Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu Met Thr Ala
 225 230 235 240
 Met Ile Cys His Leu Ala Val Phe His Pro Pro Asp Leu Leu Gln Ile
 245 250 255
 Arg Val Leu Thr Glu Glu Pro Asp Asp Pro Asp Trp Ser Trp Leu Lys
 260 265 270
 Trp Leu Pro His Val Gln His Gln Thr Glu Thr Asp Ala Ala Gly Ser
 275 280 285
 Thr Arg Leu Ile Phe Thr Arg Gln Glu Gly Leu Ser Asp Leu Ala Ala
 290 295 300
 Arg Gly Pro His Ala Pro Asp Ser Leu Pro Gly Gly Pro Tyr Val Val
 305 310 315 320
 Val Val Asp Leu Thr Gly Gly Lys Ala Gly Phe Pro Pro Asp Gly Arg
 325 330 335
 Ala Gly Val Thr Val Ile Thr Leu Gly Asn His Arg Gly Ser Ala Tyr
 340 345 350
 Arg Ile Arg Val His Glu Asp Gly Thr Ala Asp Asp Arg Leu Pro Asn
 355 360 365
 Gln Ser Phe Arg Gln Val Thr Ser Val Thr Asp Arg Met Ser Pro Gln
 370 375 380
 Gln Ala Ser Arg Ile Ala Arg Lys Leu Ala Gly Trp Ser Ile Thr Gly
 385 390 395 400
 Thr Ile Leu Asp Lys Thr Ser Arg Val Gln Lys Lys Val Ala Thr Asp
 405 410 415
 Trp His Gln Leu Val Gly Ala Gln Ser Val Glu Glu Ile Thr Pro Ser
 420 425 430
 Arg Trp Arg Met Tyr Thr Asp Thr Asp Arg Asp Arg Leu Lys Ile Pro
 435 440 445

Phe Gly His Glu Leu Lys Thr Gly Asn Val Met Tyr Leu Asp Ile Lys
 450 455 460

Glu Gly Ala Glu Phe Gly Ala Gly Pro His Gly Met Leu Ile Gly Thr
 465 470 475 480

Thr Gly Ser Gly Lys Ser Glu Phe Leu Arg Thr Leu Ile Leu Ser Leu
 485 490 495

Val Ala Met Thr His Pro Asp Gln Val Asn Leu Leu Leu Thr Asp Phe
 500 505 510

Lys Gly Gly Ser Thr Phe Leu Gly Met Glu Lys Leu Pro His Thr Ala
 515 520 525

Ala Val Val Thr Asn Met Ala Glu Glu Ala Glu Leu Val Ser Arg Met
 530 535 540

Gly Glu Val Leu Thr Gly Glu Leu Asp Arg Arg Gln Ser Ile Leu Arg
 545 550 555 560

Gln Ala Gly Met Lys Val Gly Ala Ala Gly Ala Leu Ser Gly Val Ala
 565 570 575

Glu Tyr Glu Lys Tyr Arg Glu Arg Gly Ala Asp Leu Pro Pro Leu Pro
 580 585 590

Thr Leu Phe Val Val Val Asp Glu Phe Ala Glu Leu Leu Gln Ser His
 595 600 605

Pro Asp Phe Ile Gly Leu Phe Asp Arg Ile Cys Arg Val Gly Arg Ser
 610 615 620

Leu Arg Val His Leu Leu Leu Ala Thr Gln Ser Leu Gln Thr Gly Gly
 625 630 635 640

Val Arg Ile Asp Lys Leu Glu Pro Asn Leu Thr Tyr Arg Ile Ala Leu
 645 650 655

Arg Thr Thr Ser Ser His Glu Ser Lys Ala Val Ile Gly Thr Pro Glu
 660 665 670

Ala Gln Tyr Ile Thr Asn Lys Glu Ser Gly Val Gly Phe Leu Arg Val
 675 680 685

Gly Met Glu Asp Pro Val Lys Phe Ser Thr Phe Tyr Ile Ser Gly Pro
 690 695 700

Tyr Met Pro Pro Ala Ala Gly Val Glu Thr Asn Gly Glu Ala Gly Gly

705 710 715 720

Pro Gly Gln Gln Thr Thr Arg Gln Ala Ala Arg Ile His Arg Phe Thr
724 730 735

Ala Ala Pro Val Leu Glu Glu Ala Pro Thr Pro
740 745

<210> 10

<211> 591

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 10

Met Thr Ala Glu Pro Glu Val Arg Thr Leu Arg Glu Val Val Leu Asp
1 5 10 15

Gln Leu Gly Thr Ala Glu Ser Arg Ala Tyr Lys Met Trp Leu Pro Pro
20 25 30

Leu Thr Asn Pro Val Pro Leu Asn Glu Leu Ile Ala Arg Asp Arg Arg
35 40 45

Gln Pro Leu Arg Phe Ala Leu Gly Ile Met Asp Glu Pro Arg Arg His
50 55 60

Leu Gln Asp Val Trp Gly Val Asp Val Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ile
65 70 75 80

Gly Ile Gly Gly Ala Pro Gln Thr Gly Lys Ser Thr Leu Leu Gln Thr
85 90 95

Met Val Met Ser Ala Ala Ala Thr His Ser Pro Arg Asn Val Gln Phe
100 105 110

Tyr Cys Ile Asp Leu Gly Gly Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Glu Asn Leu
115 120 125

Pro His Val Gly Gly Val Ala Asn Arg Ser Glu Pro Asp Lys Val Asn
130 135 140

Arg Val Val Ala Glu Met Gln Ala Val Met Arg Gln Arg Glu Thr Thr
145 150 155 160

Phe Lys Glu His Arg Val Gly Ser Ile Gly Met Tyr Arg Gln Leu Arg
165 170 175

Asp Asp Pro Ser Gln Pro Val Ala Ser Asp Pro Tyr Gly Asp Val Phe
180 185 190

Leu Ile Ile Asp Gly Trp Pro Gly Phe Val Gly Glu Phe Pro Asp Leu
 195 200 205
 Glu Gly Gln Val Gln Asp Leu Ala Ala Gln Gly Leu Ala Phe Gly Val
 210 215 220
 His Val Ile Ile Ser Thr Pro Arg Trp Thr Glu Leu Lys Ser Arg Val
 225 230 235 240
 Arg Asp Tyr Leu Gly Thr Lys Ile Glu Phe Arg Leu Gly Asp Val Asn
 245 250 255
 Glu Thr Gln Ile Asp Arg Ile Thr Arg Glu Ile Pro Ala Asn Arg Pro
 260 265 270
 Gly Arg Ala Val Ser Met Glu Lys His His Leu Met Ile Gly Val Pro
 275 280 285
 Arg Phe Asp Gly Val His Ser Ala Asp Asn Leu Val Glu Ala Ile Thr
 290 295 300
 Ala Gly Val Thr Gln Ile Ala Ser Gln His Thr Glu Gln Ala Pro Pro
 305 310 315 320
 Val Arg Val Leu Pro Glu Arg Ile His Leu His Glu Leu Asp Pro Asn
 325 330 335
 Pro Pro Gly Pro Glu Ser Asp Tyr Arg Thr Arg Trp Glu Ile Pro Ile
 340 345 350
 Gly Leu Arg Glu Thr Asp Leu Thr Pro Ala His Cys His Met His Thr
 355 360 365
 Asn Pro His Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ala Lys Ser Gly Lys Thr Thr
 370 375 380
 Ile Ala His Ala Ile Ala Arg Ala Ile Cys Ala Arg Asn Ser Pro Gln
 385 390 395 400
 Gln Val Arg Phe Met Leu Ala Asp Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Asp Ala
 405 410 415
 Val Pro Asp Thr His Leu Leu Gly Ala Gly Ala Ile Asn Arg Asn Ser
 420 425 430
 Ala Ser Leu Asp Glu Ala Val Gln Ala Leu Ala Val Asn Leu Lys Lys
 435 440 445

Arg Leu Pro Pro Thr Asp Leu Thr Thr Ala Gln Leu Arg Ser Arg Ser
450 455 460

Trp Trp Ser Gly Phe Asp Val Val Leu Leu Val Asp Asp Trp His Met
465 470 475 480

Ile Val Gly Ala Ala Gly Gly Met Pro Pro Met Ala Pro Leu Ala Pro
485 490 495

Leu Leu Pro Ala Ala Ala Asp Ile Gly Leu His Ile Ile Val Thr Cys
500 505 510

Gln Met Ser Gln Ala Tyr Lys Ala Thr Met Asp Lys Phe Val Gly Ala
515 520 525

Ala Phe Gly Ser Gly Ala Pro Thr Met Phe Leu Ser Gly Glu Lys Gln
530 535 540

Glu Phe Pro Ser Ser Glu Phe Lys Val Lys Arg Arg Pro Pro Gly Gln
545 550 555 560

Ala Phe Leu Val Ser Pro Asp Gly Lys Glu Val Ile Gln Ala Pro Tyr
565 570 575

Ile Glu Pro Pro Glu Glu Val Phe Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gly
580 585 590

<210> 11

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11

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

Val Ser Asp Asn Ala Leu His Gly Val Thr Ala Gly Ser Thr Ala Leu
20 25 30

Thr Ser Val Thr Gly Leu Val Pro Ala Gly Ala Asp Glu Val Ser Ala
35 40 45

Gln Ala Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Gly Ile Gln Leu Leu Ala Ser
50 55 60

Asn Ala Ser Ala Gln Asp Gln Leu His Arg Ala Gly Glu Ala Val Gln
65 70 75 80

Asp Val Ala Arg Thr Tyr Ser Gln Ile Asp Asp Gly Ala Ala Gly Val
85 90 95

Phe Ala Glu

<210> 12

<211> 368

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5

<400> 12

```

Met Leu Trp His Ala Met Pro Pro Glu Leu Asn Thr Ala Arg Leu Met
 1              5              10              15

Ala Gly Ala Gly Pro Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ala Gly Trp Gln
 20              25              30

Thr Leu Ser Ala Ala Leu Asp Ala Gln Ala Val Glu Leu Thr Ala Arg
 35              40              45

Leu Asn Ser Leu Gly Glu Ala Trp Thr Gly Gly Gly Ser Asp Lys Ala
 50              55              60

Leu Ala Ala Ala Thr Pro Met Val Val Trp Leu Gln Thr Ala Ser Thr
 65              70              75              80

Gln Ala Lys Thr Arg Ala Met Gln Ala Thr Ala Gln Ala Ala Ala Tyr
 85              90              95

Thr Gln Ala Met Ala Thr Thr Pro Ser Leu Pro Glu Ile Ala Ala Asn
100            105            110

His Ile Thr Gln Ala Val Leu Thr Ala Thr Asn Phe Phe Gly Ile Asn
115            120            125

Thr Ile Pro Ile Ala Leu Thr Glu Met Asp Tyr Phe Ile Arg Met Trp
130            135            140

Asn Gln Ala Ala Leu Ala Met Glu Val Tyr Gln Ala Glu Thr Ala Val
145            150            155            160

Asn Thr Leu Phe Glu Lys Leu Glu Pro Met Ala Ser Ile Leu Asp Pro
165            170            175

Gly Ala Ser Gln Ser Thr Thr Asn Pro Ile Phe Gly Met Pro Ser Pro
180            185            190

Gly Ser Ser Thr Pro Val Gly Gln Leu Pro Pro Ala Ala Thr Gln Thr
195            200            205

```

<210> 13
<211> 666
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 13

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

Pro Ile Ala Ala Gly Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Ala Ala Ser Lys
 85 90 95

Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile Ala Gly Pro Glu Pro Ala Pro Pro
 100 105 110

Lys Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile Ala Gly Pro Glu Pro Ala Pro
 115 120 125

Pro Lys Pro Pro Thr Pro Pro Met Pro Ile Ala Gly Pro Ala Pro Thr
 130 135 140

Pro Thr Glu Ser Gln Leu Ala Pro Pro Arg Pro Pro Thr Pro Gln Thr
 145 150 155 160

Pro Thr Gly Ala Pro Gln Gln Pro Glu Ser Pro Ala Pro His Val Pro
 165 170 175

Ser His Gly Pro His Gln Pro Arg Arg Thr Ala Pro Ala Pro Pro Trp
 180 185 190

Ala Lys Met Pro Ile Gly Glu Pro Pro Pro Ala Pro Ser Arg Pro Ser
 195 200 205

Ala Ser Pro Ala Glu Pro Pro Thr Arg Pro Ala Pro Gln His Ser Arg
 210 215 220

Arg Ala Arg Arg Gly His Arg Tyr Arg Thr Asp Thr Glu Arg Asn Val
 225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Thr Gly Pro Ser Ile Gln Ala Arg Leu Arg Ala Glu
 245 250 255

Glu Ala Ser Gly Ala Gln Leu Ala Pro Gly Thr Glu Pro Ser Pro Ala
 260 265 270

Pro Leu Gly Gln Pro Arg Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Thr Arg Pro Ala
 275 280 285

Pro Thr Glu Pro Pro Pro Ser Pro Ser Pro Gln Arg Asn Ser Gly Arg
 290 295 300

Arg Ala Glu Arg Arg Val His Pro Asp Leu Ala Ala Gln His Ala Ala
 305 310 315 320

Ala Gln Pro Asp Ser Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly Gly Arg Arg Arg
 325 330 335

Lys Arg Ala Ala Pro Asp Leu Asp Ala Thr Gln Lys Ser Leu Arg Pro
 340 345 350
 Ala Ala Lys Gly Pro Lys Val Lys Lys Val Lys Pro Gln Lys Pro Lys
 355 360 365
 Ala Thr Lys Pro Pro Lys Val Val Ser Gln Arg Gly Trp Arg His Trp
 370 375 380
 Val His Ala Leu Thr Arg Ile Asn Leu Gly Leu Ser Pro Asp Glu Lys
 385 390 395 400
 Tyr Glu Leu Asp Leu His Ala Arg Val Arg Arg Asn Pro Arg Gly Ser
 405 410 415
 Tyr Gln Ile Ala Val Val Gly Leu Lys Gly Gly Ala Gly Lys Thr Thr
 420 425 430
 Leu Thr Ala Ala Leu Gly Ser Thr Leu Ala Gln Val Arg Ala Asp Arg
 435 440 445
 Ile Leu Ala Leu Asp Ala Asp Pro Gly Ala Gly Asn Leu Ala Asp Arg
 450 455 460
 Val Gly Arg Gln Ser Gly Ala Thr Ile Ala Asp Val Leu Ala Glu Lys
 465 470 475 480
 Glu Leu Ser His Tyr Asn Asp Ile Arg Ala His Thr Ser Val Asn Ala
 485 490 495
 Val Asn Leu Glu Val Leu Pro Ala Pro Glu Tyr Ser Ser Ala Gln Arg
 500 505 510
 Ala Leu Ser Asp Ala Asp Trp His Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ser Arg
 515 520 525
 Phe Tyr Asn Leu Val Leu Ala Asp Cys Gly Ala Gly Phe Phe Asp Pro
 530 535 540
 Leu Thr Arg Gly Val Leu Ser Thr Val Ser Gly Val Val Val Val Ala
 545 550 555 560
 Ser Val Ser Ile Asp Gly Ala Gln Gln Ala Ser Val Ala Leu Asp Trp
 565 570 575
 Leu Arg Asn Asn Gly Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Arg Ala Cys Val Val
 580 585 590

Ile Asn His Ile Met Pro Gly Glu Pro Asn Val Ala Val Lys Asp Leu
595 600 605

Val Arg His Phe Glu Gln Gln Val Gln Pro Gly Arg Val Val Val Met
610 615 620

Pro Trp Asp Arg His Ile Ala Ala Gly Thr Glu Ile Ser Leu Asp Leu
625 630 635 640

Leu Asp Pro Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu Glu Leu Ala Ala Ala Leu
645 650 655

Ser Asp Asp Phe Glu Arg Ala Gly Arg Arg
660 665

<210> 14

<211> 511

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 14

Leu Ser Ala Pro Ala Val Ala Ala Gly Pro Thr Ala Ala Gly Ala Thr
1 5 10 15

Ala Ala Arg Pro Ala Thr Thr Arg Val Thr Ile Leu Thr Gly Arg Arg
20 25 30

Met Thr Asp Leu Val Leu Pro Ala Ala Val Pro Met Glu Thr Tyr Ile
35 40 45

Asp Asp Thr Val Ala Val Leu Ser Glu Val Leu Glu Asp Thr Pro Ala
50 55 60

Asp Val Leu Gly Gly Phe Asp Phe Thr Ala Gln Gly Val Trp Ala Phe
65 70 75 80

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Pro Leu Lys Leu Asp Gln Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Gly Val Val Asp Gly Ser Leu Leu Thr Leu Val Ser Val Ser Arg
100 105 110

Thr Glu Arg Tyr Arg Pro Leu Val Glu Asp Val Ile Asp Ala Ile Ala
115 120 125

Val Leu Asp Glu Ser Pro Glu Phe Asp Arg Thr Ala Leu Asn Arg Phe
130 135 140

Val Gly Ala Ala Ile Pro Leu Leu Thr Ala Pro Val Ile Gly Met Ala
145 150 155 160

Met Arg Ala Trp Trp Glu Thr Gly Arg Ser Leu Trp Trp Pro Leu Ala
165 170 175

Ile Gly Cile Leu Gly Ile Ala Val Leu Val Gly Ser Phe Val Ala Asn
180 185 190

Arg Phe Tyr Gln Ser Gly His Leu Ala Glu Cys Leu Leu Val Thr Thr
195 200 205

Tyr Leu Leu Ile Ala Thr Ala Ala Ala Leu Ala Val Pro Leu Pro Arg
210 215 220

Gly Val Asn Ser Leu Gly Ala Pro Gln Val Ala Gly Ala Ala Thr Ala
225 230 235 240

Val Leu Phe Leu Thr Leu Met Thr Arg Gly Gly Pro Arg Lys Arg His
245 250 255

Glu Leu Ala Ser Phe Ala Val Ile Thr Ala Ile Ala Val Ile Ala Ala
260 265 270

Ala Ala Ala Phe Gly Tyr Gly Tyr Gln Asp Trp Val Pro Ala Gly Gly
275 280 285

Ile Ala Phe Gly Leu Phe Ile Val Thr Asn Ala Ala Lys Leu Thr Val
290 295 300

Ala Val Ala Arg Ile Ala Leu Pro Pro Ile Pro Val Pro Gly Glu Thr
305 310 315 320

Val Asp Asn Glu Glu Leu Leu Asp Pro Val Ala Thr Pro Glu Ala Thr
325 330 335

Ser Glu Glu Thr Pro Thr Trp Gln Ala Ile Ile Ala Ser Val Pro Ala
340 345 350

Ser Ala Val Arg Leu Thr Glu Arg Ser Lys Leu Ala Lys Glu Leu Leu
355 360 365

Ile Gly Tyr Val Thr Ser Gly Thr Leu Ile Leu Ala Ala Gly Ala Ile
370 375 380

Ala Val Val Val Arg Gly His Phe Phe Val His Ser Leu Val Val Ala
385 390 395 400

Gly Leu Ile Thr Thr Val Cys Gly Phe Arg Ser Arg Leu Tyr Ala Glu
405 410 415

Arg Trp Cys Ala Trp Ala Leu Leu Ala Ala Thr Val Ala Ile Pro Thr
420 425 430

Gly Leu Thr Ala Lys Leu Ile Ile Trp Tyr Pro His Tyr Ala Trp Leu
435 440 445

Leu Leu Ser Val Tyr Leu Thr Val Ala Leu Val Ala Leu Val Val Val
450 455 460

Gly Ser Met Ala His Val Arg Arg Val Ser Pro Val Val Lys Arg Thr
465 470 475 480

Leu Glu Leu Ile Asp Gly Ala Met Ile Ala Ala Ile Ile Pro Met Leu
485 490 495

Leu Trp Ile Thr Gly Val Tyr Asp Thr Val Arg Asn Ile Arg Phe
500 505 510

<210> 15

<211> 280

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 15

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

Ala Lys Leu Ala Gly Leu Val Phe Pro Gln Pro Pro Ala Pro Ile Ala
20 25 30

Val Ser Gly Thr Asp Ser Val Val Ala Ala Ile Asn Glu Thr Met Pro
35 40 45

Ser Ile Glu Ser Leu Val Ser Asp Gly Leu Pro Gly Val Lys Ala Ala
50 55 60

Leu Thr Arg Thr Ala Ser Asn Met Asn Ala Ala Ala Asp Val Tyr Ala
65 70 75 80

Lys Thr Asp Gln Ser Leu Gly Thr Ser Leu Ser Gln Tyr Ala Phe Gly
85 90 95

Ser Ser Gly Glu Gly Leu Ala Gly Val Ala Ser Val Gly Gly Gln Pro
100 105 110

Ser Gln Ala Thr Gln Leu Leu Ser Thr Pro Val Ser Gln Val Thr Thr
115 120 125

Gln Leu Gly Glu Thr Ala Ala Glu Leu Ala Pro Arg Val Val Ala Thr

130 135 140
 Val Pro Gln Leu Val Gln Leu Ala Pro His Ala Val Gln Met Ser Gln
 145 150 155 160
 Asn Ala Ser Pro Ile Ala Gln Thr Ile Ser Gln Thr Ala Gln Gln Ala
 165 170 175
 Ala Gln Ser Ala Gln Gly Gly Ser Gly Pro Met Pro Ala Gln Leu Ala
 180 185 190
 Ser Ala Glu Lys Pro Ala Thr Glu Gln Ala Glu Pro Val His Glu Val
 195 200 205
 Thr Asn Asp Asp Gln Gly Asp Gln Gly Asp Val Gln Pro Ala Glu Val
 210 215 220
 Val Ala Ala Ala Arg Asp Glu Gly Ala Gly Ala Ser Pro Gly Gln Gln
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Gly Val Pro Ala Gln Ala Met Asp Thr Gly Ala Gly Ala
 245 250 255
 Arg Pro Ala Ala Ser Pro Leu Ala Ala Pro Val Asp Pro Ser Thr Pro
 260 265 270
 Ala Pro Ser Thr Thr Thr Thr Leu
 275 280

<210> 16

<211> 729

5

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 16

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

Leu Met Thr Leu Gln Asp Tyr Leu Ala Thr Val Ile Thr Trp His Arg
 85 90 95
 His Ile Ala Gly Leu Ile Glu Gln Ala Lys Ser Asp Ile Gly Asn Asn
 100 105 110
 Val Asp Gly Ala Gln Arg Glu Ile Asp Ile Leu Glu Asn Asp Pro Ser
 115 120 125
 Leu Asp Ala Asp Glu Arg His Thr Ala Ile Asn Ser Leu Val Thr Ala
 130 135 140
 Thr His Gly Ala Asn Val Ser Leu Val Ala Glu Thr Ala Glu Arg Val
 145 150 155 160
 Leu Glu Ser Lys Asn Trp Lys Pro Pro Lys Asn Ala Leu Glu Asp Leu
 165 170 175
 Leu Gln Gln Lys Ser Pro Pro Pro Asp Val Pro Thr Leu Val Val
 180 185 190
 Pro Ser Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro Ile Thr Pro Gly
 195 200 205
 Thr Pro Ile Thr Pro Gly Thr Pro Ile Thr Pro Ile Pro Gly Ala Pro
 210 215 220
 Val Thr Pro Ile Thr Pro Thr Pro Gly Thr Pro Val Thr Pro Val Thr
 225 230 235 240
 Pro Gly Lys Pro Val Thr Pro Val Thr Pro Val Lys Pro Gly Thr Pro
 245 250 255
 Gly Glu Pro Thr Pro Ile Thr Pro Val Thr Pro Pro Val Ala Pro Ala
 260 265 270
 Thr Pro Ala Thr Pro Ala Thr Pro Val Thr Pro Ala Pro Ala Pro His
 275 280 285
 Pro Glu Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Gly Pro Gln Pro Val
 290 295 300
 Thr Pro Ala Thr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Ala Thr Pro Gly Thr Pro
 305 310 315 320
 Gly Gly Glu Pro Ala Pro His Val Lys Pro Ala Ala Leu Ala Glu Gln
 325 330 335

Pro Gly Val Pro Gly Gln His Ala Gly Gly Gly Thr Gln Ser Gly Pro
 340 345 350
 Ala His Ala Asp Glu Ser Ala Ala Ser Val Thr Pro Ala Ala Ala Ser
 355 360 365
 Gly Val Pro Gly Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ser Gly Thr Ala
 370 375 380
 Val Gly Ala Gly Ala Arg Ser Ser Val Gly Thr Ala Ala Ala Ser Gly
 385 390 395 400
 Ala Gly Ser His Ala Ala Thr Gly Arg Ala Pro Val Ala Thr Ser Asp
 405 410 415
 Lys Ala Ala Ala Pro Ser Thr Arg Ala Ala Ser Ala Arg Thr Ala Pro
 420 425 430
 Pro Ala Arg Pro Pro Ser Thr Asp His Ile Asp Lys Pro Asp Arg Ser
 435 440 445
 Glu Ser Ala Asp Asp Gly Thr Pro Val Ser Met Ile Pro Val Ser Ala
 450 455 460
 Ala Arg Ala Ala Arg Asp Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Arg Gln
 465 470 475
 Arg Gly Arg Gly Asp Ala Leu Arg Leu Ala Arg Arg Ile Ala Ala Ala
 480 485 490 495
 Leu Asn Ala Ser Asp Asn Asn Ala Gly Asp Tyr Gly Phe Phe Tyr Ile
 500 505 510
 Thr Ala Val Thr Thr Asp Gly Ser Ile Val Val Ala Asn Ser Tyr Gly
 515 520 525
 Leu Ala Tyr Ile Pro Asp Gly Met Glu Leu Pro Asn Lys Val Tyr Leu
 530 535 540
 Ala Ser Ala Asp His Ala Ile Pro Val Asp Glu Ile Ala Arg Cys Ala
 545 550 555 560
 Thr Tyr Pro Val Leu Ala Val Gln Ala Trp Ala Ala Phe His Asp Met
 565 570 575
 Thr Leu Arg Ala Val Ile Gly Thr Ala Glu Gln Leu Ala Ser Ser Asp
 580 585 590
 Pro Gly Val Ala Lys Ile Val Leu Glu Pro Asp Asp Ile Pro Glu Ser

595 600 605
 Gly Lys Met Thr Gly Arg Ser Arg Leu Glu Val Val Asp Pro Ser Ala
 610 615 620
 Ala Ala Gln Leu Ala Asp Thr Thr Asp Gln Arg Leu Leu Asp Leu Leu
 625 630 635 640
 Pro Pro Ala Pro Val Asp Val Asn Pro Pro Gly Asp Glu Arg His Met
 645 650 655
 Leu Trp Phe Glu Leu Met Lys Pro Met Thr Ser Thr Ala Thr Gly Arg
 660 665 670
 Glu Ala Ala His Leu Arg Ala Phe Arg Ala Tyr Ala Ala His Ser Gln
 675 680 685
 Glu Ile Ala Leu His Gln Ala His Thr Ala Thr Asp Ala Ala Val Gln
 690 695 700
 Arg Val Ala Val Ala Asp Trp Leu Tyr Trp Gln Tyr Val Thr Gly Leu
 705 710 715 720
 Leu Asp Arg Ala Leu Ala Ala Ala Cys
 725

<210> 17

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 17

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

Glu Gln Leu Thr Ala Ala Leu Ser Ala Met Ser Arg Ala Met Asn Glu
100 105 110

Gly Met Ala
115

<210> 18

<211> 460

5

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 18

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

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

Pro Ile Thr Pro Cys Glu Leu Thr Ala Ala Lys Asn Ala Ala Gln Gln
35 40 45

Leu Val Leu Ser Ala Asp Asn Met Arg Glu Tyr Leu Ala Ala Gly Ala
50 55 60

Lys Glu Arg Gln Arg Leu Ala Thr Ser Leu Arg Asn Ala Ala Lys Ala
65 70 75 80

Tyr Gly Glu Val Asp Glu Glu Ala Ala Thr Ala Leu Asp Asn Asp Gly
85 90 95

Glu Gly Thr Val Gln Ala Glu Ser Ala Gly Ala Val Gly Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Ala Glu Leu Thr Asp Thr Pro Arg Val Ala Thr Ala Gly Glu Pro
115 120 125

Asn Phe Met Asp Leu Lys Glu Ala Ala Arg Lys Leu Glu Thr Gly Asp
130 135 140

Gln Gly Ala Ser Leu Ala His Phe Ala Asp Gly Trp Asn Thr Phe Asn
145 150 155 160

Leu Thr Leu Gln Gly Asp Val Lys Arg Phe Arg Gly Phe Asp Asn Trp
165 170 175

Glu Gly Asp Ala Ala Thr Ala Cys Glu Ala Ser Leu Asp Gln Gln Arg
180 185 190

Gln Trp Ile Leu His Met Ala Lys Leu Ser Ala Ala Met Ala Lys Gln

195	200	205
Ala Gln Tyr Val Ala Gln Leu His Val Trp Ala Arg Arg Gln His Pro		
210	215	220
Thr Tyr Glu Asp Ile Val Gly Leu Glu Arg Leu Tyr Ala Gln Asn Pro		
225	230	235
Ser Ala Arg Asp Gln Ile Leu Pro Val Tyr Ala Glu Tyr Gln Gln Arg		
245	250	255
Ser Glu Lys Val Leu Thr Glu Tyr Asn Asn Lys Ala Ala Leu Glu Pro		
260	265	270
Val Asn Pro Pro Lys Pro Pro Pro Ala Ile Lys Ile Asp Pro Pro Pro		
275	280	285
Pro Pro Gln Glu Gln Gly Leu Ile Pro Gly Phe Ile Met Pro Pro Ser		
290	295	300
Asp Gly Ser Gly Val Thr Pro Gly Thr Gly Met Pro Ala Ala Pro Met		
305	310	315
Val Pro Pro Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Leu Pro Ala Asp Thr Ala		
325	330	335
Ala Gln Leu Thr Ser Ala Gly Arg Glu Ala Ala Ala Leu Ser Gly Asp		
340	345	350
Val Ala Val Lys Ala Ala Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val		
355	360	365
Pro Ser Ala Pro Leu Gly Ser Ala Ile Gly Gly Ala Glu Ser Val Arg		
370	375	380
Pro Ala Gly Ala Gly Asp Ile Ala Gly Leu Gly Gln Gly Arg Ala Gly		
385	390	395
Gly Gly Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Met Gly Met Phe Met Gly Ala		
405	410	415
Ala His Gln Gly Gln Gly Gly Ala Lys Ser Lys Gly Ser Gln Gln Glu		
420	425	430
Asp Glu Ala Leu Tyr Thr Glu Asp Arg Ala Trp Thr Glu Ala Val Ile		
435	440	445
Gly Asn Arg Arg Arg Gln Asp Ser Lys Glu Ser Lys		
450	455	460

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 19
 Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 <210> 20
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 20
 Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn
 1 5 10 15
 <210> 21
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 21
 Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 15 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 22
 20 Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 25 <400> 23
 Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 24
 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 25
 Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln
 1 5 10 15
 <210> 26
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 26
 Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr
 1 5 10 15
 15 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 27
 Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu
 1 5 10 15
 20 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 25 <400> 28
 Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 29
 Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 5 <400> 30
 Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn
 1 5 10 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 31
 Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 1 5 10 15
 <210> 32
 <211> 462
 15 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 32

Met Arg Asn Pro Leu Gly Leu Arg Phe Ser Thr Gly His Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Leu Ala Pro Pro Cys Ile Ile Ala Phe Leu Glu Thr Arg
 20 25 30

Tyr Trp Trp Ala Gly Ile Ala Leu Ala Ser Leu Gly Val Ile Val Ala
 35 40 45

Thr Val Thr Phe Tyr Gly Arg Arg Ile Thr Gly Trp Val Ala Ala Val
 50 55 60

Tyr Ala Trp Leu Arg Arg Arg Arg Arg Pro Pro Asp Ser Ser Ser Glu
 65 70 75 80

Pro Val Val Gly Ala Thr Val Lys Pro Gly Asp His Val Ala Val Arg
 85 90 95

Trp Gln Gly Glu Phe Leu Val Ala Val Ile Glu Leu Ile Pro Arg Pro
 100 105 110

Phe Thr Pro Thr Val Ile Val Asp Gly Gln Ala His Thr Asp Asp Met
 115 120 125

Leu Asp Thr Gly Leu Val Glu Glu Leu Leu Ser Val His Cys Pro Asp
 130 135 140

Leu Glu Ala Asp Ile Val Ser Ala Gly Tyr Arg Val Gly Asn Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Pro Asp Val Val Ser Leu Tyr Gln Gln Val Ile Gly Thr Asp Pro
 165 170 175

Ala Pro Ala Asn Arg Arg Thr Trp Ile Val Leu Arg Ala Asp Pro Glu
 180 185 190
 Arg Thr Arg Lys Ser Ala Gln Arg Arg Asp Glu Gly Val Ala Gly Leu
 195 200 205
 Ala Arg Tyr Leu Val Ala Ser Ala Thr Arg Ile Ala Asp Arg Leu Ala
 210 215 220
 Ser His Gly Val Asp Ala Val Cys Gly Arg Ser Phe Asp Asp Tyr Asp
 225 230 235 240
 His Ala Thr Asp Ile Gly Phe Val Arg Glu Lys Trp Ser Met Ile Lys
 245 250 255
 Gly Arg Asp Ala Tyr Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Pro Asp
 260 265 270
 Val Trp Trp Ser Ala Arg Ala Asp His Thr Ile Thr Arg Val Arg Val
 275 280 285
 Ala Pro Gly Met Ala Pro Gln Ser Thr Val Leu Leu Thr Thr Ala Asp
 290 295 300
 Lys Pro Lys Thr Pro Arg Gly Phe Ala Arg Leu Phe Gly Gly Gln Arg
 305 310 315 320
 Pro Ala Leu Gln Gly Gln His Leu Val Ala Asn Arg His Cys Gln Leu
 325 330 335
 Pro Ile Gly Ser Ala Gly Val Leu Val Gly Glu Thr Val Asn Arg Cys
 340 345 350
 Pro Val Tyr Met Pro Phe Asp Asp Val Asp Ile Ala Leu Asn Leu Gly
 355 360 365
 Asp Ala Gln Thr Phe Thr Gln Phe Val Val Arg Ala Ala Ala Ala Gly
 370 375 380
 Ala Met Val Thr Val Gly Pro Gln Phe Glu Glu Phe Ala Arg Leu Ile
 385 390 395 400
 Gly Ala His Ile Gly Gln Glu Val Lys Val Ala Trp Pro Asn Ala Thr
 405 410 415
 Thr Tyr Leu Gly Pro His Pro Gly Ile Asp Arg Val Ile Leu Arg His
 420 425 430
 Asn Val Ile Gly Thr Pro Arg His Arg Gln Leu Pro Ile Arg Arg Val
 435 440 445
 Ser Pro Pro Glu Glu Ser Arg Tyr Gln Met Ala Leu Pro Lys
 450 455 460

<210> 33

<211> 446

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

5

<400> 33

Val His Arg Ile Phe Leu Ile Thr Val Ala Leu Ala Leu Leu Thr Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ala Ser Ala Ile Thr Pro Pro Pro Ile Asp Pro Gly Ala Leu
20 25 30

Pro Pro Asp Val Thr Gly Pro Asp Gln Pro Thr Glu Gln Arg Val Leu
35 40 45

Cys Ala Ser Pro Thr Thr Leu Pro Gly Ser Gly Phe His Asp Pro Pro
50 55 60

Tyr Ser Asn Thr Tyr Leu Gly Val Ala Asp Ala His Lys Phe Ala Thr
65 70 75 80

Gly Ala Gly Val Thr Val Ala Val Ile Asp Thr Gly Val Asp Ala Ser
85 90 95

Pro Arg Val Pro Ala Glu Pro Gly Gly Asp Phe Val Asp Gln Ala Gly
100 105 110

Asn Gly Leu Ser Asp Cys Asp Ala His Gly Thr Leu Thr Ala Ser Ile
115 120 125

Ile Ala Gly Arg Pro Ala Pro Thr Asp Gly Phe Val Gly Val Ala Pro
130 135 140

Asp Ala Arg Leu Leu Ser Leu Arg Gln Thr Ser Glu Ala Phe Glu Pro
145 150 155 160

Val Gly Ser Gln Ala Asn Pro Asn Asp Pro Asn Ala Thr Pro Ala Ala
165 170 175

Gly Ser Ile Arg Ser Leu Ala Arg Ala Val Val His Ala Ala Asn Leu
180 185 190

Gly Val Gly Val Ile Asn Ile Ser Glu Ala Ala Cys Tyr Lys Val Ser
195 200 205

Arg Pro Ile Asp Glu Thr Ser Leu Gly Ala Ser Ile Asp Tyr Ala Val
 210 215 220
 Asn Val Lys Gly Val Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Thr Gly Gly
 225 230 235 240
 Asp Cys Val Gln Asn Pro Ala Pro Asp Pro Ser Thr Pro Gly Asp Pro
 245 250 255
 Arg Gly Trp Asn Asn Val Gln Thr Val Val Thr Pro Ala Trp Tyr Ala
 260 265 270
 Pro Leu Val Leu Ser Val Gly Gly Ile Gly Gln Thr Gly Met Pro Ser
 275 280 285
 Ser Phe Ser Met His Gly Pro Trp Val Asp Val Ala Ala Pro Ala Glu
 290 295 300
 Asn Ile Val Ala Leu Gly Asp Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Leu Gln
 305 310 315 320
 Gly Arg Glu Gly Pro Val Pro Ile Ala Gly Thr Ser Phe Ala Ala Ala
 325 330 335
 Tyr Val Ser Gly Leu Ala Ala Leu Leu Arg Gln Arg Phe Pro Asp Leu
 340 345 350
 Thr Pro Ala Gln Ile Ile His Arg Ile Thr Ala Thr Ala Arg His Pro
 355 360 365
 Gly Gly Gly Val Asp Asp Leu Val Gly Ala Gly Val Ile Asp Ala Val
 370 375 380
 Ala Ala Leu Thr Trp Asp Ile Pro Pro Gly Pro Ala Ser Ala Pro Tyr
 385 390 395 400
 Asn Val Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Val Glu Pro Gly Pro Asp Arg
 405 410 415
 Arg Pro Ile Thr Ala Val Ala Leu Val Ala Val Gly Leu Thr Leu Ala
 420 425 430
 Leu Gly Leu Gly Ala Leu Ala Arg Arg Ala Leu Ser Arg Arg
 435 440 445

<210> 34

<211> 103

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 34

Met Thr Gly Phe Leu Gly Val Val Pro Ser Phe Leu Lys Val Leu Ala
 1 5 10 15

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

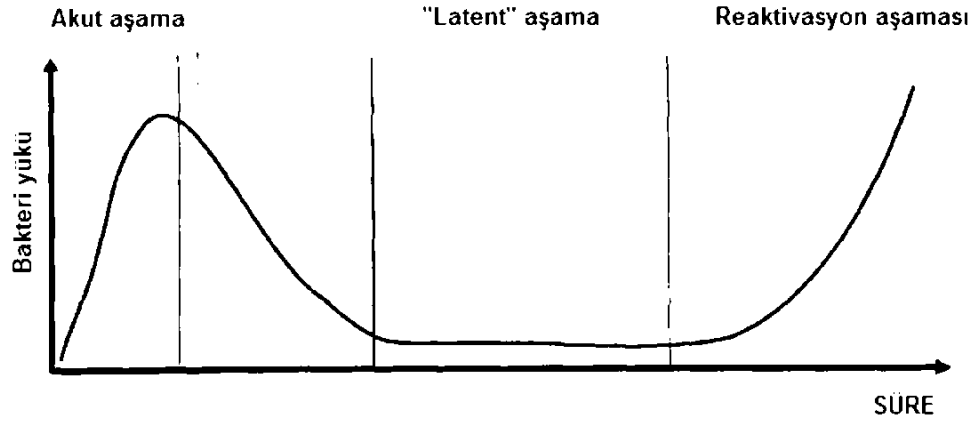
Val Ala Gly Ile Ser Gly Arg Val Gln Leu Thr His Gly Ser Phe Thr
 35 40 45

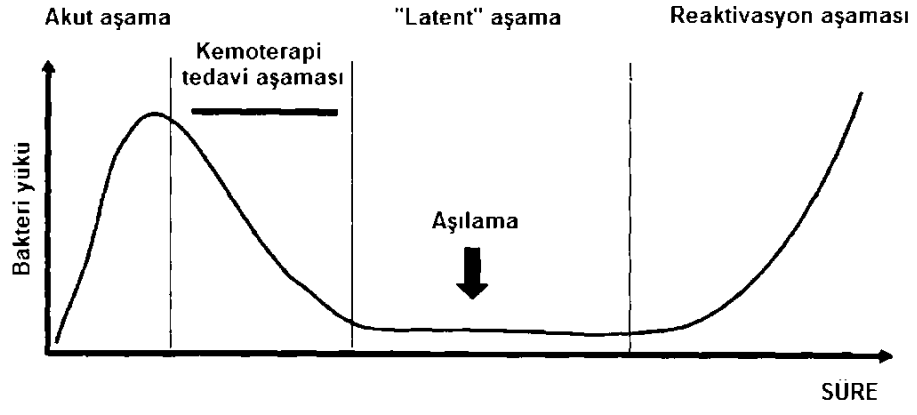
Ser Lys Phe Asn Asp Thr Leu Gln Glu Phe Glu Thr Thr Arg Ser Ser
 50 55 60

Thr Gly Thr Gly Leu Gln Gly Val Thr Ser Gly Leu Ala Asn Asn Leu
 65 70 75 80

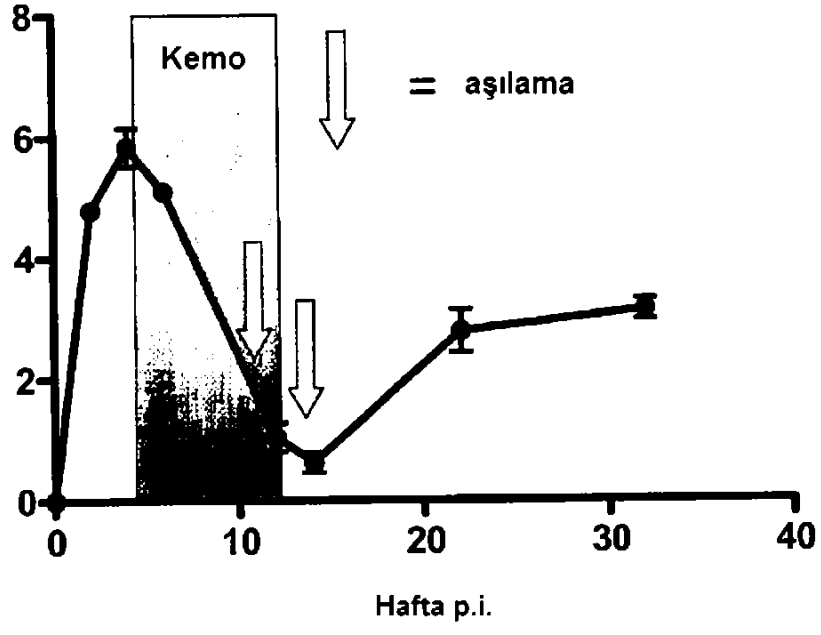
Leu Ala Ala Ala Gly Ala Tyr Leu Lys Ala Asp Asp Gly Leu Ala Gly
 85 90 95

Val Ile Asp Lys Ile Phe Gly
 100

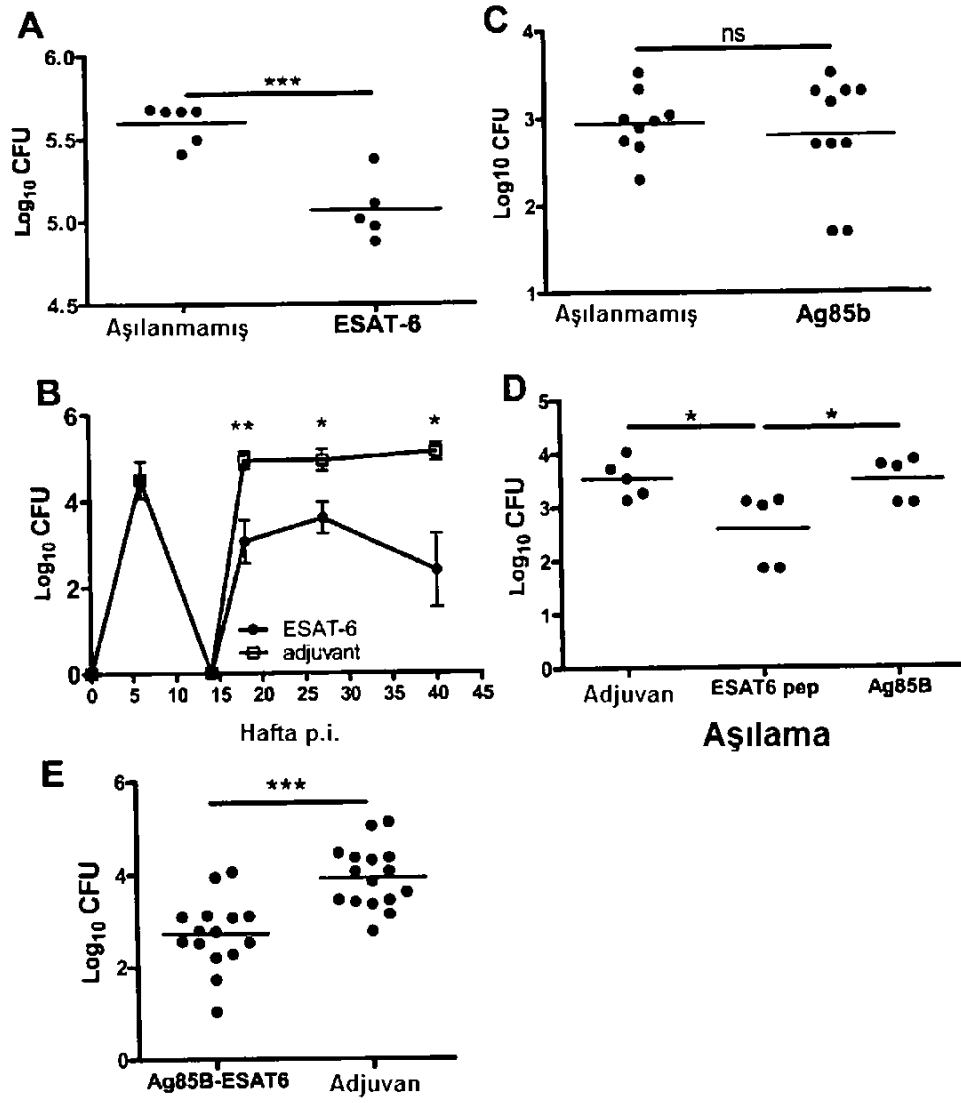
**Şekil 1**



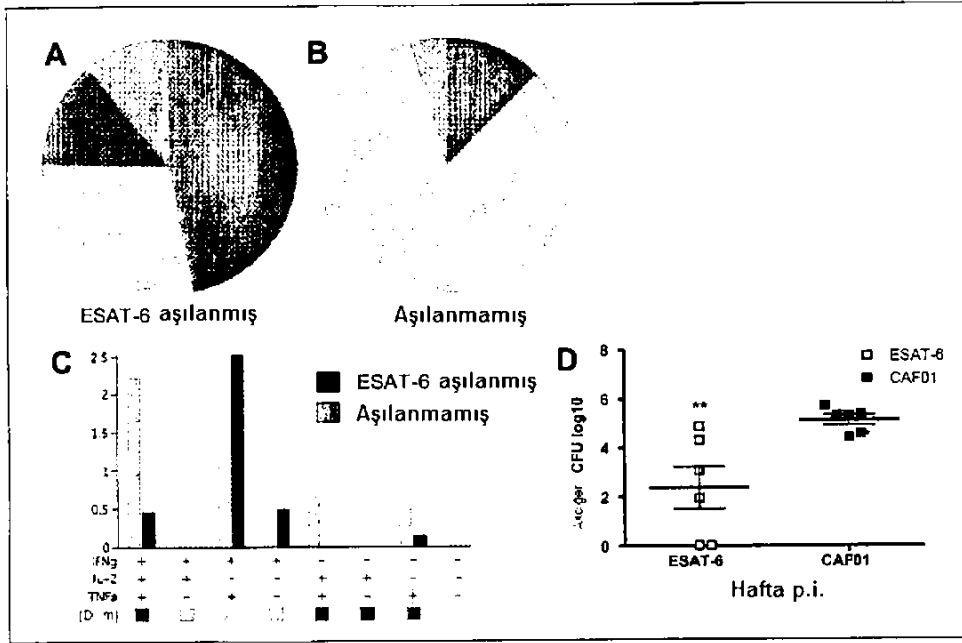
Şekil 2



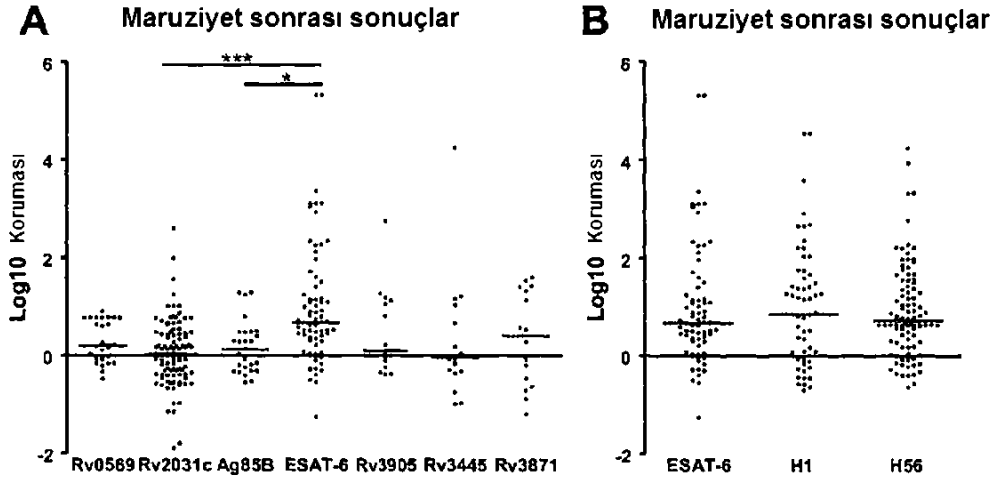
Şekil 3



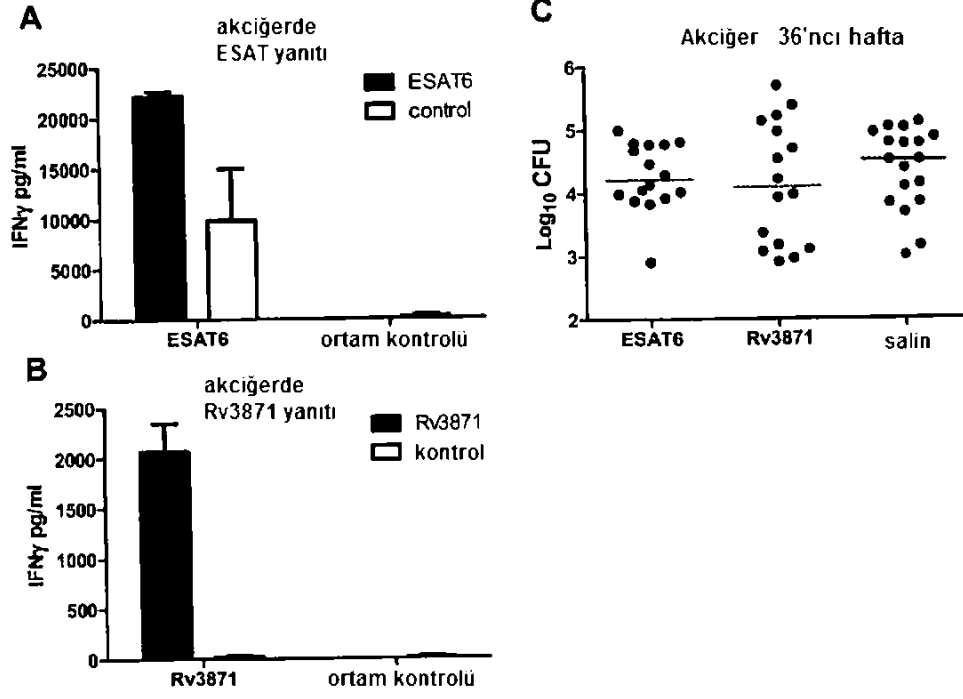
Şekil 4



Şekil 5



Şekil 6



Şekil 7