PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2000 - 2321

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:

C 12 N 15/31	A 61 P 11/00
C 12 N 15/62	A 61 P 17/00
C 07 K 14/35	A 61 P 35/00
C 07 K 19/00	A 61 P 37/00
C 07 K 16/12	
A 61 K 39/04	
A 61 K 48/00	
G 01 N 33/68	

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.12.1997 23.12.1997 23.12.1997 11.06.1998 17.09.1998 04.12.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/997362 1997/997080 1997/996624 1998/095855 1998/156181 1998/205426**

(33) Země priority: **US US US US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.02.2001 (Věstník č. 2/2001)**

(86) PCT číslo: **PCT/NZ98/00189**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/32634**

(71) Přihlašovatel:
GENESIS RESEARCH & DEVELOPMENT CORPORATION LIMITED, AUCKLAND, NZ;

(72) Původce:
Tan Paul, Auckland, NZ;
Watson James, Auckland, NZ;
Visser Elizabeth S., Auckland, NZ;
Skinner Margot A., Auckland, NZ;
Prestidge Ross L., Auckland, NZ;

(74) Zástupce:
Smola Josef Ing., Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Kompozice získané z Mycobacterium vaccae a způsoby jejich použití

(57) Anotace:

Řešení se týká kompozic, které jsou přítomny v Mycobacterium vaccae nebo z něho mohou být odvozeny, a způsobů jejich použití v léčbě, prevenci a diagnostiky nemocí, včetně infekčních nemocí, poruch imunity a rakoviny. dále se týká způsobů posílení imunitní odpovědi na antigen, zahrnujících podávání kultivačního filtrátu M. vaccae, buněk M. vaccae zbavených lipidů nebo buněk M. vaccae zbavených lipidů a glykolipidů.

CZ 2000 - 2321 A3

08.11.00
PV2000-2321

Kompozice získané z *Mycobacterium vaccae* a způsoby jejich použití

7986

Oblast techniky

Vynález se týká kompozic, které mohou být získány z *Mycobacterium vaccae* nebo které jsou v něm přítomny a jejich použití v léčbě, prevenci a detekci poruch včetně infekčních poruch, poruch imunity a rakoviny. Konkrétně se vynález týká sloučenin a způsobů léčby nemocí dýchací soustavy, například mykobakteriální infekce, astma, benigní lymfogranulom a rakovina plic a poruch kůže, například lupénka, atopická dermatóza, alergická kontaktní dermatitida, alopecia areata, karcinom základních a dlaždicových kožních buněk a melanom. Vynález je dále zaměřen na sloučeniny, které slouží jako zesilovače nespecifické imunitní odpovědi organismu, a na jejich použití jako látek, posilujících účinek antigenu ve vakcinaci nebo imunoterapii proti infekčním chorobám a v určitých léčebných postupech při léčení poruch imunity a rakoviny.

Dosavadní stav techniky

Tuberkulóza je chronická, infekční nemoc, která je způsobena infekcí bakterií *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)*. Tato nemoc je závažným problémem v rozvojových zemích a stejně tak je vzrůstajícím problémem v rozvojových oblastech celého světa. Dochází k 8 milionům nových případů a 3 milionům úmrtí ročně. Ačkoli může infekce po značnou dobu probíhat bez příznaků, nemoc se většinou projevuje jako chronický zánět plic, jehož důsledkem je horečka a dýchací problémy. Pokud není nemoc léčena, může končit úmrtím.

Ačkoliv může být průběh tuberkulózy významně ovlivněn použitím rozšířené léčby antibiotiky, nepostačuje tato léčba pro prevenci šíření nemoci. Infikovaní jedinci mohou být bez příznaků, ale jsou po nějakou dobu nakažliví. A nadto je obtížné sledovat pacientovo chování i v případě, že je přísně dodržován léčebný režim. Někteří pacienti nedokončí léčbu, což mohou vést k neefektivní léčbě a ke vzniku rezistence mykobakteria na léčivo.

Zastavení šíření tuberkulózy vyžaduje účinnou vakcinaci a přesné a včasné diagnostikování nemoci. V současné době je nejúčinnější metodou pro vytvoření ochranné imunity vakcinace subkutaneální nebo intradermální injekcí s živou bakterií. Nejobvyklejší mykobakterium používané za tímto účelem je Bacillus Calmette-Guerin (BCG), avirulentní kmen *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*).

Bezpečnost a účinnost BCG je však zdrojem polemiky a některé státy, například Spojené Státy nepodrobují vakcinaci širokou veřejnost. Infekce *M. tuberculosis* je obvykle diagnostikována pomocí kožního testu, který zahrnuje intradermální působení tuberculinu PPD (protein-purified derivative). Pro antigen specifická odpověď T buněk způsobí měřitelné tvrdnutí místa vpichu injekce po 48 až 72 hodinách po injekci, čímž se prokáže působení mykobakteriálních antigenů. Citlivost a přesnost tohoto testu je však problematická a osoby vakcinované BCG nemohou být odlišeny od infikovaných osob.

Méně známé mykobakterium, které bylo použito pro imunoterapii proti tuberkulóze a také malomocenství podkožní nebo intradermální injekcí je *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*) , které není patogenní pro člověka. Existuje však méně informací o účinnosti *M. vaccae* ve srovnání s BCG a *M. vaccae* nebylo dosud široce používáno pro vakcinaci široké veřejnosti. *M. bovis* BCG a *M. vaccae* jsou známy tím, že obsahují antigenní sloučeniny, které jsou rozeznávány imunitním systémem jednotlivce, který byl vystaven injekci *M. tuberculosis.*

Některé patenty a jiné publikace popisují léčbu různých stavů podáváním mykobakteria, včetně *M. vaccae* nebo určitých mykobakteriálních frakcí. U.S. patent 4,716,038 popisuje diagnostikování různých typů autoimunních nemocí včetně artritických nemocí, vakcinaci proti nim a jejich léčbu podáváním mykobakteria, včetně *M. vaccae.*

U.S. patent 4,724,144 popisuje imunoterapeutické činidlo obsahující antigenní materiál, pocházející z *M. vaccae,* vhodný pro léčbu mykobakteriálních nemocí, zejména tuberkulózy a malomocenství a jako látka zvyšující účinek antigenu při chemoterapii. Mezinárodní přihláška vynálezu WO 91/01751 popisuje použití antigenního a/nebo imunoregulačního materiálu pocházejícího z *M. vaccae* jako imunoprofylaxe ke zpomalení a/nebo zastavení onemocnění AIDS. Mezinárodní přihláška vynálezu WO 94/06466 popisuje použití antigenního a/nebo imunoregulačního materiálu získaného z *M. vaccae* pro terapii na infekci HIV s nebo bez AIDS a s nebo bez tuberkulózy.

U.S. patent 5,599,545 popisuje použití mykobakteria, zejména úplného, deaktivovaného *M. vaccae*, jako látky zvyšující účinek antigenu pro podávání s antigeny, které nejsou endogenní k *M. vaccae.* V této publikaci se uvažuje o tom, že dobrý účinek této látky zvyšující účinek antigenu může být způsoben proteinem tepelného šoku 65 (heat shock protein 65 (hsp 65)). Mezinárodní přihláška vynálezu číslo WO 92/08484 popisuje použití antigenního a/nebo imunoregulačního materiálu získaného z *M. vaccae* k léčbě uveitidy. Mezinárodní přihláška vynálezu číslo WO 93/16727 popisuje použití antigenního a/nebo imunoregulačního materiálu získaného z *M. vaccae* pro léčbu mentálních nemocí souvisejících s autoimunitní reakcí, kterou vyvolává infekce. Mezinárodní přihláška vynálezu číslo WO 95/26742 popisuje použití

antigenního a/nebo imunoregulačního materiálu získaného z *M. vaccae* pro zpomalení nebo zastavení růstu nebo šíření tumorů. Mezinárodní přihláška vynálezu číslo WO 91/02542 popisuje použití autoklávovaného *M. vaccae* v léčbě chronických zánětlivých poruch, při kterých se u pacienta projevuje abnormálně vysoké uvolňování IL-6 a/nebo TNF nebo při nichž vykazuje IgG pacienta abnormálně vysoké hodnoty agalaktosyl IgG. Mezi poruchami zmiňovanými v této publikaci je lupénka, revmatická artritida, mykobakteriální nemoc, Crohnsova nemoc, primární žlučová cirhóza, benigní lymfogranulom, vředová kolitida, systemický lupus erythematosus, skleróza multiplex, Guillain-Barrův syndrom, primární diabetes mellitus, a některé aspekty odmítnutí transplantátu.

M. vaccae je zřejmě ojedinělé mezi známými mykobakteriálními druhy tím, že ani po tepelné přípravě vakcíny, kdy dochází k usmrcování bakterií, neztrácí vakcína své imunoterapeutické vlastnosti. Například *M. tuberculosis* BCG vakcíny, užívané k očkování proti tuberkulóze, využívají živé kmeny. Teplem usmrcené *M. bovis* BCG a *M. tuberculosis* nemají při použití ve vakcíně ochranné účinky. Mnoho sloučenin, které mají vlastnosti látky zvyšující účinek antigenu bylo izolováno z řady mykobakteriálních druhů. Účinek takových látek zvyšujících účinek antigenu spočívá zejména ve stimulaci částečné odpovědi imunitního mechanismu proti antigenu, který pochází z jiného druhu.

Existují dvě hlavní třídy sloučenin, které byly izolovány z mykobakteriálních druhů, které vykazují vlastnosti látek zvyšujících účinek antigenu. První jsou ve vodě rozpustné voskové D frakce (R.G. White, I. Bernstock, R.G.S. Johns a E. Lederer, Immunology, 1:54, 1958; US patent 4,036,953). Ve druhé skupině jsou na muramyl-dipeptidu založené látky (N-acetyl glukosamin a N-glykolymuramová kyselina v přibližně ekvimolárních množstvích), což bylo popsáno v U.S. patentech 3,956,481 a 4,036,953. Tyto sloučeniny se liší od *M. vaccae* (DD-*M. vaccae*) zbaveného lipidů a glykolipidů v následujících aspektech jejich kompozice:

1. Jsou to ve vodě rozpustná činidla, zatímco DD-*M. vaccae* je nerozpustné ve vodném roztoku.
2. Jsou složeny z řady malých oligomerů buněčné stěny mykobakteriální buňky, které jsou buď extrahovány z bakterie pomocí různých rozpouštědel nebo získány z buněčné stěny pomocí enzymů. Na rozdíl od DD-*M. vaccae*, které obsahuje vysoce polymerizovanou buněčnou stěnu.
3. Z jejich přípravy byly odstraněny všechny proteiny digescí s proteolytickými enzymy. Jedině složky jejich přípravy jsou části peptidoglykanové struktury buněčné stěny, kontrétně alanin, kyselina glutamová, kyselina diaminopimelová, N-acetylglukosamin a kyselina N-glykolylmuramová. Naproti tomu DD-*M.*

vaccae obsahuje 50% hmotnostních proteinů, které zahrnují mnoho různých druhů proteinů.

Podávání vakcín ve formě nosních aerosolů k ošetření plicní tkáně nebo orální cestou do trávicího traktu bylo obvykle omezeno na oslabené kmeny virů. Například při vakcinaci proti polioviru byly používány oslabené kmeny tohoto viru podávaná orálně až do doby, kdy byla vyvinuta Sabin vakcína. Aviron Incorporated and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases v USA v poslední době oznámil úspěšné použití vakcíny proti chřipce podávané v nosním spreji. V tomto případě poskytl živý oslabený kmen viru chřipky 93 % ochranu dětí proti chřipce. Vakcíny sestávající z usmrcených virů nebo bakterií nebo rekombinantních proteinů nebyly podávány ve formě nosního aerosolu nebo orálně. Je pro to několik důvodů. Je známo málo úspěšných imunizací způsobujících imunitu T-buněk nebo syntézu protilátek, které by užívaly tato činidla podávaná nasálně. Mimoto orální podávání proteinů a mrtvých organismů často způsobuje vznik tolerance, která je přesným opakem toho, co se očekává od úspěšné imunizace

Benigní lymfogranulom je nemoc neznámého původu charakterizovaná granulomatózním zánětem, který postihuje mnoho tělních orgánů, zejména plíce, lymfatické uzliny a játra. Sarkoidní granulomata jsou tvořena jednojadernými fagocyty s epitelovými a obrovskými buňkami ve středu a T-lymfocyty. CD4 T-lymfocyty jsou úzce spojeny s epitelovými buňkami zatímco jak CD4, tak CD8 T-lymfocyty se shromažďují na okraji.

Charakteristické imunologické poruchy v benigním lymfogranulomu zahrnují periferní krev a bronchoalveolární výplach hyper-globulinanemii a snížení zpožděného typu přecitlivělosti v kůži k tuberkulinu a dalším podobným antigenům, například *Candida* a příušnice.

Množství lymfocytů v periferní krvi jsou snížena a poměry CD4 : CD8 v periferní krvi jsou sníženy na přibližně 1 : 1 až 1,5 : 1. Toto nejsou projevy celkové imunitní poruchy, ale spíše následky zvýšené imunologické aktivity, která je rozdělena do míst působení nemoci. U pacientů s plicním benigním lymfogranulomem je celkové množství buněk obnovených bronchoalveolárním výplachem pětkrát až desetkrát vyšší a podíl lymfocytů vzrůstá z normální hladiny (méně než 10 až 14 %) na hodnoty mezi 15 % a 50 %. Více než 90 % obnovených lymfocytů jsou T lymfocyty a uvádí se, že poměr CD4 : CD8 vzrostl z hodnoty 1,8 : 1 v normální kontrole na 10,5 : 1. T-lymfocyty jsou převážně třídy Th1, tvořící IFN-γ a IL-2 cytokiny, spíše než ze třídy Th2. Následná léčba upravuje vzrůst množství Th1 lymfocytů v sarkoidních plicích.

Benigní lymfogranulom postihuje plíce téměř ve všech případech. Dokonce i v případech, kdy jsou poruchy pozorovány především v jiných orgánech se obvykle vyskytují i neklinické plicní obtíže. Zatímco některé případy benigního lymfogranulomu odezní spontánně, přibližně 50 % pacientů má alespoň střední stupeň trvalé orgánové dysfunkce. V některých případech vznikne plicní fibróza a rozvine se v plicní selhání vyžadující transplantaci plic. Základem léčby benigního lymfogranulomu jsou kortikosteroidy. Pacienti zpočátku odpovídají na kortikosteroidy častou recidivou a vyžadují léčbu dalšími imunosupresivními léčivy například metotrexátem nebo cyklosporinem.

Astma je a obvyklá nemoc, jejíž výskyt převládá ve vyspělých zemích. Typické příznaky astmatu jsou: zvýšená citlivost tracheobronchiálních cest k různým podnětům, primární fyziologická porucha proudění vzduchu v obou směrech, která může být spontánní nebo vyvolaná léčivy a typický patologický znak - zánět dýchacích cest. Klinicky může být astma rozděleno na vnější a vnitřní variantu.

Vnější astma má identifikovatelný původ a může být atopické, související s povoláním a nebo vyvolané léčivy. Atopické astma je typické zvýšením imunitní odpovědi typu Th2 s tvorbou specifických imunoglobulinů E (IgE), pozitivními kožními testy na obvyklé aeroalergeny a/nebo atopickými příznaky. Může být dále rozděleno na sezónní a trvalé formy podle sezónního načasování symptomů. Zhoršené proudění vzduchu u vnějšího astmatu je způsobeno nespecifickou bronchiální přecitlivělostí, která je způsobena zánětem dýchacích cest. Tato infekce je přenášena chemikáliemi, které jsou uvolňovány různými zánětlivými buňkami včetně žírných buněk, eozinofilů a lymfocytů. Působení těchto mediátorů způsobuje propustnost cév, sekreci hlenu a kontrakci bronchiálních hladkých svalů. U atopického astmatu je imunitní odpověď vytvářející zánět dýchacích cest způsobena třídou Th2 T buněk, které vyměšují IL-4, IL-5 a IL-10. Ukázalo se, že lymfocyty z plic postižených atopickým astmatem tvoří, jsou-li aktivovány, IL-4 a IL-5. Jak IL-4 tak IL-5 jsou cytokiny třídy Th2 a jsou zapotřebí pro tvorbu IgE a zapojení eozinofilů při astmatu. Astma týkající se povolání může souviset s rozvojem IgE vůči protein haptenu, například kyselé anhydridy u lidí pracujících s plastickými hmotami a vyvolané astma plicatic kyselinou některých západních červených jalovců, nebo s mechanismy bez IgE, jak lze například pozorovat u astmatu způsobeného toluendiizokyanátem. Astma způsobené léčivy může být pozorováno po podání aspirinu nebo jiných nesteroidních protizánětlivých léčiv, častěji u skupiny pacientů, u kterých se mohou projevovat další příznaky, jako například nosní polypy a zánět dutin. Uvádí se, že vnitřní nebo kryptogenní astma vzniká po infekcích horních cest dýchacích, ale může vzniknout *de novo* u lidí středního věku nebo starších, u kterých je léčba tohoto typu astmatu obtížnější než léčba vnějšího astmatu.

06.11.00

Nejlepší prevence proti astmatu je vyhnout se spouštěcím alergenům, ale to není vždy možné už proto, že alergeny nejsou vždy jednoduše identifikovatelné. Léčebná terapie astmatu je založena na použití kortikosteroidů a léčiv rozšiřujících průdušky, které zmírňují zánět a následné dýchací obtíže. U chronického astmatu vede léčba kortikosteroidy k nepřijatelným nepříznivým vedlejším účinkům.

Dalším onemocněním s podobnou imunitní poruchou jako u astmatu je alergická rinitida. Alergická rinitida je obvyklé onemocnění a odhaduje se, že postihuje alespoň 10 % populace. Alergická rinitida může být sezónní (senná rýma) způsobená pylovými alergeny. Nesezónní nebo trvalá rinitida je způsobena alergií na antigeny, jako jsou například roztoči v prachu v domácnosti nebo na domácích zvířatech.

Abnormální imunitní odpověď u alergické rinitidy je charakteristická vzrůstem tvorby IgE protilátek specifických proti alergenu. Zánětlivá odpověď se vyskytuje v nosním hlenu spíše než v dolních cestách dýchacích jako u astmatu. Stejně jako u astmatu je lokální eosinofilie v postižených tkáních hlavním rysem alergické rinitidy. Tato infekce způsobuje u pacientů kýchání, rýmu a ucpání nosu. V závažnějších případech se infekce rozšíří do očí (zánět spojivek), na patro a do vnějšího ucha. Ačkoli neohrožuje život, může být alergická rinitida velmi nepříjemná, omezuje pacienta v běžném životě a snižuje schopnost pracovat. Současná léčba zahrnuje použití antihistaminů, nosních látek snižujících překrvení a jako u astmatu, cromoglykát sodný a kortikosteroidy.

Nejvíce úmrtí na rakovinu je způsobeno rakovinou plic. Výskyt rakoviny plic stále vzrůstá a World Health Organisation odhaduje, že do roku 2000 bude 2 miliony nových případů ročně. Rakovina plic může být obecně rozdělena do dvou kategorií: rakovina malých buněk plic (SCLC), která představuje 20 - 25% všech případů rakoviny plic a rakovina ne-malých buněk plic (NSCLC), která zahrnuje zbývajících 75 %. Většina případů SCLC je způsobena tabákovým kouřem. SCLC má tendenci se šířit na samém začátku a 90 % pacientů s touto diagnózou má mediastinální lymfatické uzliny v hrudníku. SCLC se léčí chemoterapií nebo kombinací chemoterapie a radioterapie. Poměr celkové odpovědi kolísá mezi 10 % a 50 %. V ojedinělých případech, je-li pacient bez lymfatických uzlin, může mít chirurgický zákrok doplněný následnou chemoterapií neobyčejně vysoký výsledný poměr vyléčených 60 %. Prognóza pro NSCLC je horší, protože většina pacientů má již pokročilé stadium nemoci v době, kdy je jim nemoc poprvé diagnostikována. Chirurgické odstranění tumoru je možné jen u velmi malého množství pacientů a pětileté průměrné přežití pro NSCLC je pouze 5 - 10 %.

Příčiny vzniku rakoviny plic jsou komplexní a rozmanité. Společné působení faktorů prostředí a genetických faktorů způsobuje postupné a narůstající poruchy, které vedou k nekontrolované proliferaci buněk, napadení přilehlé tkáně a šíření do odlehlejších oblastí.

Ukázalo se, že pacienti s rakovinou plic mají sníženou jak buněčnou tak humorální imunitu. Radioterapie a chemoterapie dále snižují imunitu pacientů. Byly provedeny pokusy zvýšit imunitu pacientů deaktivovanými nádorovými buňkami nebo nádorovými antigeny, což by vedlo ke zvýšení odpovědi hostitelského organismu na tumor. Do hrudní dutiny byl po chirurgickém zásahu podán Bacillus Calmette-Guerin (BCG) pro zvýšení nespecifické imunity. Byly prováděny pokusy zvýšit imunitní reakci proti tumoru podáváním lymfocytů ošetřených *ex vivo* interleukinem-2. Tyto lymfokinem aktivované lymfocyty získávají schopnost ničit buňky tumoru. Imunoterapie pro léčbu rakoviny plic jsou v současnosti ve stadiu vývoje a jejich účinnost musí být ještě potvrzena než dojde k jejich běžnému používání k léčbě rakoviny plic.

Vynález se také zabývá léčbou nemocí kůže, které pravděpodobně souvisejí s faktory, které mají vliv na rovnováhu imunitních buněk tvořených brzlíkem (T), které jsou známy jako Th1 a Th2. Tyto T buňky jsou určeny svým fenotypem sekrece cytokinu. Obvyklým způsobem léčby je použití sloučeniny připravené z *M. vaccae*, která má imunomodulační vlastnosti, které mění rovnováhu účinností těchto T buněk stejně jako dalších imunitních buněk.

Lupénka je rozšířené chronické zánětlivé onemocnění kůže, které může u malého množství pacientů souviset s různými formami artritidy. Tato porucha se projevuje příliš rychlým růstem keratinocytů a odlupováním šupinek z povrchu kůže. Medikamentózní léčba je zaměřena na zpomalení tohoto procesu. Nemoc se může projevit v jakémkoli věku. Spontánní remise je poměrně ojedinělá a je tedy nezbytná celoživotní léčba. Lupénka způsobuje chronické odlupující se červené skvrny na povrchu kůže. Lupénka je velmi dobře pozorovatelná nemoc, často postihuje obličej, vlasovou část hlavy, trup a končetiny. Nemoc psychicky a fyzicky oslabuje pacienta, snižuje významně kvalitu života. Ve Spojených Státech trpí lupenkou jeden až tři miliony lidí a každý rok se objevuje čtvrt milionu nových případů. Umírněné odhady uvádějí, že se ve Spojených Státech v současné době vydá na léčbu lupenky ročně $248.

Existují dvě hlavní hypotézy týkající se patogeneze lupenky. První předpokládá, že genetické faktory určují abnormální proliferaci epidermálních keratinocytů. Buňky pak již neodpovídají normálně na vnější podněty, například ty, které jsou potřebné pro udržení epidermální homeostázy. Abnormální zvýšení odpovědi cytokinů buněčné membrány nebo abnormální transmembránová signální transdukce (přenos signálů mezi membránami) mohou být důvodem zvýšené buněčné proliferace. Zánět související s lupénkou je způsoben uvolňováním pro-zánětlivých molekul z nadměrně proliferujících keratinocytů.

Druhá hypotéza uvádí, že T buňky vylučují při reakci s buňkami rozpoznávajícími antigen v kůži pro-zánětlivé a keratinocyty stimulující cytokiny. (Hancock, G.E. a kol., *J. Exp. Med. 168* : 1395 - 1402, 1988). Pouze T buňky geneticky předurčených jedinců mají kapacitu na to, aby byly aktivovány za takových podmínek. Samotné keratinocyty mohou být buňkami rozpoznávajícími antigen. Buněčná infiltrace v lupenkou postižených místech ukazuje přítok CD4+ T buněk, častěji CD8+ T buněk (Bos, J.D. a kol.., *Arch. Dermatol. Res. 281* : 23 - 3, 1989; Baker, B.S., *Br. J. Dermatol. 110* : 555 -564, 1984).

Protože většina (90 %) pacientů s lupénkou má omezenou formu této nemoci, může být použita lokální léčba, která zahrnuje ditranol, dehtové přípravky, kortikosteroidy a v poslední době uváděné analogy vitaminu D3 (kalcipotriol, kalcitriol). Menší množství (10 %) pacientů má vážnější formu nemoci, pro jejíž léčbu jsou vhodné mnohé systémové terapeutické metody. Typické systémové terapie zahrnují UVB, PUVA, metotrexát, deriváty vitamínu A (acitretin) a imuno-supresanty, například cyklosporin A.. Účinnost cyklosporinu a FK-506 pro léčbu lupenky podporuje hypotézu, že T buňky jsou prvotní příčinou nemoci (Bos, J.D. a kol., *Lancet II*: 1500 - 1502, 1989; Ackerman, C. a kol., *J. Invest. Dermatol. 96*: 536 [abstrakta], 1991).

Atopická dermatitida je chronické onemocnění kůže způsobující svědění, které se obvykle vyskytuje v rodinách s dědičnou dispozicí k různým formám alergických onemocnění, jako je například alergická rinitida a astma. Atopická dermatitida postihuje přibližně 10 % celkové populace. Hlavní symptomy jsou suchá kůže, dermatitida (ekzém) lokalizovaná hlavně na obličeji, krku a na ohýbaných místech kůže a v záhybech, kde způsobuje obzvláště nepříjemné svědění. Nemoc typicky začíná v prvních dvou letech života. U 90% pacientů tato kožní nemoc mizí během dětství, ale symptomy mohou pokračovat až do dospělosti. To je jedna z nejobvyklejších forem dermatitidy rozšířená ve světě. Existuje obecně přijatá teorie, že v atopii a v atopické dermatitidě je primární porucha T buněk, a že dysfunkce T buněk, které normálně regulují tvorbu IgE, je zodpovědná za nadměrnou tvorbu tohoto imunoglobulinu.

Alergická kontaktní dermatitida je rozšířená neinfekční zánětlivá porucha kůže. U kontaktní dermatitidy nevznikne imunologická reakce dokud se tělo nestane přecitlivělé k určitému antigenu. Opakované vystavení kůže antigenu a rozpoznání tohoto antigenu T buňkami má za následek uvolňování různých cytokinů, proliferaci a doplňování T buněk a konečně dermatitidu (ekzém).

Pouze malá část T buněk v postižených místech alergické kontaktní dermatitidy je specifická pro příslušný antigen. Aktivované T buňky pravděpodobně migrují do míst infekce bez ohledu na specifičnost k antigenu. Zpožděná přecitlivělost může být předaná pouze T buňkami ($CD4^+$ buňky), které sdílejí antigeny třídy MHC II. Odpověď na kontaktní alergeny

08.11.00

může být předána T buňkami, které sdílejí buď molekuly třídy MHC I ($CD8^+$ buňky) nebo molekuly třídy II ($CD4^+$ buňky) (Sunday, M.E. a kol., *J. Immunol. 125*: 1601 - 1605, 1980). Keratinocyty mohou vytvářet interleukin-1, který může usnadnit rozpoznání antigenu T buňkami. Exprese povrchové antigenní intracelulární adhezní molekuly 1 (ICAM-1) je indukována jak na keratinocytech tak na endoteliu pomocí tumor nekrotizující faktor (TNF) cytokinů a interferonu gama (IFN-γ).

Mohou-li být určeny příčiny, vyléčí alergickou kontaktní dermatitidu samotné jejich odstranění. Ve fázi nemoci, kdy se vyskytuje zánět, je vhodné použití kortikosteroidů. U zpožděného typu přecitlivělosti byl pozorován inhibiční účinek cyklosporinu na předzánětlivou funkci (funkce) T buněk připravených *in vitro* (Shidani, B. a kol., *Eur. J. Immunol. 14*: 314 - 318, 1984). Bylo také publikováno, že cyklosporin má inhibiční účinek na rannou fázi aktivace T buněk u myší. (Milon, G. a kol., *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 135d*: 237 - 245, 1984).

Alopecia areata je běžné onemocnění vlasů. 2 % pacientů ambulantních klinik v USA tvoří právě pacienti s touto poruchou. Charakteristickým znakem této nemoci je vznik jasně ohraničených kruhových nebo oválných lysých míst, která se mohou vyskytnout na kterékoli ochlupené části těla. Nemoc se může projevit v jakémkoli věku. Počátek nemoci je obvykle náhlý a klinický průběh je různý.

V současnosti zatím není možné přisoudit všem nebo vůbec jakémukoli případu alopecia areata jedinou příčinu (Rook, A. a Dawber, R, Illnesses of the Hair a Scalp; Blackwell Scientific Publications 1982: 272 - 30). Existuje mnoho faktorů, které musí být brány v úvahu. Jsou to genetické faktory, atopie, souvislost s nemocemi, u kterých se předpokládá autoimunitní původ, Downův syndrom a psychické stresy. U pacientů s alopecia areata je zvýšený výskyt atopie. Existuje důkaz, že alopecia areata je autoimunitní nemoc. Tento důkaz je založen na shodných histopatologických nálezech lymfocytického infiltrátu T buněk v a okolo vlasových folikulů se zvýšeným počtem Langerhansových buněk, na pozorování, že alopecia areata reaguje na léčbu imunomodulačními činidly, a na faktu, že existuje statisticky významná souvislost mezi alopecia areata a širokým spektrem autoimunitních nemocí (Mitchell, A.J. a kol., *J. Am. Acad. Dermatol. 11*:763-775, 1984).

Imunofenotypové studie vzorků biopsie vlasové pokožky hlavy ukazují expresi HLA-DR na epiteliálních buňkách v předpokládané povrchové vrstvě vlasových folikulů v místech aktivní alopecia areata, stejně jako infiltraci T buněk s vysokým podílem pomocník/induktor T buněk v a okolo vlasových folikulů, vzrůstající množství Langerhansových buněk a zvýšení ICAM-1 (Messenger, A.G. a kol., *J. Invest. Dermatol. 85*: 569 - 576, 1985; Gupta, A.K. a kol., *J. Am. Acad. Dermatol. 22*: 242 - 250, 1990).

08.1.00

Velké množství různých terapeutických postupů u alopecia areata může být rozděleno do čtyř kategorií: (i) nespecifické lokální stimulanty; (ii) imunomodulátory jako například systemické kortikosteroidy a PUVA; (iii) činidla podporující imunitu, jako například kontaktní látky způsobující dermatitidu, cyklosporin a inosiplex; a (iv) léčiva neznámého účinku, například minoxidil (Dawber, R.P.R. a kol., Textbook of Dermatology, Blackwell Scientific Publications, 5. vydání, 1982: 2533 -2638). Soudobé nespecifické stimulátory jako je například dithranol s dosud neznámým mechanismem, se mohou uplatnit při stimulaci opětovného růstu vlasů spíše, než lokální dráždění. Lokální kortikosteroidy mohou být sice účinné, ale často je zapotřebí dlouhodobá terapie. Steroidy aplikovatelné přímo na postižená místa se ukázaly být účinnější, ale jejich použití je omezeno na ohraničené skvrny postižených míst aktivní nemoci nebo na podporu znovu narůstání řas u alopecia totalis. Ukázalo se, že fotochemoterapie je účinná snad proto, že má vliv na změnu funkčních subpopulací T buněk. Lokální imunoterapie pomocí indukce podpory alergické kontaktní dermatitidy na vlasové pokožce mohou způsobit znovu narůstání vlasů u více než 70 % pacientů s alopecia areata. Difencypron je účinná zcitlivující látka, která nemá mutagenní účinky. Cyklosporin podávaný orálně může účinkovat v krátké době (Gupta, A.K. a kol., *J. Am. Acad. Dermatol. 22*: 242 - 250, 1990). Inosiplex, imunostimulant, prokázal zjevnou účinnost v otevřeném pokusu. Bylo uvedeno, že lokálně aplikovaný 5 % roztok minoxidilu byl schopen indukovat jistý růst vlasů u pacientů s alopecia areata. Mechanismus účinku je nejasný.

Karcinomy kůže jsou hlavním obecným zdravotním problémem, pro jejich frekvenci a postižení a znetvoření, které způsobují. Karcinom kůže se vyskytuje hlavně u lidí v aktivním věku, zejména u lidí se světlou pletí, kteří byli vystaveni po dlouhou dobu slunečnímu záření. Jen v USA překračují každoroční výdaje spojené s léčbou a pracovní neschopností pacientů 250 milionů dolarů. Tři hlavní typy - bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom a melanom - jsou jednoznačně spojeny s vystavením kůže slunečnímu záření.

Bazocelulární karcinomy jsou epiteliální tumory kůže. Objevují se především na oblastech kůže vystavených záření. Podle současné australské studie byl výskyt bazocelulárního karcinomu 652 nových případů za rok na 100 000 obyvatel. To lze srovnat se 160 případy spinocelulární rakoviny nebo 19 případy maligního melanomu (Giles, G. a kol., *Br. Med. J. 296*: 13 - 17, 1988). Bazocelulární karcinomy jsou nejčastější ze všech druhů rakoviny. Postižená místa bývají obvykle chirurgicky odstraněna. Alternativní léčba zahrnuje retinoidy, 5-fluoruracil, kryoterapii a radioterapii. Alfa nebo gama interferony se také ukázaly být účinné v léčbě bazocelulárních karcinomů a poskytly tak vhodnou alternativu pacientům, kteří nemohou podstoupit chirurgický zákrok nebo kteří mají z takového zákroku panický strach. (Cornell a

08.11.00

kol., *J. Am. Acad. Dermatol. 23*: 694 - 700, 1990; Edwards, L. a kol., *J. Am. Acad. Dermatol. 22*:496-500, 1990).

Spinocelulární karcinom (squamous cell carcinoma (SCC)) je druhý nejrozšířenější kožní zhoubný nádor a jeho frekvence vzrůstá. Množství pokročilých případů metastáze vzrůstá v souvislosti s nárůstem podstatných faktorů. V současnosti je ve Spojených Státech ročně více než 2000 případů úmrtí na SCC; průměr pětiletého přežití je 35 % s 90 % vývojem metastáz, které se objevují do tří let. Metastázy se téměř vždy objeví na nejbližší lymfatické uzlině. Potřeba medikamentózní terapie pro pokročilé případy je jasná. Úspěšná medikamentózní terapie primárního SCC kůže by umožnila vyhnout se nutnosti chirurgického odstranění, které s sebou nese jizvy a další vedlejší účinky. Tento způsob může být vhodný zejména pro postižená místa na obličeji.

Interferony (IFNs) byly také používány v léčbě melanomu (Kirkwood, J.M. a kol., *J. Invest. Dermatol. 95*: 180S - 4S, 1990) pro jejich antiproliferativní a imunomodulační účinky *in vitro*. Poměry odpovědí se systemickým IFN-α, jak ve vysoké tak v nízké dávce, se v metastazickém melanomu pohybovaly v rozmezí 5 - 30 %. Nyní byly dosaženy povzbudivé výsledky (30 % odpověď) s kombinací IFN-α a DTIC. Předběžná pozorování signalizují příznivý účinek IFN-α v látce posilující účinek antigenu podávané pacientům s vysokým rizikem melanomu. Přes nízkou účinnost monoterapie IFN na nemoc s metastázami, probíhá v současnosti několik studií, které se zabývají IFN jako látkou posilující účinek antigenu nebo v kombinaci s chemoterapií (McLeod, G.R. a kol., *J. Invest. Dermatol. 95*: 185S - 7S, 1990; Ho, V.C. a kol., *J. Invest. Dermatol.* 22: 159 - 76, 1990).

Ze všech vhodných terapií pro léčbu kožních virových onemocnění mají pouze interferony specifický antivirový mod účinku, vytvářejí imunitní odpověď těla na infekci. Léčba interferony však nedokáže působit proti virům, může pouze pomoci proti některým příznakům infekce. Léčba interferony je také spojena se systémovými nepříznivými účinky, vyžaduje četné injekce do každého jednotlivého postiženého místa a je poměrně drahá. (Kraus, S.J. a kol., *Review of Infectious Diseasses 2*(6): S620 - S632, 1990; Frazer, I.H., *Current Opinion in Immunology 8*(4): 484 - 491, 1996).

Podstata vynálezu

Vynález se týká kompozic, které jsou obsaženy nebo získány z *M. vaccae* a způsobů jejich použití v prevenci, léčbě a diagnostikování nemocí, které zahrnují mykobakteriální infekce, poruchy imunitního systému dýchací soustavy a kožní nemoci. Způsoby podle vynálezu zahrnují podávání a kompozice mající antigenní vlastnosti a/nebo vlastnosti látky zvyšující

08.1.00

účinek antigenu. Nemoci dýchací soustavy, které mohou být léčeny použitím kompozic podle vynálezu zahrnují mykobakteriální infekce (například infekci *M. tuberkulosis* a/nebo *M avium),* astma, benigní lymfogranulom a rakoviny plic. Nemoci kůže, které mohou být léčeny použitím kompozic podle vynálezu zahrnují lupénku, atopickou dermatitidu, alergickou kontaktní dermatitidu, alopecia areata a kožní bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom a melanom. Vynález také zahrnuje látky zvyšující účinek antigenu pro použití ve vakcinaci nebo imunoterapii infekčních nemocí a rakoviny.

Vynález se především týká izolovaných polypeptidů získaných z *Mycobacterium vaccae*, které zahrnují imunogenní části antigenu nebo variantu takového antigenu. V konkrétních příkladech provedení vynálezu zahrnuje antigen sekvenci aminokyselin vybranou ze skupiny sestávající z: (a) sekvencí uvedených ve výčtu SEQ ID č: 143, 145, 147, 152, 154 156, 158, 160, 162, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 196, 197, 199, 201, 203, 205 a 207; (b) sekvencí, které mají alespoň asi 50% stejných zbytků jako sekvence uvedené ve výčtu SEQ ID č.: 143, 145, 147, 152, 154 156, 158, 160, 162, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 196, 197, 199, 201, 203, 205 a 207; (c) sekvencí, které mají alespoň asi 75% stejných zbytků jako sekvence uvedené ve výčtu SEQ ID č.: 143, 145, 147, 152, 154 156, 158, 160, 162, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 196, 197, 199, 201, 203, 205 a 207; a (d) sekvencí, které mají alespoň asi 95 % stejných zbytků jako sekvence uvedené ve výčtu SEQ ID č.: 143, 145, 147, 152, 154 156, 158, 160, 162, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 196, 197, 199, 201, 203, 205 a 207, měřeno s použitím počítačového algoritmu BLASTP, jak je uvedeno dále.

Dále se vynález týká DNA sekvencí kódujících polypeptidy podle vynálezu, vektory exprese zahrnující tyto DNA sekvence a hostitelských buněk transformovaných nebo přenesených takovými vektory exprese. Dále se vynález týká směsi proteinů zahrnující alespoň jeden polypeptid podle vynálezu.

Dále se vynález týká farmaceutických kompozic, které zahrnují alespoň jeden z polypeptidů podle vynálezu nebo molekuly DNA kódující takový polypeptid a fyziologicky přijatelného nosiče. Vynález se také týká vakcín, které obsahují alespoň jeden z výše uvedených polypeptidů a nespecifickou látku zesilující imunitní odpověď. V konkrétních příkladech provedení vynálezu je látka zesilující imunitní odpověď vybrána ze skupiny sestávající z: buněk *M. vaccae* zbavených lipidů a glykolipidů; deaktivovaných buněk *M. vaccae*; buněk *M. vaccae zbavených lipidů a* glykolipidů ochuzených o mykolové kyseliny; buněk *M. vaccae* zbavených lipidů a glykolipidů ochuzených o mykolové kyseliny a arabinogalaktan; a kultivační filtrát M vaccae.

08.11.00

Kromě toho se vynález týká také způsobů posilování imunitní odpovědi pacienta, které zahrnují podávání účinného množství jedné nebo více výše zmíněných farmaceutických kompozic a/nebo vakcín pacientovi. V jednom příkladu provedení vynálezu je imunitní odpověď Th1 odpověď. Vynález dále zahrnuje způsoby léčby zahrnující podávání farmaceutické kompozice nebo vakcíny podle vynálezu pacientovi. V určitých příkladech provedení je nemoc vybrána ze skupiny sestávající z imunitních nemocí, infekčních nemocí, nemocí kůže a nemocí dýchací soustavy. Příklady takových nemocí zahrnují mykobakteriální infekce, astma a lupénku.

Vynález dále zahrnuje způsoby léčby imunitních nemocí, infekčních nemocí, nemocí kůže nebo nemocí dýchací soustavy, zahrnující podávání kompozice, která obsahuje deaktivované buňky M. vaccae, buňky *M. vaccae* zbavené lipidů *a* glykolipidů nebo kultivační filtrát *M. vaccae*.

Vynález zahrnuje také způsoby posilování imunitní odpovědi na antigen. V jednom příkladu provedení vynálezu zahrnuje takový způsob podávání polypeptidu, který obsahuje imunogenní část antigenu M. vaccae obsahující sekvence SEQ ID č.: 89 nebo 201 nebo jejich variantu. V dalším příkladu provedení vynálezu zahrnuje takový způsob podávání kompozice, která obsahuje složky vybrané ze skupiny sestávající z buněk *M. vaccae* zbavených lipidů a glykolipidů ochuzených o mykolové kyseliny a arabinogalaktan.

Dále se vynález týká způsobů a diagnostických souprav pro určení mykobakteriální infekce u pacienta. V prvním příkladu provedení vynálezu zahrnuje způsob kontakt pacientových kožních buněk s jedním nebo více výše zmíněnými polypeptidy a určení imunitní odpovědi na pacientově kůži. Ve druhém příkladu provedení vynálezu zahrnuje způsob kontakt biologického vzorku s alespoň jedním z výše uvedených polypeptidů a určení přítomnosti protilátek, které vážou polypeptid nebo polypeptidy ve vzorku, čímž se určí infekce *M. tuberculosis* v biologickém vzorku. Vhodné biologické vzorky zahrnují krev, sputum, krevní sérum, krevní plazmu, sliny, mozkomíšní mok a moč.

Vynález se také týká diagnostických souprav zahrnujících jeden nebo více výše uvedených polypeptidů v kombinaci s aparaturami, které jsou vhodné pro uskutečnění kontaktu polypeptidu s dermálními buňkami pacienta. Vynález se dále týká diagnostických souprav, které obsahují jeden nebo více neaktivních polypeptidů v kombinaci s detekčním činidlem.

Dále se vynález týká protilátek, jak polyklonálních, tak monoklonálních, které se vážou k výše uvedeným polypeptidům, stejně jako způsobů jejich použití pro určení mykobakteriální infekce.

08.11.00

Tyto a další aspekty vynálezu budou zřejmé ve spojení s následujícím detailním popisem a připojenými obrázky. Všechny zde uváděné odkazy jsou zde zařazeny v souhrnu jako by byla každá zařazena jednotlivě.

Přehled obrázků

Obr. 1A a1B ilustrují ochranné účinky imunizace myší autoklávovaným *M. vaccae* nebo kultivačními filtráty *M. vaccae* nerozdělenými na frakce, obojí aplikováno před infekcí živou kulturou *M. tuberkulosis* H37Rv.

Obr. 2A a 2B ukazují procento eosinofilů v myších imunizovaných intranasálně buď 10 nebo 1000 μg tepelně usmrceného *M. vaccae* nebo 200 až 100 μg DD-*M. vaccae,* obojí 4 týdny před stimulací ovalbuminem ve srovnání s kontrolní skupinou myší. Obr. 2C a 2D ukazují procento eosinofilů v myších intranasálně imunizovných buď 100 μg tepelně usmrceného *M. vaccae* nebo 200 μg DD-*M. vaccae*, obojí teprve jeden týden před stimulací ovalbuminem. Obr. 2E ukazují procento eosinofilů v myších imunizovaných buď intranasálně (i.n.) nebo subkutaneálně (s.c.), a to buď BCG Pasteurova kmene (BCG-P), BCG Connoughtova kmene (BCG-C), 1 mg tepelně usmrceného *M. vaccae*, nebo 200 μg DD-*M. vaccae* před stimulací ovalbuminem.

Obr. 3A ilustrují účinek imunizace myší tepelně usmrceným *M. vaccae* nebo *M. vaccae* zbaveným lipidů a glykolipidů (DD-*M. vaccae*) před infekcí tuberkulouzou. Obr. 3B ilustuje účinek imunizace myší tepelně usmrceným *M. vaccae*, rekombinantními proteiny *M. vaccae* nebo kombinací tepelně usmrceného *M. vaccae* a rekombinantních proteinů *M. vaccae* před infekcí tuberkulózou.

Obr. 4 ilustruje indukci IL-12 autoklávovaným *M. vaccae,* lyofilizovaným *M. vaccae*, *M. vaccae* zbaveným lipidů a glykolipidů a glykolipidy *M. vaccae*.

Obr. 5 srovnává *in vitro* stimulaci tvorby interferonů-gama v buňkách sleziny myší trpících vážným kombinovaným selháním imunity (Severe Combined ImmunoDeficient (SCID)) různými koncentracemi tepelně usmrceného (autoklavovaného) *M. vaccae*, *M. vaccae* zbaveného lipidů a glykolipidů a glykolipidů *M. vaccae*.

Obr. 6A, 6B a 6C ilustrují stimulaci tvorby interferonu-gama pomocí různých koncentrací rekombinantních proteinů *M. vaccae*, tepelně usmrceného *M. vaccae*, *M. vaccae* zbaveného lipidů a glykolipidů (uvedené na obrázku jako "delipidované *M. vaccae*"), glykolipidů *M. vaccae* a lipopolysacharidu, u peritoneálních makrofágů C57BL/6 myší (Obr. 6A), BALB/C myší (Obr. 6B) nebo C3H/HeJ myší (Obr. 6C).

08.11.00

Obr. 7A(i) až (iv) ilustrují účinky zvyšující nespecifickou imunitu 10 μg, 100 μg a 1 mg autoklávovaného *M. vaccae* a 75 μg frakčně nedestilovaných kultivačních filtrátů *M. vaccae,* v tomto pořadí. Obr. 7B (i) a (ii) ilustrují účinky zvyšující nespecifickou imunitu autoklávovaného *M. vaccae* a *M. vaccae* zbaveného lipidů a glykolipidů v tomto pořadí. Obr. 7C (i) ilustrují účinky zvyšující nespecifickou imunitu kompletního autoklávovaného *M. vaccae.* Obr. 7C(ii) ilustrují účinky zvyšující nespecifickou imunitu rozpustných *M. vaccae* proteinů extrahovaných s SDS z *M. vaccae* zbaveného lipidů a glykolypidů. Obr. 7C (iii) ukazuje, že účinky zvyšující nespecifickou imunitu přípravku podle obr. 7C (ii) jsou zrušeny podáváním proteolytického enzymu pronázy. Obr. 7D ilustrují účinky posilující nespecifickou imunitu tepelně usmrceného *M. vaccae* (Obr. 7D (i)), zatímco u tepelně usmrcených přípravků *M. tuberkulosis* (Obr. 7D (ii)), *M. bovis* BCG (Obr. 7D (iii)), *M. phlei* (Obr. 7D (iv)) a *M. smegmatis* (Obr. 7D (v)) nebyl účinek zvyšující nespecifickou imunitu pozorován.

Obr. 8A a B ilustrují stimulaci exprese CD69 v αβT buňkách, γδT buňkách a NK buňkách, v tomto pořadí, pomocí proteinu GV23 *M. vaccae*, Th1-indukující látky zvyšující účinek antigenu MPL/TDM/CWS a CpG ODN, a Th2-indukující látky zvyšující účinek antigenu hydroxid hlinitý a choleratoxin.

Obr. 9A až 9D ilustrují účinek rekombinantních proteinů tepelně usmrceného *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* a *M. vaccae* na tvorbu IL-1β, TNF-α, IL-12 a IFN-γ, v tomto pořadí, lidskými PBMC.

Obr. 10A až 10C ilustrují účinky různých koncentratcí rekombinantních proteinů *M. vaccae* GV-23 a GV-45 na tvorbu IL-1β, TNF-α a IL-12, v tomto pořadí, lidskými PBMC.

Obr. 11A až 11D ilustrují stimulci tvorby IL-1β, TNF-α, IL-12 a IFN-γ, v tomto pořadí v lidských PBMC pomocí *M. vaccae* proteinu GV23, Th1-indukující látky zvyšující účinek antigenu MPL/TDM/CWS a CpG ODN, a Th2-indukující látky zvyšující účinek antigenu hydroxid hlinitý a choleratoxin.

Obr. 12A až 12C ilustrují účinky různých koncentrací rekombinantních proteinů *M. vaccae* GV-23 a GV-45 na tvorbu CD40, CD80 a CD86, v tomto pořadí, dendritickými buňkami.

Obr. 13 ilustruje vystupňování reakce dendritických buněk s leukocyty pomocí rekombinantního *M. vaccae* proteinu GV-23.

Příklady provedení vynálezu

Jak bylo uvedeno výše, vynález je všeobecně zaměřen na kompozice a způsoby prevence, léčby a diagnostikování infekčních nemocí a imunitních poruch. Poruchy, které mohou být účinně léčeny použitím kompozic podle vynálezu zahrnují nemoci dýchací soustavy, například

08.11.00

mykobakteriální infekce, astma, benigní lymfogranulom a rakovinu plic, a poruchy kůže, například lupénku, atopickou dermatitidu, alergickou kontaktní dermatitidu, alopecia areata a rakoviny kůže: bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom a melanom.

Účinné vakcíny, které poskytují ochranu proti infekčním mikroorganismům obsahují alespoň dvě funkčně odlišné složky. První je antigen, který může být svou podstatou polypeptid nebo uhlohydrát, a který je zpracován makrofágy a dalšími antigen rozpoznávajícími buňkami a připraven pro $CD4^+$ T buňky nebo pro $CD8^+$ T buňky. Tento antigen tvoří specifický cíl imunitní odpovědi. Druhou složkou vakcíny je látka posilující nespecifickou imunitní odpověď, označovaná jako látka zvyšující účinek antigenu, s níž je antigen smíchán nebo je do ní včleněn. Látka zvyšující účinek antigenu posiluje imunitní odpověď zprostředkovanou buďto buňkami nebo protilátkami na sloučeniny nebo polypeptidy, které k ní nemají strukturální vztah. Několik známých látek zvyšujících účinek antigenu je připraveno z mikrobů, například *Bordetella pertussis*, *M. tuberculosis* a *M. bovis* BCG. Látky zvyšující účinek antigenu mohou také obsahovat složky, jejichž úkolem je chránit polypeptidové antigeny před odbouráním; jedná se například o hydroxid hlinitý nebo minerální olej. Zatímco antigenní složka vakcíny obsahuje polypeptidy, které jsou nasměrovány ke stimulaci imunitního útoku na specifické patogeny, například *M. tuberkulosis*, látka zvyšující účinek antigenu je často schopna širokého působení ve formulacích mnoha různých vakcín. Určité známé proteiny, například bakteriální toxiny účinkující na tenké střevo, mohou účinkovat zároveň jako antigen vyvolávající specifickou imunitní odpověď a jako látka zvyšující účinek antigenu posilující nespecifickou imunitní odpověď na proteiny.

Určité patogeny, například *M. tuberkulosis,* stejně jako určité typy rakoviny, mohou být účinně zasaženy imunitním útokem řízeným $CD4^+$ a $CD8^+$ T buňkami, což je známo jako buňkami zprostředkovaná imunita. I pro zasažení dalších patogenů, například virus dětské obrny, jsou zapotřebí protilátky tvořené B buňkami. Tyto různé třídy imuntního útoku (T buňka nebo B buňka) jsou kontrolovány různými subpopulacemi $CD4^+$ buněk, obvykle se uvádí Th1 a Th2 buňky. Požadovanou vlastností látky zvyšující účinek antigenu je schopnost selektivně posílit funkci buď Th1 nebo Th2 populací $CD4^+$ T buněk. Mnoho nemocí kůže včetně lupénky, atopické dermatitidy, alopecia areata a rakoviny kůže je pravděpodobně ovlivněno rozdíly v aktivitě těchto podskupin Th buněk.

Tyto dva typy podskupin Th buněk byly velmi dobře určeny na myším modelu a jsou definovány cytokiny, které uvolňují při aktivaci. Podskupina Th1 vylučuje IL-2, IFN-γ a tumor nekrotizující faktor a přenáší aktivaci makrofágů a zpožděný typ přecitlivělosti. Podskupina vylučuje IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10, které stimulují aktivaci B buněk. Podskupiny Th1 a Th2 se

08.11.00

vzájemně inhibují, tak že IL-4 inhibuje odpovědi typu Th1 a IFN-γ inhibuje odpovědi typu Th2. U lidí byly nalezeny podskupiny podobné Th1 a Th2 uvolňující cytokiny identické s cytokiny pozorovanými u myšího modelu. Především většina klonů T- buněk z atopických lidských lymfocytů se podobá myším Th2 buňkám, které tvoří IL-4, zatímco velmi málo klonů tvoří IFN-γ. Selektivní exprese podskupiny Th2 s následnou tvorbou IL-4 a sníženými úrovněmi buněk tvořících IFN-γ mohou vést k periferním zvýšení tvorby IgE. Posílení imunitní odpovědi typu Th-1 je rozhodující pro zvrat průběhu mnoha nemocí včetně nemocí dýchací soustavy, jako je například tuberkulóza, benigní lymfogranulom, astma, alergická rinitida a rakovina plic.

Deaktivované *M. vaccae* a mnoho sloučenin získaných z *M. vaccae* má vlastnosti jak antigenu tak látky zvyšující účinek antigenu, takže zvyšují imunitní odpověď Th1. Způsoby podle vynálezu využívají jednu nebo více těchto sloučenin antitgenů a látek zvyšujících účinek antigenu získaných z *M. vaccae* a/nebo jejich kultivační filtráty k řízení imunitní aktivity T buněk u pacientů. Směsi takových sloučenin jsou částečně účinné ve zde zahrnutých způsobech. Zatímco je velmi dobře známo, že všechny mykobakterie obsahují mnoho křížově působících antigenů, není známo, zda zároveň obsahují sloučeniny látek zvyšujících účinek antigenu. Jak bylo uvedeno výše, ukázalo se, že deaktivované *M. vaccae* a modifikované (zbavené lipidů a glykolipidů) formy deaktivovaného *M. vaccae* mají vlastnosti látky zvyšující účinek antigenu typu Th1, které nemají mnohé mykobakteriální druhy. Nadto se ukázalo, že *M. vaccae* tvoří sloučeniny, které posilují imunitní odpověď nejen na antigeny *M. vaccae* z jeho vlastního kultivačního filtrátu, ale i na antigeny z jiných zdrojů.

Vynález se také týká způsobů imunoterapie dýchacích a/nebo plicních poruch, včetně tuberkulózy, benigního lymfogranulomu, astmatu, alergická rinitida a rakovina plic, posilující imunitní odpovědi typu Th-1 u pacientů. V jednom provedení vynálezu jsou kompozice aplikovány přímo na povrch sliznice dýchacích cest, které vedou do plic a/nebo v plicích. Kompozice mohou být ale podávány intradermálně nebo subkutaneálně. Kompozice, které jsou vhodné k takovému použití zahrnují alespoň jednu z následujících složek: deaktivované buňky *M. vaccae*; *M. vaccae* kultivační filtrát; buňky *M. vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů (DD-*M. vaccae*); a sloučeniny obsažené v *M. vaccae* nebo získané z *M. vaccae* a/nebo jeho kultivačního filtrátu. Jak ilustruje dále uvedený text, podávání takových kompozic vyprovokuje specifickou imunitní odpověď T buněk a posílí ochranu proti infekci *M. tuberkuosis*, a je také účinné v léčbě astmatu. Přestože přesný způsob působení těchto kompozic v léčbě nemocí jako je například astma není znám, předpokládá se, že potlačují imunitní odpověď typu Th2, která způsobuje astma.

Ve vynálezu používaný pojem "dýchací soustava" znamená plíce, nosní dutinu, průdušnici a průdušky.

Ve vynálezu používaný pojem "dýchací cesty vedoucí do plic nebo v plicích" zahrnuje nosní dutinu, ústní dutinu, tkáň krčních mandlí, průdušnici a průdušky.

Ve vynálezu používaný pojem "pacient" znamená jakéhokoli homoiotermního živočicha, zejména ovšem člověka. Takový pacient mohou být postižen nemocí nebo mohou být bez zjistitelných příznaků nemoci. Jinak řečeno, navrhované způsoby mohou být použity pro vyvolání ochranné imunity pro prevenci nebo léčbu nemoci.

Vynález se dále týká způsobů imunoterapie aplikované na kožní nemoci, včetně psoriázy, atopické dermatitidy, alopecia a rakoviny kůže, u pacientů, u kterých mají imunoterapeutická činidla změnit nebo řídit současný stav imunitní aktivity změnou funkce T buněk na Th-1 typ imunitní odpovědi. Kompozice, které mohou být využity v navrhovaných metodách zahrnují alespoň jednu z následujících složek: deaktivované *M. vaccae* buňky; *M. vaccae* kultivační filtrát; modifikované buňky *M. vaccae*; a složky a sloučeniny obsažené v *M. vaccae* nebo získané z *M. vaccae* a/nebo jeho kultivačního filtrátu. Jak bude uvedeno dále, opakované podávání takových kompozic, s výhodou cestou intradermální injekce, se ukázalo velice účinné v léčbě lupénky.

Ve vynálezu používaný pojem " deaktivované *M. vaccae"* znamená *M. vaccae*, které bylo usmrceno buď teplem, jak je popsáno dále v příkladu 7, nebo vystaveno radiaci, jako je například ^{60}kobalt v dávce 2,5 megaradů. Zde používaný pojem "modifikované *M. vaccae*" zahrnuje buňky *M. vaccae* zbavené lipidů, buňky *M. vaccae* zbavené glykolipidů a buňky *M. vaccae,* které byly zbaveny jak lipidů tak glykolipidů (DD-*M. vaccae*).

Příprava DD-*M. vaccae* a jeho chemických kompozic je popsána dále v příkladu 7. Jak je podrobně uvedeno dále, vynálezci ukázali, že odstranění glykolipidických složek z *M. vaccae* způsobí odstranění molekulárních složek, které stimulují tvorbu interferonu gama v přirozených zabíječích (NK) buňky, čímž se významně snižuje nespecifická tvorba cytokinu, který má četné nežádoucí vedlejší účinky.

Dále se vynález týká izolovaných polypeptidů, které zahrnují alespoň jednu imunogenní část antigenu *M. vaccae* nebo její variantu nebo alespoň jednu část látky zvyšující účinek antigenu proteinu *M. vaccae*. V určitých příkladech provedení zahrnují takové polypeptidy imunogenní část antigenu nebo její variantu, kde antigen zahrnuje sekvence vybrané ze skupiny sestávající z: SEQ ID č. 1-4, 9-16, 18-21, 23, 25, 26, 28, 29, 44, 45, 47, 52-55, 63, 64, 70, 75, 89, 94, 98, 100-105, 109, 110, 112, 121, 124, 125, 134, 135, 140, 141, 143, 145, 147, 152, 154, 156,

158, 160, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 201, 203, 205 a 207.

Ve vynálezu používaný pojem "polypeptid" zahrnuje řetězce aminokyselin jakékoliv délky, včetně proteinů v plné délce, (to je antigenů), kde jsou zbytky aminokyselin spojeny kovalentními peptidickými vazbami. Tak mohou polypeptidy zahrnující imunogenní část jednoho z výše uvedených antigenů obsahovat celou imunogenní část nebo mohou obsahovat přídavné sekvence. Přídavné sekvence mohou být získané z živého antigenu *M. vaccae* nebo mohou být heterologní a takové sekvence mohou (ale nemusejí) být imunogenetické. Jak je podrobně uvedeno dále, polypeptidy podle vynálezu mohou být izolovány z buněk nebo kultivačního filtrátu *M. vaccae* nebo mohou být připraveny synteticky nebo pomocí rekombinace.

Ve vynálezu používaný pojem "imunogenní" znamená schopnost vyprovokovat imunitní odpověď u pacienta, například člověka, nebo v biologickém vzorku. Zejména imunogenní antigeny jsou schopny stimulovat buněčnou proliferaci, tvorbu interleukinu 12 nebo tvorbu interferonu-γ v biologických vzorcích obsahujících jednu nebo více buněk vybraných ze skupiny sestávající z: T buněk, NK buněk, B buněk a makrofágů, kde jsou buňky získány z jednotlivce imunního k *M. tuberkulosis*. Vystavení působení imunogenních antigenů má obecně za následek vytvoření imunitní paměti, takže po opětovné expozici tomuto antigenu se projeví silnější a rychlejší odpověď.

Imunogenní části antigenů zde popsané mohou být připraveny a identifikovány s použitím velmi dobře známých postupů, jako jsou například ty shrnuté v Paul, *Fundamental Immunology*, 3. vydání, Raven Press, 1993, strany 243 - 247. Tyto postupy zahrnují testování polypeptidických částí přirozeného antigenu neo proteinu na imunogenní vlastnosti. Při tomto testování mohou být využity reprezentativní zkoušky na proliferaci a tvorbu cytokinu popsané ve vynálezu.. imunogenní část antigenu je ta část, která v takových reprezentativních testech indukuje imunitní odpověď (jako je například buněčná proliferace, tvorba interferonu-γ nebo tvorba interleukinu-12), která je podstatně podobná imunitní odpovědi, kterou by způsobil celý antigen. Jinak řečeno, imunogenní část antigenu může indukovat alespoň asi 20 %, s výhodou asi 65 % a nejlépe asi 100 % proliferaci indukovanou celým antigenem v modelovém testu proliferace, který je popsán ve vynálezu. imunogenní část mohou také nebo alternativně stimulovat tvorbu alespoň asi 20 %, s výhodou asi 65 % a nejlépe asi 100 % interferonu-γ a/nebo interleukinu-12 indukovaných celým antigenem v modelovém testu, který je popsán ve vynálezu.

M. vaccae -látka zvyšující účinek antigenu je sloučenina nacházející se v buňkách *M. vaccae* nebo v kultivačním filtrátu *M. vaccae*, která nespecificky stimuluje imunitní odpověď.

08.11.00

Látky zvyšující účinek antigenu posilují imunitní odpověď na imunogenní antigeny a proces vzniku buněčné paměti. V případě proteinů *M. vaccae* spočívá tato pamětní odpověď zejména v Th1-typu imunity. Látky zvyšující účinek antigenu jsou také schopny stimulovat tvorbu interleukinu-12 nebo tvorbu interferonu-γ v biologických vzorcích, které obsahují jednu nebo více buněk vybraných ze skupiny sestávající z: T buňky, NK buňky, B buňky a makrofágy, kde jsou buňky získány ze zdravých jednotlivců. Látky zvyšující účinek antigenu mohou nebo nemusejí stimulovat buněčnou proliferaci. Takové *M. vaccae*-látky zvyšující účinek antigenu zahrnují například polypeptidy obsahující sekvence uvedené v SEQ ID č. 89, 117, 160, 162 nebo 201.

Ve vynálezu uváděný pojem "polynukleotid (y)" znamená jednořetězcový nebo dvouřetězcový polymer deoxyribonukleotidových nebo ribonukleotidových bazí a zahrnuje DNA a odpovídající RNA molekuly, včetně HnRNA a mRNA molekul, a to jak 5′→3′ tak protismyslné 3′→5′ řetězce a dále zahrnuje cDNA, genomovou DNA a rekombinantní DNA, stejně jako zcela nebo částečně syntetizovné polynukleotidy. Molekula HnRNA obsahuje introny a odpovídá DNA molekule obecně jedna ku jedné. mRNA molekula odpovídá HnRNA a DNA molekule, ze které byly introny vystřiženy. Polynukleotid mohou sestávat z celého genu nebo z kterékoliv jeho části. Operabilní protismyslné polynukleotidy mohou obsahovat fragment odpovídající polynukleotidu a definice "polynukleotidu" ve vynálezu zahrnuje všechny takové operabilní protismyslné fragmenty. Kompozice a způsoby podle vynálezu také zahrnují varianty výše uvedených polypeptidů a polynukleotidů. Ve vynálezu používaný pojem "varianta" znamená kteroukoli sekvenci, která má alespoň asi 40 %, s výhodou alespoň asi 60 %, lépe alespoň asi 75 % a nejvýhodněji alespoň asi 90 % zbytků (buď nukleotidů nebo aminokyselin) identických se sekvencí podle vynálezu. Procento identických zbytků se určuje tak, že se ohraničí dvě srovnávané sekvence, určí se množství identických zbytků v ohraničené části, toto číslo se podělí celkovou délkou navrhované nebo testované sekvence a výsledek se násobí stem.

Sekvence polynukleotidů nebo polypeptidů mohou být srovnány a v dané oblasti může být určeno procento totožných nukleotidů vzhledem k jinému nukleotidu s použitím počítačových algoritmů, které jsou veřejně k dispozici. Dva vzorové algoritmy pro srovnání a určení podobnosti polynukleotidových sekvencí jsou programy BLASTN a FASTA. Podobnosti polypeptidických sekvencí mohou být zjištěny programem BLASTP. Programy BLASTN a BLASTP jsou dostupné na anonymním NCBI FTP serveru (ftp://ncbi.nlm.nih.gov) v adresáři /blast/executables/. Program BLASTN verze 2.0.4 [Feb-24-1998] s nastavením výchozích parametrů popsaných v dokumentaci distribuované jako součást programu je upřednostňován pro zjišťování odlišností podle vynálezu. Použití algoritmů rodiny BLAST včetně BLASTN a

08.11.00

BLASTP je popsáno na NCBI serveru s URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/newblast.html a v publikaci Altschul, Stephen F., et al. (1997), "Gapped BLAST a PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res. 25*:3389-3402. Program FASTA je dostupný na Internetu na FTP serveru ftp://ftp.virginia.edu/pub/fasta/ . Verze 2.0.4, únor 1996 s nastavením výchozích parametrů popsaných v dokumentaci distribuované jako součást programu je upřednostňován pro zjištění odlišnosti podle vynálezu.

Použití programu FASTA je popsáno v W.R. Pearson a D.J. Lipman, "Improved Tools for Biological Sequence Analysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*:2444-2448 (1988) a W.R. Pearson, "Rapid a Sensitive Sequence Comparison with FASTP a FASTA," *Methods in Enzymology 183*:63-98 (1990).

Následující spouštěcí parametry jsou upřednostňovány pro zjišťování seskupení podobností s použitím programu BLASTN, které přispívají k E hodnotám procentuální identity:
příkazový řádek systému Unix: blastall -p blastn -d embldb -e 10 -G 1 -E 1 -r 2 -v 50 -b 50 -i queryseq –o výsledky;
Výchozí hodnoty parametrů:
-p Jméno programu [Řetězec]
-d Databáze [Řetězec]
-e Hodnota vyjadřující naději (E) [reálné číslo (Real)]
-G Cena za otevření mezery (nulová hodnota způsobí výchozí chování) [celé číslo (Integer)]
-E Cena za rozšíření mezery (nulová hodnota způsobí výchozí chování) [celé číslo (Integer)]
-r Hodnota odměny za nalezení nukleotidu (pouze program blastn) [celé číslo (Integer)]
-v Počet jednořádkových popisů (V) [celé číslo (Integer)]
-b Počet zobrazovaných seskupení (B) [celé číslo (Integer)]
-i Zpracovávaný vstupní soubor [File In]
-o Výstupní soubor programu BLAST [File Out] nepovinný parametr
Proo program BLASTP jsou upřednostňovány následující spouštěcí parametry:
blastall –p blastp –d swissprotdb –e 10 –G 1 –E 1 –v 50 –b 50 –i queryseq –o results
-p Jméno programu [Řetězec]
-d Databáze [Řetězec]
-e Hodnota vyjadřující naději (E) [reálné číslo (Real)]
-G Cena za otevření mezery (nulová hodnota způsobí výchozí chování) [celé číslo (Integer)]
-E Cena za rozšíření mezery (nulová hodnota způsobí výchozí chování) [celé číslo (Integer)]
-v Počet jednořádkových popisů (v) [celé číslo (Integer)]

08.11.00

-b Počet zobrazovaných seskupení (b) [celé číslo (Integer)]

-I Zpracovávaný vstupní soubor [File In]

-o Výstupní soubor programu BLAST [File Out] nepovinný parametr

Nalezení jedné nebo více databázových sekvencí podle zadané sekvence programy BLASTN, BLASTP, FASTA nebo podobným algoritmem srovná a určí podobné části sekvencí. Nalezené sekvence jsou seřazeny podle stupně podobnosti a délky překrytí sekvencí. Nalezení sekvence v databázi obecně reprezentuje překrytí pouze části zkoumané sekvence.

Programy BLASTN a FASTA také určují hodnotu "naděje" pro srovnání. Hodnota naděje (E) naznačuje počet sekvencí, jejichž nalezení může být očekáváno při náhodném hledání určitého počtu spojitých sekvencí, je-li hledáno v databázi určité velikosti. Hodnota naděje je používána při určení hranice udávající zda nalezení sekvence v databázi, jako je upřednostňovaná EMBL databáze, udává skutečnou podobnost. Například hodnota E = 0,1 přiřazená k nálezu v databázi říká, že v databázi o velikosti EMBL databáze může být očekáváno 0,1 nálezů přes srovnávanou část sekvence s podobným výsledkem pouze díky náhodě. Podle tohoto kritéria srovnaná a nalezená část sekvence pak má pravděpodobnost 90%, že je totožná. Pro sekvence mající hodnotu E=0,01 nebo méně přes srovnanou a nalezenou část je pravděpodobnost náhodného nalezení v EMBL databázi 1% nebo méně při použití programu LASTN nebo FASTA.

Podle jednoho příkladu provedení vynálezu, "variantní" polynukleotidy, s odkazem na každý z polynukleotidů podle vynálezu, přednostně zahrnují sekvence mající stejný nebo menší počet nukleových kyselin než každý z polynukleotidů podle vynálezu a jejich hodnoty E jsou 0,01 nebo méně v porovnání s polynukleotidy podle vynálezu. Tedy, variantní polynukleotid je jakákoliv sekvence, která má nejméně 99% pravděpodobnost, že je totožná jako polynukleotid podle vynálezu měřeno hodnotou E = 0,01 nebo méně při použití programů BLASTN nebo FASTA s výchozími parametry.

Pozměněná sekvence polynukleotidů bude obecně hybridizovat s uvedenou sekvencí polynukleotidů za přísných podmínek. Ve vynálezu uvedený pojem "přísné podmínky" znamená počáteční mytí v roztoku 6X SSC, 0,2 % SDS; hybridizaci při 65°C, 6X SSC, 0,2 % SDS přes noc; následují dvě promytí trvající 30 minut každé z nich v 1X SSC, 0,1 % SDS při teplotě 65 °C a dvě promytí trvající 30 minut, každé z nich v 0,2X SSC, 0,1 % SDS při teplotě 65 °C.

Části a jiné pozměněné polypeptidy *M. vaccae* mohou být vyrobeny synteticky nebo pomocí rekombinace. Syntetické polypeptidy mající méně než asi 100 aminokyselin a obecně méně než asi 50 aminokyselin mohou být vyrobeny pomocí postupů velmi dobře známých odborníkům v dané oblasti. Například mohou být takové polypeptidy syntetizovány s použitím

08.11.00

kteréhokoli z komerčně dostupných postupů pevné fáze, například Merrifieldova metoda syntézy na pevné fázi, která spočívá v tom, že jsou aminokyseliny postupně přidávány k rostoucímu aminokyselinovému řetězci. Viz Merrifield, *J Am. Chem. Soc.* 85: 2149 - 2146, 1963. Vybavení pro automatizovanou syntézu polypeptidů je běžně dostupné u dodavatelů jako je například Perkin Elmer/Applied BioSystems, Inc. (Foster City, CA) a mohou být upraveno podle výrobních požadavků. Varianty přírodního antigenu nebo látky zvyšující účinek antigenu mohou být připraveny s použitím standardních mutagenetických postupů, například řízená místní specifická mutageneze oligonukleotidu. Úseky DNA sekvence mohou být také odstraněny s použitím standardních postupů, což umožňuje přípravu zkrácených polypeptidů.

Polypeptid podle vynálezu může být připojen k signální (nebo vedoucí) sekvenci na N-konec proteinu, který při translaci nebo po translaci řídí přenos proteinu. Polypeptid může být také připojen ke spojovací sekvenci nebo jiné sekvenci pro usnadnění syntézy, čištění nebo identifikace polypeptidu (například poly-His) nebo pro posílení vazby polypeptidu na pevný podklad. Například může být polypeptid připojen na oblast imunoglobulinu Fc.

M. vaccae antigeny a DNA sekvence kodující takové antigeny, mohou být tedy připraveny s použitím jakéhokoli postupu. Rozpustné antigeny mohou být například izolovány z kultivačního filtrátu *M. vaccae,* jak bude uvedeno dále. Antigeny mohou také být vyrobeny pomocí rekombinace inzercí DNA sekvence, která kóduje antigen do expresního vektoru a expresí antigenu ve vhodném hostiteli. Může být použit kterýkoli z postupů exprese vektorů, který je znám odborníkům v dané oblasti. Exprese může probíhat ve kterékoli vhodné hostitelské buňce, která byla transformována nebo do ní byl přenesen expresní vektor obsahující DNA molekulu kódující rekombinantní polypeptid. Vhodné hostitelské buňky zahrnují prokaryota, kvasinky a vyšší eukaryotické buňky. Hostitelské buňky jsou s výhodou buňky *E. coli,* mykobakterií, hmyzu, kvasinek nebo savčí buněčné linie, jako jsou například COS nebo CHO. DNA sekvence exprimované takovým způsobem mohou kódovat přirozeně se vyskytující antigeny, části přirozeně se vyskytujících antigenů nebo jiné jejich varianty.

DNA sekvence kódující *M. vaccae* antigeny mohou být získány prohledáváním vhodné *M. vaccae* cDNA nebo knihovny genomové DNA pro nalezení DNA sekvence která hybridizuje na degenerativní oligonukleotidy odvozené z částečných aminokyselinových sekvencí izolovaných rozpustných antigenů. Vhodné degenerované oligonukleotidy mohou být navrženy a syntetizovány a prohledávání může být prováděno, jak bylo popsáno pro příklad v Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Jak bude uvedeno dále polymerázová řetězová reakce (PCR) může být použita pro izolování vzorku nukleové kyseliny z genomové DNA nebo cDNA nebo z knihovny

genomové DNA..Prohledávání knihovny pak může být prováděno s použitím izolovaného vzorku. DNA molekuly kódující *M vaccae* antigeny mohou být také izolovány prohledáváním vhodné expresní knihovny *M. vaccae* s antisérem (například králičím nebo opičím) rostoucím specificky proti *M. vaccae* antigenům.

Bez ohledu na metodu přípravy mají antigeny popsané ve vynálezu schopnost indukovat imunitní odpověď. Konkrétněji mají antigeny schopnost indukovat buněčnou proliferaci a/nebo tvorbu cytokinu (například tvorbu interferonu-γ a/nebo interleukinu-12) v T buňkách, NK buňkách, B buňkách nebo makrofázích získaných z jedinců imunních k *M. tuberkulosis*. Jedinec imunní k *M. tuberkulosis* je jedinec, který je považován za rezistentního k vývoji tuberkulózy díky tomu, že jeho T buňky jsou schopny účinné odpovědi na *M. tuberkulosis*. Takoví jedinci mohou být identifikováni na základě silně pozitivní odpovědi na (např. zatvrdnutí v průměru větší než asi 10 mm) intradermální kožní test na proteiny tuberkulózy (PPD) a na základě absence jakýchkoli symptomů tuberkulózní infekce. Zkoušky na buněčnou proliferaci nebo tvorbu cytokinu v T buňkách, NK buňkách, B buňkách nebo makrofázích mohou být prováděny například s použitím dále popsaných postupů. Výběr typu buněk, které budou použity pro hodnocení imunitní odpovědi na antigen bude záviset na požadované odpovědi. Například, tvorba interleukinu-12 se mnohem snadněji zjišťuje s použitím postupu, který využívá T buňky, NK buňky, B buňky a makrofágy získané z jedinců imunních proti *M. tuberkulosis,* které mohou být připraveny podle postupů velmi dobře známých odborníkům v dané oblasti. Například, jednojaderné buňky periferní krve (PBMCs) mohou být použity bez další separace složek buňky. PBMCs mohou být připraveny například s použitím hustotní centrifugace přes Ficoll™ (Winthrop Laboratories, NY). T buňky používané ve zkouškách popisovaných ve vynálezu mohou být přečištěny přímo z PBMCs. Případně mohou být použity obohacené linie T buněk reagující proti makobakteriálním proteinům nebo klony T buněk reagující na jednotlivé mykobakteriální proteiny. Takové klony T buněk mohou být získány například pomocí kultivace PBMCs z jedinců imunních k *M. tuberkulosis* s mykobakteriálními proteiny po dobu 2 až 4 týdnů. To umožní růst pouze T buněk specifických k mykobakteriálním proteinům, čímž vzniká linie složená pouze z takových buněk. Tyto buňky mohou pak být klonovány a testovány s jednotlivými proteiny s použitím postupů dobře známých odborníkům v dané oblasti, pro přesnější určení specificity T buněk.

Obecně řečeno, bez ohledu na způsob přípravy jsou polypeptidy podle vynálezu připravovány v izolované, značně čisté formě. Polypeptidy jsou s výhodou připravovány v alespoň asi 80 % čistotě, výhodněji v alespoň asi 90 % čistotě a nejvýhodněji v alespoň asi 99 % čistotě. V jednom dále uvedeném příkladu provedení jsou značně čisté polypeptidy součástí

08.11.00

farmaceutických kompozic nebo vakcín pro použití v jednom nebo více způsobech podle vynálezu.

Vynález se také týká sloučených proteinů, které obsahují první a druhý polypeptid podle vynálezu nebo, případně, polypeptid podle vynálezu a známý *M tuberkulosis* antigen, jako je například 38 kDa antigen popsaný v Aersen a Hansen, *Infect. Immun. 57*: 2481 - 2488, 1989, společně s variantami takových sloučených proteinů. Sloučené proteiny podle vynálezu mohou také zahrnovat spojovací peptidy mezi prvním a druhým polypeptidem.

DNA sekvence kódující sloučené proteiny podle vynálezu se vyrábí s použitím dobře známých technik rekombinace DNA, kdy se sestaví oddělené DNA sekvence kódující první a druhý polypeptid do vhodného expresního vektoru. 3' konec DNA sekvence kódující první polypeptid je připojen s nebo bez peptidické spojky k 5´ konci DNA sekvence kódující druhý polypeptid, takže čtecí fragmenty sekvence jsou ve fázi, která umožňuje translaci mRNA dvou DNA sekvencí do jednoho spojeného proteinu, který má biologickou účinnost prvního i druhého polypeptidu.

Spojovací sekvence peptidů mohou být použity k oddělení prvního a druhého polypeptidu na vzdálenost, které umožňuje oběma polypeptidům zaujmout jejich sekundární a terciální strukturu. Taková spojovací sekvence polypeptidů může být vřazena do spojených proteinů s použitím postupů dobře známých odborníkům v dané oblasti. Vhodné spojovací sekvence peptidů mohou být vybrány na základě následujících faktorů: (1) jejich schopnost přijmout flexibilní rozšířenou konformaci; (2) jejich neschopnost přijmout sekundární strukturu, která by mohla reagovat s funkčními oblastmi prvního nebo druhého polypeptidu; a (3) nedostatek hydrofobních zbytků nebo zbytků s nábojem, které by mohly reagovat s funkčními oblastmi polypeptidů. Spojovací sekvence peptidů obsahuje s výhodou Gly, Asn a Ser zbytky. Ostatní téměř neutrální aminokyseliny jako jsou například Thr a Ala mohou také být použity ve spojovacích sekvencích. Sekvence aminokyselin, které mohou být použity jako spojovací zahrnují ty, které jsou popsané v Maratea a kol., *Gene 40*:39-46, 1985; Murphy a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83*:8258-8262, 1986; U.S. Patent No. 4,935,233 a U.S. Patent No. 4,751,180. Spojovací sekvence mohou být dlouhé od 1 do asi 50 aminokyselin. Spojovací sekvence peptidů nejsou zapotřebí, mají-li první a druhý polypeptid neesenciální aminokyselinové oblasti na N-konci, které mohou sloužit k oddělení funkčních domén a zabránit stérické interferenci. Vázané DNA sekvence kódující spojené proteiny mohou být klonovány do vhodných expresních systémů pomocí postupů dobře známých odborníkům v dané oblasti.

Jak je podrobněji uvedeno dále, vynálezci ukazují, že teplem usmrcené *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* a rekombinantní *M. vaccae* proteiny podle vynálezu mohou být použity k aktivaci T

08.11.00

buněk a NK buněk; ke stimulaci tvorby cytokinů (především cytokinů třídy Th1) v lidských PBMC; ke zvýšení exprese ko-stimulačních molekul na dendritických buňkách a monocytech (a tím ke zvýšení aktivace); tím se zvýší maturace a funkce buněk. Dále vynálezci ukazují podobnosti mezi imunologickými vlastnostmi proteinu GV-23 *M. vaccae* podle vynálezu a dvěma známými Th1-produkovanými látkami zvyšujícími účinek antigenu. GV-23 mohou tedy být použity v léčbě nemocí, při kterých se projevuje zvýšená Th1 imunitní odpověď. Příklady takových nemocí zahrnují alergické nemoci (například, astma a ekzémy), autoimunitní nemoci (například systémová lupus erythematosus) a infekční nemoci (například tuberkulóza a malomocenství). Nadto mohou být GV-23 použity pro podporu dendritických buněk nebo NK buněk v léčbě nemocí způsobujících poruchy imunity jako je například HIV a pro podporu imunitních odpovědí a cytotoxických odpovědí například na maligní buňky při rakovině a při následných imunosupresivních protirakovinných terapiích jako je například chemoterapie.

Pro použití v terapeutických způsobech podle vynálezu jsou deaktivované *M. vaccae*, kultivační filtrát *M. vaccae*, modifikované buňky *M. vaccae*, polypeptid *M. vaccae*, spojené proteiny (nebo polynukleotidy kódující takové polypeptidy nebo spojené proteiny) obecně prezentovány ve farmaceutické kompozici nebo vakcíně. Farmaceutické kompozice mohou zahrnovat jednu nebo více složek vybraných ze skupiny sestávající z: deaktivované *M. vaccae*, kultivační filtrát *M. vaccae*, modifikované buňky *M. vaccae* a sloučeniny obsažené v nebo získané z *M. vaccae* a/nebo jejich kultivační filtrát spolu s fyziologicky přijatelným nosičem. Vakcíny mohou zahrnovat jednu nebo více složek vybraných ze skupiny sestávající z: deaktivované *M. vaccae*, kultivační filtrát *M. vaccae*, modifikované buňky *M. vaccae* a sloučeniny obsažené v nebo získané z *M. vaccae* a/nebo jejich kultivační filtrát spolu s zesilovačem nespecifické imunitní odpovědi. Takové farmaceutické kompozice a vakcín mohou také obsahovat jiné mykobakteriální antigeny buď jako bylo uvedeno výše, vřazené do spojených proteinů nebo přítomné v odděleném polypeptidu.

Alternativě může vakcína podle vynálezu obsahovat sekvence DNA kódující jeden nebo více polypeptidů, jak bylo popsáno výše, takže polypeptid se tvoří *in situ*. V takových vakcínách mohou být sekvence DNA přítomny v jakémkoliv z přenosových systémů běžně známých odborníkům v dané oblasti včetně expresních systémů nukleových kyselin, bakteriálních a virových expresních systémů. Vhodný expresní systém nukleové kyseliny obsahuje sekvenci DNA nezbytnou pro expresi v pacientovi (jako je například vhodný promotor a terminátor). Bakteriální přenosné systémy zahrnují podávání bakterií (jako je například Bacillus-Calmette-Guerin), která exprimuje imunogenní část polypeptidu na svém buněčném povrchu. Ve příkladu provedení mohou být sekvence DNA s výhodou vyrobeny s použitím virového expresního

08.11.00

systému (například vakcína nebo jiný poxvirus, retrovirus nebo adenovirus), který může zahrnovat použití nepatogenního nebo neúplného replikace schopného viru. Postupy pro vřazení DNA do takového expresního systému jsou dobře známy odborníkům v dané oblasti. DNA může být také "obnažena", jak popisuje například Ulmer a kol., *Science 259*:1745-1749, 1993 a rozšířeno v Cohen, *Science 259*:1691-1692, 1993. Přijímání obnažené DNA může být zlepšeno pokrytím na biodegradabilní nosiče, které jsou dobře přenášeny do buněk.

Výše popsaná DNA vakcína může být podávána zároveň s nebo následně po podání buď polypeptidů podle vynálezu, nebo známých mykobakteriálních antigenů jako je například 38 kDa antigen uvedený výše. Například podávání DNA kódující polypeptid podle vynálezu může být následováno podáváním antigenu za účelem zvýšení ochranného imunitního účinku vakcíny.

Způsoby a frekvence podávání stejně jako dávkování bude individuální pro každého jedince a může odpovídat způsobům frekvencím a dávkování v současnosti používaným při imunizaci s použitím BCG. Obecně mohou být podávány farmaceutické kompozice a vakcíny injekcemi (například intradermálně, intramuskulárně, intravenózně nebo subkutaneálně), intranasálně (například vdechováním) nebo orálně. 1 až 3 dávky mohou být podány v odstupu 1 až 36 týdnů. 3 dávky mohou být s výhodou podány v odstupu 3 až 4 měsíců a posilující vakcíny mohou být dále podány periodicky. Pro určitého pacienta lze zvolit alternativní postup. Vhodná dávka je množství polypeptidu nebo DNA, které, podáno výše uvedeným způsobem, je schopno zvýšit imunitní odpověď u pacienta tak, že postačuje k ochraně pacienta před mykobakteriální infekcí po dobu alespoň dvou let. Obecně kolísá množství polypeptidu v dávce (nebo vytvořené *in situ* z dávky DNA) asi od 1 pg do 100 mg na kg hostitelského organismu, běžně asi od 10 pg do 1 mg, s výhodou asi od 100 pg do 1 μg. Vhodná velikost dávky se bude měnit podle velikosti pacienta, ale obvykle se pohybuje v rozmezí od asi 0,1 ml do asi 5 ml.

V jednom příkladu provedení je farmaceutická kompozice nebo vakcína ve formě vhodné pro aplikaci na povrch sliznice dýchacích cest vedoucích do plic nebo přímo v plicích. Například může být farmaceutická kompozice nebo vakcína rozpuštěna v tekuté formulaci pro aplikaci pacientovi ve formě aerosolu nebo pomocí rozprašovače podobného těm, které se používají v léčbě astmatu. V jiných příkladech provedení je farmaceutická kompozice nebo vakcína ve formě vhodné pro injekční podávání (intrakutaneálně, intramuskulárně, intravenózně nebo subkutaneálně) nebo pro podávání orálně. Ve farmaceutické kompozici podle vynálezu může být použit jakýkoli vhodný nosič běžně známý odborníkům v dané oblasti, ale jeho typ bude záviset na tom, zda je vhodný pro vybraný způsob podávání. Pro parenterální podávání, jako je například subkutaneální injekce, obsahuje nosič s výhodou vodu, solanku, alkohol, nějaký lipid, nějaký vosk nebo nějaký pufr. Pro orální podávání může být použit kterýkoli z výše uvedených

06.11.00

nosičů nebo pevný nosič, jako je například manitol, laktóza, škrob, stearát hořečnatý, sacharin sodný, mastek, celulóza, glukóza, sacharóza a hydrogenuhličitan hořečnatý. Biodegradabilní mikrosféry (například polylaktické galaktidy) mohou být také použity jako nosiče pro farmaceutické kompozice podle vynálezu. Vhodné biodegradabilní mikrosféry jsou popsány například v U.S. Patent Nos. 4,897,268 a 5,075,109.

Ve vakcínách podle vynálezu může být ke zvýšení nespecifické imunitní odpovědi použit jakýkoliv druh látky zvyšující účinek antigenu. Většina látek zvyšujících účinek antigenu obsahuje látky určené k ochraně antigenu proti rychlému katabolismu, jako je například hydroxid hlinitý nebo minerální olej a nějaký nespecifický stimulátor imunitních odpovědí jako je například lipid A, *Bordetella pertussis*, *M. tuberkulosis*, nebo, jak je uvedeno níže, *M. vaccae*. Vhodné látky zvyšující účinek antigenu jsou komerčně dostupné, například Freund's Incomplete Adjuvant a Freund's Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI), a Merck Adjuvant 65 (Merck a Company, Inc., Rahway, NJ). Jiné vhodné látky zvyšující účinek antigenu zahrnují ledek, biodegradabilní mikrosféry, monofosforyl lipid A a Quil A.

Dále vynález poskytuje způsoby pro použití jednoho nebo více polypeptidů podle vynálezu k diagnostikování tubrekulózy pomocí kožního testu. Kožním testem je zde míněna jakákoli zkouška prováděná přímo na pacientovi u něhož je měřena hypersenzitivní (DTH) reakce zpožděného typu (jako je otok, zrudnutí nebo dermatitida) na intradermální injekci jednoho nebo více polypeptidů, jak je uvedeno výše. Reakce je měřena s výhodou alespoň 48 hodin po injekci, výhodněji 48 až 72 hodin po injekci.

DTH reakce je imunitní odpověď zprostředkovaná buňkami, která je větší u pacientů, kteří byli dříve vystaveni testovacímu antigenu (například části imunogenu použitého polypeptidu nebo nějaké jeho variantě). Odpověď může být měřena vizuálně s použitím pravítka. Obecně odpověď, která je větší než asi 0,5 cm v průměru, s výhodou větší než asi 1,0 cm v průměru je pozitivní odpověď naznačující infekci tuberkulózou.

Pro použití při kožním testu jsou polypeptidy podle vynálezu s výhodou formulovány jako farmaceutické kompozice obsahující polypeptid a fyziologicky přijatelný nosič jak bylo uvedeno výše. Takové kompozice obvykle obsahují jeden nebo více polypeptidů uvedených výše v množství v rozsahu od asi 1 μg do asi 100 μg, s výhodou od asi 10 μg do asi 50 μg v objemu 0,1 ml. Nosič použitý v takových farmaceutických kompozicích je s výhodou solný roztok s vhodným ochranným prostředkem jako je například fenol a /nebo Tween 80™.

Ve výhodném příkladu provedení je polypeptid použitý v kožním testu takové velikosti, že zůstane na místě injekce po dobu trvání reakce. Obecně postačuje polypeptid o délce alespoň 9 aminokyselin. Polypeptid je také s výhodou rozložen makrofágy nebo dendritickými buňkami

08.11.00

během hodin injekce, aby se umožnil jeho vliv na T buňky. Takové polypeptidy mohou obsahovat opakování jedné nebo více výše uvedených sekvencí, nebo jiných imunogenů nebo jiných neimunogenních sekvencí.

Vynález se dále týká způsobů rozpoznávání mykobakteriální infekce v biologickém vzorku s použitím jednoho nebo více polypeptidů podle vynálezu, buď samotného nebo v kombinaci. V příkladu provedení, ve kterém se používají různé polypeptidy, mohou být zahrnuty jiné polypeptidy než ty, konkrétně popsané ve vynálezu, jako je například výše uvedený 38 kDa antigen. Ve vynálezu používaný pojem "biologický vzorek" je jakýkoli vzorek obsahující protilátku získaný z pacienta. Vzorek je s výhodou kompletní krev, sputum, sérum, plazma, sliny, mozkomíšní mok nebo moč. Vzorek je výhodněji vzorek krve, séra nebo plazmy získaný z pacienta nebo zásoby krve. Polypeptid(y) je používán ve zkouškách, jak je uvedeno dále, k určení přítomnosti nebo nepřítomnosti jeho (jejich) protilátek ve vzorku, vzhledem k předem dané hraniční hodnotě. Přítomnost takových protilátek ukazuje na mykobakteriální infekci.

V příkladu provedení, který používá více než jeden polypeptid, jsou použity s výhodou komplementární polypeptidy (to znamená, že jedna složka polypeptidu bude určovat přítomnost infekce ve vzorcích, ve kterých by nebyla určena jinou složkou polypeptidu). Komplementární polypeptidy mohou být obecně určeny použitím každého polypeptidu zvlášť při hodnocení vzorků séra získaných ze skupin pacientů o nichž je známo, že jsou infikováni *Mycobacterium*. Po zjištění, které testované vzorky jsou pozitivní (jak bude uvedeno dále) s každým polypeptidem, mohou být formulovány kombinace dvou nebo více polypeptidů, které jsou schopné určit infekci ve většině nebo ve všech testovaných vzorcích. Například přibližně 25 % až 30 % vzorků séra z jednotlivců infikovaných tuberkulózou je negativních na protilátky k jakémukoli samostatnému proteinu, jako je například výše uvedený 38 kDa antigen. Komplementární polypeptidy mohou proto být použity v kombinaci s 38 kDa antigenem ke zvýšení citlivosti diagnostického testu.

Odborníkům v dané oblasti je známo mnoho různých zkoušek, které používají jeden nebo více polypeptidů k určení protilátek ve vzorku. Viz například Harlow a Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Ve výhodném příkladu provedení zahrnuje zkouška použití polypeptidu imobilizovaného na pevný podklad, aby vázal a odstranil protilátku ze vzorku. Vázaná protilátka pak může být určena s použitím detekčního činidla, které obsahuje identifikační skupinu. Vhodná detekční činidla zahrnují protilátky, které se vážou ke komplexu protilátka/polypeptid a uvolňují polypeptid označený identifikační skupinou (například v porovnávací zkoušce). Alternativně mohou být prováděny porovnávací testy, ve kterých je protilátka, která se váže k polypeptidu, označena identifikační skupinou a umožňuje

06.11.00

vazbu na imobilizační činidlo po inkubaci antigenu se vzorkem. Podle toho v jakém rozsahu inhibují složky vzorku vazbu označených protilátek na polypeptid, je určena účinnost vzorku s vázaným polypeptidem.

Pevným podkladem může být jakýkoli pevný materiál na který se může antigen uchytit. Vhodné materiály jsou dobře známy odborníkům v dané oblasti. Pevným podkladem například může být testovací jímka na mikrotitrové desce nebo nitrocelulóza nebo jiná vhodná membrána. Podkladem mohou být alternativně rámy nebo disky například skleněné, ze skelné vaty, latexové nebo z nějakého plastického materiálu jako je například polystyren nebo polyvinylchlorid. Podkladem mohou být také magnetické částečky nebo vláknový optický senzor jako jsou například popsány v U.S. Patent No. 5,359,681. Polypeptidy mohou být vázány na pevný podklad s použitím různých postupů, které jsou dobře známy odborníkům v dané oblasti. Ve vynálezu používaný pojem "vázaný" znamená jak nekovalentní spojení jako je například adsorpce tak kovalentní spojení, které může být přímo mezi antigenem a funkčními skupinami na podkladu nebo s použitím křížově vázaného činidla. Vazba je s výhodou adsorbcí na jamku v mikrotitrové desce nebo na membránu. V těchto případech může být adsorbce dosaženo tak, že je polypeptid ve vhodném pufru v kontaktu s pevným podkladem po vhodně dlouhou dobu. Doba kontaktu závisí na teplotě a běžně se pohybuje asi mezi 1 hodinou a 1 dnem. Obecně je pro vazbu odpovídajícího množství antigenu postačující kontakt jamky v plastové mikrotitrové desce (jako je například polystyren nebo polyvinylchlorid) s množstvím polypeptidu v rozsahu asi od 10ng do asi 1 μg, s vhodou asi 100 ng.

Kovalentního spojení polypeptidu s pevným podkladem může být obecně dosaženo pomocí reakce podkladu s bifunkčním činidlem, které bude reagovat jak s podkladem, tak s nějakou funkční skupinou polypeptidu jako je například hydroxylová skupina nebo amino skupina. Polypeptidy mohou být na podkladě vázány například tak, že mají na povrch vhodný polymer užívající benzochinon nebo kondenzací aldehydové skupiny podkladu s aminem a nějakým účinným vodíkem polypeptidu (viz například Pierce Immunotechnology Catalog a Handbook, 1991, at A12-A13).

V určitých příkladech provedení je zkouška uchycení enzymu na imunosorbentu (ELISA). Tato zkouška může být provedena spojením polypeptidového antigenu, který byl znehybněn na pevném podkladu, s takovým vzorkem, že protilátky polypeptidu ve vzorku se mohou vázat na znehybněný polypeptid. Nevázaný vzorek je pak odstraněn ze znehybněného polypeptidu a přidá se nějaké detekční činidlo, které se váže ke znehybněnému komplexu protilátka - polypeptid. Množství detekčního činidla, které zůstane vázáno na pevný podklad, je pak určeno s použitím postupu vhodného pro použité činidlo.

08.11.00

Konkrétněji, jakmile je polypeptid znehybněn na podkladu, jak bylo uvedeno výše, jsou zbylé oblasti na podkladu, které vážou proteiny, obvykle blokovány. Může být použito jakékoli vhodné blokující činidlo známe odborníkům v dané oblasti, jako je například albumin hovězího séra, nebo Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Znehybněný polypeptid je pak inkubován se vzorkem a tím se umožní protilátce, aby se navázala na antigen. Vzorek může být zředěn vhodným ředidlem jako je například fosfátový pufr se solankou (phosphate-buffered saline - PBS) před inkubací. Obecně vhodná doba kontaktu nebo inkubace je doba, která je postačující k určení přítomnosti protilátky ve vzorku infikovaném *M. tuberkulosis*. Doba, která postačuje k dosažení úrovně vázání, je s výhodou alespoň 95 % doby dosažení rovnováhy mezi vázanými a nevázanými protilátkami. Doba nezbytná k dosažení rovnováhy může být jednoduše určena pomocí zkoušky úrovně vázání, která se provádí během doby pokusu. Při pokojové teplotě obecně postačuje inkubační doba 30 minut.

Nevázaný vzorek může být odstraněn promytím pevného podkladu vhodným pufrem, například PBS obsahující 0,1 % Tween 20™. Pak může být přidáno detekční činidlo do pevného podkladu. Vhodné detekční činidlo je jakákoli sloučenina, která se váže na znehybněný komplex protilátka - polypeptid a ten pak může být určen jakýmkoli z prostředků známých v dané oblasti. Detekční činidlo obsahuje s výhodou nějaké vazebné činidlo (například protein A, protein G, imunoglobulin, lektin nebo volný antigen) konjugované s identifikační skupinou. Identifikační skupina s výhodou obsahuje enzymy (například křenová peroxidáza), substráty, kofaktory, inhibitory, barviva, radionuklidy, luminiscenční skupiny, fluorescenční skupiny a biotin. Konjugace vazebného činidla k identifikační skupině může být dosažena s použitím standardních postupů známých v dané oblasti. Obvyklá vazebná činidla mohou také být pořízena již konjugovaná na různé identifikační skupiny z mnoha komerčních zdrojů (například Zymed Laboratories, San Francisco, CA, a Pierce, Rockford, IL).

Detekční činidlo je inkubováno se znehybněným komplexem protilátka - polypeptid po dobu postačující k určení vazby protilátky. Vhodná doba může být uvedena v návodu výrobce nebo může být zjištěna zkouškou úrovně vázání, která se provádí během pokusu. Nevázané detekční činidlo je pak odstraněno a vázané detekční činidlo je určeno s použitím identifikační skupiny. Postup použitý pro určení identifikační skupiny závisí na povaze identifikační skupiny. Pro radioaktivní skupiny je vhodné scintilační počítání, nebo autoradiografické metody. Spektroskopické metody mohou být použity pro určení barviv, luminiscenčních skupin, fluorescenčních skupin. Biotin může být určen s použitím avidinu, který je spojen s jinou identifikační skupinou (obvykle radioaktivní nebo fluorescenční skupinou nebo enzymem).

08.11.00

Enzymové identifikační skupiny mohou být určeny přidáním substrátu (obvykle po určitou dobu) po čemž následuje spektroskopická nebo jiná analýza látek vzniklých při reakci.

Přítomnost nebo nepřítomnost antimykobakteriálních protilátek ve vzorku se obvykle určuje srovnáním signálu určeného z identifikační skupiny, která zůstává vázána na pevný podklad, se signálem, který odpovídá předem dané hraniční hodnotě. V jednom výhodném příkladu provedení je hraniční hodnota určena jako střední hodnota signálu získaného v okamžiku, kdy je znehybněný antigen inkubován se vzorky získanými z nenakaženého pacienta. V jiném výhodném příkladu provedení je hraniční hodnota určena s použitím Receiver Operator Curve, podle metody Sackett a kol., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown a Co., 1985, pp. 106-107. Signály větší než je předem daná hraniční hodnota jsou obecně považovány za důkaz mykobakteriální infekce.

Zkouška může být také prováděna pomocí rychlého průtokového nebo proužkového testu, kde je antigen znehybněn na membráně, jako je například nitrocelulóza. V průtokovém testu se vážou protilátky ve vzorku na znehybněný polypeptid zatímco vzorek prochází skrz membránu. Detekční činidlo (například protein A - koloidní zlato) se pak váže na komplex protilátka - polypeptid zatímco roztok obsahující detekční činidlo proudí skrze membránu. Určení vázaného detekčního činidla pak může být provedeno výše uvedeným postupem. V proužkovém testu je jeden konec membrány, na který je vázán polypeptid, ponořen do roztoku obsahujícího vzorek. Vzorek sákne membránou přes oblast obsahující detekční činidlo do oblasti se znehybněným polypeptidem. Koncentrace detekčního činidla v polypeptidu ukazuje na přítomnost antimykobakteriálních protilátek ve vzorku. Koncentrace detekčního činidla v proužku obvykle vytváří vzor, například čára, který může být sledován vizuálně. Nepřítomnost takového vzoru ukazuje na negativní výsledek. Obecně je zvoleno takové množství polypeptidu znehybněného na membráně, aby byl vytvořen vizuálně rozpoznatelný vzor, když biologický vzorek obsahuje úroveň protilátek, která by postačovala pro vytvoření pozitivního signálu v testu ELISA jak bylo uvedeno výše. Množství polypeptidu znehybněného na membráně se s výhodou pohybuje od asi 25 ng do asi 1 μg a výhodněji od asi 50 ng do asi 500 ng. Tyto testy mohou být provedeny s velmi malým množstvím (například jednou kapkou) séra nebo krve pacienta.

Existuje množství testů, které jsou vhodné pro použití s polypeptidy podle vynálezu. Výše uvedené popisy jsou míněny pouze jako příklady.

Vynález se také týká protilátek k polypeptidům podle vynálezu. Protilátky mohou být připraveny jakoukoli z metod běžně známých odborníkům v dané oblasti. Viz například Harlow a Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Podle jednoho postupu je nejdříve imunogen obsahující antigenní polypeptid injikován jakémukoli jedinci

08.1.00

z široké třídy savců (například myši, krysy, králíci, ovce a kozy). Imunogen je injikován zvířecímu hostiteli s výhodou podle předem daného rozvrhu zahrnujícího jednu nebo více posilujících imunizací a zvířatům je opakovaně odebírána krev. Polyklonální protilátky specifické pro polypeptid pak mohou být přečištěny z takového antiséra například afinitní chromatografií s použitím polypeptidů spojených s vhodným pevným podkladem.

Monoklonální protilátky specifické pro antigenní polypeptidy, které jsou předmětem našeho zájmu, mohou být připraveny například použitím postupu Kohler a Milstein, *Eur. J. Immunol. 6*:511-519, 1976 a dalších zdokonalení. Stručně, tyto metody zahrnují přípravu imortálních buněčných linií schopných vytvářet protilátky mající požadované vlastnosti (například schopnost reagovat s polypeptidy, které jsou předmětem zájmu). Tyto buněčné linie mohou být vyrobeny například ze slezinných buněk získaných ze zvířete imunizovaného výše uvedeným postupem. Slezinné buňky mohou pak být imortalizovány sloučením s buňkami myelomu, s výhodou s takovými, které jsou syngenické s imunizovaným zvířetem, a to s použitím různých postupů, které jsou známy v dané oblasti.

Monoklonální protilátky mohou být izolovány ze supernatantů výsledných hybridních kolonií. Nadto mohou být použity různé postupy zvyšující výtěžek, jako je například injekce hybridní buněčné linie do peritonální dutiny vhodného hostitele - obratlovce, jako je například myš. Monoklonální protilátky pak mohou být získány z ascitální tekutiny nebo z krve.

Protilátky mohou být použity v diagnostických testech pro zjištění přítomnosti mykobakteriálních antigenů s použitím zkoušek podobných těm, které byly popsány podrobně výše a jiných postupů dobře známých odborníkům v dané oblasti, čímž poskytují metodu pro zjištění mykobakteriální infekce, jako je například infekce *M. tuberkulosis* u pacienta.

Diagnostická činidla podle vynálezu mohou také zahrnovat polynukleotidy kódující jeden nebo více z výše uvedených polypeptidů, nebo jednu nebo více jejich částí. Primery obsahující alespoň 10 spojitých oligonukleotidů polynukleotidů podle vynálezu mohou být například použity v základních testech polymerázové řetězové reakce (PCR). Podobně mohou být testovací úseky obsahující alespoň 18 spojitých oligonukleotidů polynukleotidů podle vynálezu použity pro hybridizaci určité sekvence. Postupy PCR i hybridizace jsou dobře známy odborníkům v dané oblasti. Primery nebo úseky mohou tedy být použity pro zjištění *M. tuberculosis* a jiných mykobakteriálních infekcích v biologických vzorcích, s výhodou hlen, krev, sérum, sliny, mozkomíšní mok nebo moč. Úseky DNA nebo primery obsahující sekvence oligonukleotidů uvedené výše mohou být použity samostatně, v kombinaci s jinými, nebo s dříve uvedenými sekvencemi jako je například 38 kDa antigen zmíněný výše.

08.11.00

Slovo "asi" používané ve vynálezu v souvislosti s hmotnostními procenty kompozice znamená odchylku až 10 % jednotek od uvedené hodnoty. V souvislosti s procentní shodou nebo procentní pravděpodobností znamená slovo "asi" odchylku až 1 procentní jednotku od uvedené hodnoty.

Příklady provedení vynálezu

Následující příkady jsou zamýšleny pouze jako ilustrace a nemají omezovat vynález.

Příklad 1

Účinek imunizace myší *M.vaccae* na tuberkulózu

Tento příklad ilustruje účinek imunizace tepelně usmrceným *M. vaccae* nebo kultivačním filtrátem *M. vaccae* na myši dříve nakažené živým *M. tuberculosis*.

M. vaccae (ATCC číslo 15483) bylo kultivováno ve sterilním médiu 90 (kvasný výtažek, 2,5 g/l; trypton, 5 g/l; glukóza, 1 g/l) při teplotě 37 °C. Buňky byly získány centrifugací a přeneseny do sterilního média Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) s glukózou při teplotě 37 °C po dobu jednoho dne. Médium pak bylo podrobeno centrifugaci pro získání baktérií a kultivační filtrát byl odstraněn. Baktérie byly znovu suspendovány ve fosfátovém pufru se solankou v koncentraci 10 mg/ml což je ekvivalent 10^{10} *M. vaccae* organismů na ml. Buněčná suspenze pak byla autoklávována po dobu 15 minut při teplotě 120 °C. Kultivační filtrát byl filtrován přes 0,45 μm filtr do sterilních lahví.

Jak je ukázáno na obrázku 1A, u myší, které byly imunizovány 1 mg, 100 μg nebo 10 μg *M. vaccae* a o tři týdny později infikovány $5x10^5$ kolonie tvořícími jednotkami (colony forming units - CFU) živého *M. tuberculosis* H37Rv, byla pozorována významná ochrana před infekcí. V tomto příkladě byla použita tkáň ze slinivky, jater a plic myší , které byly tři týdny po infekci a byly v ní zjištěny živé bacily (vyjádřeno v jednotkách CFU). Snížení počtu bacilů ve srovnání s tkání z neimunizovaných kontrolních myší překonalo 2 logy v játrech a plících a 1 log v tkáni slinivky. Imunizace myší tepelně usmrceným *M. tuberculosis* H37Rv nemá žádný významný ochranný účinek na myši následně infikované živým *M. tuberculosis* H37Rv.

Jak je ukázáno na obrázku 1B, u myší, které byly imunizovány 100 μg kultivačního filtrátu *M. vaccae* a o tři týdny později infikovány $5x10^5$ CFU *M. tuberculosis* H37Rv, byla pozorována významná ochrana před infekcí. Po odebrání tkáně slinivky, jater a plic z myší, které byly tři týdny po infekci, byl zjištěn počet živých bacilů (CFU) a bylo pozorováno 1 - 2 log snížení počtu ve srovnání se skupinou neimunizovaných kontrolních myší.

08.11.00

Příklad 2

Účinek intradermálního a nitroplicního způsobu imunizace *M. vaccae* na tuberkulózu u cynomolgních? opic

Tento příklad ilustruje účinek imunizace tepelně usmrceným *M. vaccae* nebo kultivačním filtrátem *M. vaccae* intradermální a nitroplicní cestou u cynomolgních? opic, které byly později nakaženy živým *M. tuberculosis*.

Tepelně usmrcené *M. vaccae* a *M. vaccae* a kultivační filtrát byly připraveny jak bylo uvedeno výše v příkladu 1.

Bylo použito pět skupin cynomolgních? opic, v každé skupině byly dvě opice. Dvě skupiny opic byly imunizovány úplným tepelně usmrceným *M. vaccae* buď intradermálně nebo nitroplicně; dvě skupiny opic byly imunizovány kultivačním filtrátem *M. vaccae* buď intradermálně nebo nitroplicně a kontrolní skupina nebyla imunizována. Všechny imunogeny byly rozpuštěny ve fosfátovém pufru se solankou. Kompozice použité pro imunizaci, množství imunogenů a způsob podávání jsou pro každou skupinu opic uvedeny v tabulce 1. Před imunizací byly všechny opice zváženy (hmotnost v kg), byla jim změřena tělesná teplota (teplota) a byly jim odebrány krevní vzorky pro určení reakce rychlosti sedimentace erytrocytů (RSE v mm/hodinu) a proliferace lymfocytů (PL) na *in vitro* přimíchaný přečištěný protein (PPD) připravený z *Mycobacterium bovis*. RSE i PL byly použity jako indikátory odpovědi T buněk na infekci. 33 dne po imunizaci byla tato měření opakována. 34 den byla všem opicím podána druhá imunizace ve stejném množství *M. vaccae* a stejnou cestou jako první imunizace. 62 den byla změřena tělesná hmotnost, teplota, RSE a PL pro PPD a pak byly všechny opice infikovány 10^3 CFU Erdmanova kmene *Mycobacterium tuberculosis* umístěním organismů přímo do pravé plíce imunizovaných zvířat. 28 dní po infekci byla změřena tělesná hmotnost, teplota RSE a PL pro PPD u všech opic a plíce byly rentgenovány, aby bylo zjištěno, zda se infekce živým *M. tuberculosis* vyvinula v počínající pneumonii.

Tabulka 1

Porovnání intradermální a nitroplicní cesty imunizace

Číslo skupiny	**Identifikace Číslo opice**	**Množství imunogenu**	**Cesta imunizace**
1	S3101-E	0	-

08.11.00

(Kontroly)	3144-B	0	-
2	4080-B	500 μg	intradermální
(Immunizováno tepelně usmrceným *M. vaccae*)	3586-B	500 μg	intradermálně
3	3534-C	500 μg	nitroplicní
(Immunizováno tepelně usmrceným *M. vaccae*)	3160-A	500 μg	nitroplicní
4			
(Imunizováno kultivačním filtrátem)	3564-B	100 μg	intradermálně
	3815-B	100 μg	intradermálně
5			
(Imunizováno kultivačním filtrátem)	4425-A	100 μg	nitroplicní
	2779-D	100 μg	nitroplicní

Výsledky těchto studií jsou uvedeny v tabulkách 2 A - E a dále jsou shrnuty:

Tabulka 2A – 28 dní po infekci Erdmanovým kmenem *M. tuberculosis* se po rentgenování hrudníku kontrolních (neimunizovaných) opic objevily nejasné stíny na pravé suprahilární oblasti obou zvířat, což ukazovalo na počínající pneumonii. Toto pokračovalo a do 56 dne po infekci ukázalo rentgenové vyšetření nemoc v obou plicích. Jak nemoc postupovala, obě kontrolní zvířata ztrácela hmotnost a vykazovala významnou změnu PL pro PPD, což ukazovalo na silnou činnost T buněk vůči *M. tuberculosis*. Měření RSE byla proměnlivá ale odpovídající silné imunitní reakci.

Tabulka 2B – Dvě opice dvakrát intradermálně imunizované 500 μg *M. vaccae* nevykazovaly žádné známky onemocnění plic ani 84 dní po infekci *M. tuberculosis*. PL vzhledem k PPD ukazovala na imunitní reakci na *M. tuberculosis* a obě zvířata dále přibírala na váze a v souhlase s tím nevykazovala příznaky nemoci.

Tabulka 2C – Dvě opice dvakrát nitroplicně imunizované 500 μg *M. vaccae* vykazovala téměř stejné výsledky jako zvířata v tabulce 2B. Neměly žádné příznaky nemoci ani 84 dní po infekci *M. tuberculosis* a průběžně přibírala na váze. Obě zvířata vykazovala proliferaci LP k PPD v imunizační fázi (dny 0 až 62) a v poinfekční fázi, což ukazovalo, že se vyvinula silná reakce T buněk jako výsledek využití plic jako cesty imunizace a následné infekce.

Dvojí imunizace 500 μg úplného *M. vaccae* podle očekávání ukázala ochranný účinek proti následné infekci živým *M. tuberculosis* . Údaje v tabulce 2D a 2E ukazují účinky imunizace 100 μg kultivačního filtrátu *M. vaccae*. Opice imunizované intradermálně

08.11.00

vykazovaly příznaky vývoje nemoci 84 dní po infekci, zatímco ty, které byly imunizovány nitroplicně, vykazovalo jedno známky nemoci po 56 dnech a jedno po 84 dnech po infekci. To bylo významné zdržení nástupu nemoci ukazující, že imunizační proces způsobil nějakou ochrannou imunitu.

Tabulka 2A

Kontrolní skupina opic

IDENTIFIKACE	Dny	Hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD10	PL PPD1	poznámky k rtg vyšetření
S3101E	0	2,17	37,0	0	0,47	1,1	Negativní
	34	1,88	37,3	N	0,85	1,4	N
	62	2,02	36,0	N	1,3	1,5	N
→ Čas infekce							
	28	2,09	38,0	2	1,3	3,7	Pozitivní
	56	1,92	37,2	20	5,6	9,1	Pozitivní
	84	1,81	37,5	8	4,7	5,6	Pozitivní
	121	zemřela					

IDENTIFIKACE	dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10µg	PL PPD 1µg	poznámky k rtg vyšetření
3144-B	0	2,05	36,7	0	0,87	1,8	Negativní
	34	1,86	37,6	N	2,2	1,4	N
	62	1,87	36,5	N	1,6	1,6	N
→ Čas infekce							
	28	2,10	38,0	0	12	8,7	Pozitivní
	56	1,96	37,6	0	29,6	21,1	Pozitivní
	84	1,82	37,3	4	45,3	23,4	Pozitivní
	131	zemřela					

N = Neprovedeno

08.11.00

Tabulka 2B

OPICE IMUNIZOVANÉ
ÚPLNÝM TEPLEM USMRCENÝM *M. VACCAE* (500 μg)
INTRADERMÁLNÍ PODÁNÍ

IDENTIFIKACE	Dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10μg	PL PPD 1μg	poznámky k rtg vyšetření
4080-B	0	2,05	37,1	1	1,1	0,77	Negativní
	34	1,97	38,0	N	1,7	1,4	N
	62	2,09	36,7	N	1,5	1,5	N
→ Čas infekce							
	28	2,15	37,6	0	2,6	2,1	Negativní
	56	2,17	37,6	0	8,2	7,6	Negativní
	84	2,25	37,3	0	3,8	2,8	Negativní
	178	zemřela					

IDENTIFIKACE	dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10μg	PL PPD 1μg	poznámky k rtg vyšetření
3586-B	0	2,29	37,0	0	1,1	1,4	Negativní
	34	2,22	38,0	N	1,9	1,6	N
	62	2,39	36,0	N	1,3	1,6	N
→ Čas infekce							
	28	2,31	38,2	0	3,2	2,6	Negativní
	56	2,32	37,2	0	7,8	4,2	Negativní
	84	2,81	37,4	0	3,4	1,8	Negativní
	197	zemřela					

N = Neprovedeno

08.11.00

Tabulka 2C

OPICE IMUNIZOVANÉ
ÚPLNÝM TEPLEM USMRCENÝM *M. VACCAE* (500 μg)
NITROPLICNÍ PODÁNÍ

IDENTIFIKACE	dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10μg	PL PPD 1μg	poznámky k rtg vyšetření
3534-C	0	2,15	36,8	0	1,7	1,3	Negativní
	34	2,00	37,8	N	4,4	1,4	N
	62	2,13	36,4	N	3,2	1,9	N
→ Čas infekce							
	28	2,38	37,7	0	1,9	2,6	Negativní
	56	2,42	37,8	0	5,3	4,7	Negativní
	84	2,46	37,1	1	3,1	3,2	Negativní
	210	Žádná známka plicní nemoci					Negativní

IDENTIFIKACE	dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10μg	PL PPD 1μg	poznámky k rtg vyšetření
3160-A	0	2,17	37,3	0	1,2	0,79	Negativní
	34	1,98	37,1	N	3,9	7,8	N
	62	2,17	36,9	N	1,7	2,4	N
→ Čas infekce							
	28	2,38	37,7	0	1,9	2,6	Negativní
	56	2,42	37,8	0	5,3	4,7	Negativní
	84	2,46	37,1	1	3,1	3,2	Negativní
	210	Stabilizovaná plicní nemoc					Positivní

N = Neprovedeno

08.11.00

Tabulka 2D

OPICE IMUNIZOVANÉ
KULTIVAČNÍM FILTRÁTEM (100 μg)
PODÁNO INTRADERMÁLNĚ

IDENTIFIKACE	dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10μg	PL PPD 1μg	poznámky k rtg vyšetření
3564-B	0	2,40	37,2	0	1,4	1,4	Negativní
	34	2,42	38,1	N	3,3	2,7	N
	62	2,31	37,1	N	3,1	3,4	N
→ Čas infekce							
	28	2,41	38,6	13	24	13,6	Negativní
	56	2,38	38,6	0	12,7	12,0	Negativní
	84	2,41	38,6	2	21,1	11,8	Positivní
	140						Zemřela

IDENTIFIKACE	dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10μg	PL PPD 1μg	poznámky k rtg vyšetření
3815-B	0	2,31	36,3	0	1,0	1,4	Negativní
	34	2,36	38,2	N	1,9	2,0	N
	62	2,36	36,4	N	3,7	2,8	N
→ Čas infekce							
	28	2,45	37,8	0	2,1	3,3	Negativní
	56	2,28	37,3	4	8,0	5,6	Negativní
	84	2,32	37,4	0	1,9	2,2	Positivní
	210						Positivní

N = Neprovedeno

08.11.00

Tabulka 2E

OPICE IMUNIZOVANÉ
KULTIVAČNÍM FILTRÁTEM (100 μg)
PODÁVÁNO NITROPLICNĚ

IDENTIFIKACE	dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10μg	PL PPD 1μg	poznámky k rtg vyšetření
4425-A	0	2,05	36,0	0	0,35	1,2	Negativní
	34	2,0	37,6	N	3,0	2,4	N
	62	2,11	37,6	N	2,2	1,6	N
→ Čas infekce							
	28	2,21	38,0	0	8,4	4,1	Negativní
	56	2,11	37,6	0	23,9	17,7	Negativní
	84	2,18	37,9	0	8,4	7,2	Positivní
	210	Stabilizovaná plicní nemoc					Positivní

IDENTIFIKACE	dny	hmotn. kg	teplota	RSE mm/hod	PL PPD 10μg	PL PPD 1μg	poznámky k rtg vyšetření
2779-D	0	2,56	38,6	2	1,9	1,4	Negativní
	28	2,55	37,9	N	0,78	1,1	N
	56	2,69	38,4	N	1,3	1,5	N
→ Čas infekce							
	56	2,25	39,0	24	N	neurčeno	Positivní
	96						Zemřela

N = Neprovedeno

Příklad 3

Účinek imunizace *M. vaccae* na astma u myší

Tento příklad ukazuje, že jak tepelně usmrcené *M. vaccae* tak DD-*M. vaccae* podávané myším intranasálně jsou schopny inhibovat rozvoj alergické imunitní odpovědi v plicích. Toto bylo ukázáno na myším modelu plicní nemoci podobné astmatu. Závažnost této alergické nemoci se odráží ve velkém počtu eosinofilů, které se ukládají v játrech.

08.11.00

C57BL/6J myším byly intraperitoneálně podány 2 μg ovalbuminu ve 100 μl ledkové adjuvans v 0 až 14 dni, následně jim bylo podáno intranasálně 100 μg ovalbuminu v 50 μl fosfátového pufru se solankou (PBS) ve 28. dni.

V plicích myší se hromadily eosinofily, což bylo zjištěno promytím dýchacích cest uspaných myší solankou, sloučením výplachů (bronchoalveolární výplach nebo BAL) a sčítáním eosinofilů.

Jak je vidět na obrázcích 2A a 2B, skupiny sedmi myší, kterým bylo 4 týdny před intranasálním podáním ovalbuminu intranasálně podáno buď 10 nebo 1000 μg tepelně usmrceného *M. vaccae* (Obr. 2A), nebo 10, 100 nebo 200 μg DD-*M. vaccae*, připraveného jak bude uvedeno dále (Obr. 2B), měly snížené procento eosinofilů v BAL buňkách odebraných 5 dní po podání ovalbuminu ve srovnání s kontrolní skupinou myší. Kontrolní skupině myší bylo intranasálně podané PBS. Také živé *M. bovis* BCG v dávce 2 x 10^5 CFU snižují plicní eosinofilii. Údaje na obr. . 2A a 2B ukazují střední SEM na skupinu myší.

Obr. 2C a 2D ukazují, že myši, kterým bylo teprve týden před podáním ovalbuminu podáno intranasálně buď 1000 μg tepelně usmrceného *M. vaccae* (Obr. 2C) nebo 200 μg DD-*M. vaccae* (Obr. 2D) měly snížené procento eosinofilů ve srovnání se skupinou kontrolních myší. Naproti tomu podání živého BCG týden před podáním ovalbuminu nezastavilo vývoj plicní eosinofilie ve srovnání s kontrolní skupinou myší.

Jak ukazuje obr. 2E, imunizace buď 1 mg tepelně usmrceného *M. vaccae* nebo 200 μg DD-*M. vaccae* při intranasálním (i.n.) nebo subkutaneálním (s.c.) podání snižuje plicní eosinofilii, která vzniká po podání ovalbuminu ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat, kterým bylo podáno PBS. Ve stejném pokusu snižovala procento eosinofilů v BAL myší také imunizace BCG Pasteur (BCG-P) a Connought (BCG-C) kmeny před podáním ovalbuminu.

Eosinofily jsou krevní buňky, které bývají pozorovány v dýchacích cestách při alergickém astmatu. Látky, které eosinofily vylučují přispívají k otoku a infekci slizniční výstelky dýchacích cest při alergickém astmatu. Údaje na obrázcích 2A až 2E ukazují, že léčba tepelně usmrceným *M. vaccae* nebo DD-*M. vaccae* snižuje hromadění plicních eosinofilů a může být vhodná ke snížení infekce související s eosinofilií v dýchacích cestách, nosní sliznici a horních dýchacích cestách.

DD-*M.vaccae* zbavené mykolových kyselin a arabinogalaktanu

Mykolové kyseliny byly odstraněny z DD-*M.vaccae* reakcí s hydroxidem draselným (0,5 % KOH) v etanolu po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C. Mykolové kyseliny odstraněné z buňky DD-*M.vaccae* byly pak získány extrakcí z etheru. Arabinogalaktany byly odstraněny z DD-

08.11.00

M.vaccae pomocí KOH a následnou reakcí s 1 % periodickou kyselinou v 3 % octové kyselině po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě a následnou reakcí s tetrahydroboritanem sodným 0,1M po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Jak je vidět v tabulce 3, DD-*M.vaccae* ochuzené o mykolát stejně jako DD-*M.vaccae* ochuzené o mykolovou kyselinu a arabinogalaktan, podané intranasálně myším citlivým na ovalbumin, snižují hromadění eosinofilů v bronchoalveolární tekutině, ke kterému dochází po stimulaci ovalbuminem.

Podání tepelně usmrceného *M. vaccae,* DD-*M. vaccae* nebo DD-*M.vaccae* ochuzeného o mykolové kyseliny a arabinogalaktan může tedy snížit závažnost astmatu a nemocí, které zahrnují podobné imunitní abnormality, jako je například alergická rinitida.

Nadto, vzorky séra byly sloučeny z myší v pokusu, který popisuje obr. 2E a protilátky na ovalbumin byly měřeny běžnými enzymy zprostředkovanými zkouškami na imunitu imunologickou zkouškou navázáním enzymu (enzyme-linked immunoassay (EIA)). Jak ukazuje dále uvedená tabulka 3A, séra z myší infikovaných BCG měly vyšší úrovně pro ovalbumin specifického IgG1 než séra z kontrolních myší jimž bylo podáno PBS.

Naproti tomu, myši imunizované *M. vaccae* nebo DD-*M. vaccae* měly podobné nebo nižší hladiny IgG1 specifických k ovalbuminu. Protože IgG1 protilátky jsou charakteristické pro Th2 imunitní odpověď, tyto výsledky odpovídají supresivnímu účinku tepelně usmceného *M. vaccae* a DD-*M. vaccae* na imunitní odpověď Th2 způsobenou astmatem.

Tabulka 3

Popis plicní eosinofilie u myší, kterým bylo podáváno DD-*M. vaccae* ochuzené o mykolovou kyselinu nebo DD-*M. vaccae* ochuzené o mykolovou kyselinu a arabinogalaktan.

skupina	% Eosinofilů v BAL	
	průměr	S.E.M.
PBS	58,8	8,4
DD-*M.vaccae* ochuzené o mykolovou kyselinu	21,8	17,4
DD-*M.vaccae* ochuzené o mykolovou kyselinu a arabinogalaktan.	16,8	0,3

Poznámka: Alespoň 7 myší ve skupině.

09.11.00

Tabulka 3A

Nízké hladiny IgG1 specifické pro antigen v séru myší imunizovaných tepelně usmrceným *M. vaccae* nebo DD- *M. vaccae*

Skupina	Sérum IgG1	
	průměr	SEM
M. vaccae i.n.	185,00	8,3
M. vaccae s.c.	113,64	8,0
DD-*M. vaccae* i.n.	96,00	8,1
DD-*M. vaccae* s.c.	110,00	4,1
BCG, Pasteur	337,00	27,2
BCG, Connaught	248,00	46,1
PBS	177,14	11,4

Poznámka: IgG1 specifické pro ovalbumin byly zjištěny pomocí anti-myší IgG1 (Serotec). Průměry skupin jsou vyjádřeny jako reciproká EU50 koncová položka titru.

Příklad 4

Účinek imunizace *M. vaccae,* DD-*M. vaccae* nebo rekombinantními proteiny *M. vaccae* na tuberkulózu myší.

Tento příklad ilustruje účinek imunizace tepelně usmrceným *M.vaccae* DD-*M.vaccae* nebo rekombinantními *M. vaccae* proteiny bez přídavku látky zvyšující účinek antigenu nebo nějaké kombinace tepelně usmrceného *M.vaccae* se skupinou rekombinantních proteinů získaných z *M. vaccae*.

Myši byly injikovány intraperitoneálně jedním z následujících přípravků ve dvou dávkách v odstupu tří týdnů.

a) Fosfátový pufr se solankou (PBS, kontrola);
b) Tepelně usmrcené *M.vaccae* (500 μg);
c) DD-*M.vaccae* (50 μg);
d) Skupina rekombinantních proteinů obsahující: 15 μg každého z následujících proteinů: GV4P, GV7, GV9, GV27B, GV33 (připravených jak bude uvedeno dále); a
e) Tepelně usrcené *M.vaccae* plus skupina rekombinantních proteinů.

08.11.00

Tři týdny po poslední intraperitoneální imunizaci byly myši injikovány 5 X 10^5 živých organismů H37Rv *M.tuberculosis*. Po dalších třech týdnech byly myši usmrceny a jejich slezina homologizována a testována na kolonie tvořící jednotky (CFU) *M. tuberculosis*, které jsou indikátorem závažnosti infekce.

Na obr. 3A a 3B představuje každý bod jednu myš. Jako základní hladina (baseline) byly brány počty CFU získaných z kontrolních myší imunizovaných pouze PBS. Všechny hodnoty získané z pokusných myší byly vyjádřeny jako počet logaritmů CFU pod základní hladinou kontrolních myší (nebo log protection). Jak ukazuje obr. 3A, myši imunizované tepelně usmrceným *M.vaccae* nebo DD-*M.vaccae* vykazují průměrné snížení >1 nebo 0,5 logaritmu CFU v tomto pořadí.

Jak ukazuje obr. 3B, sleziny myší imunizovaných skupinou rekombinantních proteinů zahrnující: GV4P, GV7, GV9, GV27B a GV33 měla CFU mírně nižší než kontrolní myši. Avšak pokud byly GV4P, GV7, GV9, GV27B a GV33 podány v kombinaci s tepelně usmrceným *M.vaccae* snížení CFU převýšilo průměrnou hodnotu >1,5 logaritmů.

Na základě těchto údajů je zřejmá účinnost imunizace *M.vaccae*, DD-*M.vaccae* nebo rekombinantními proteiny získanými z *M.vaccae* proti následné infekci tuberkulózou, a dále je vidět, že *M.vaccae*, DD-*M.vaccae* a rekombinantní proteiny mohou být upraveny jako vakcíny proti tuberkulóze.

Příklad 5

Účinek intradermální injekce tepelně upraveného *Mycobacterium vaccae* na lupenku u lidských pacientů.

Tento příklad ilustruje účinek dvou intradermálních injekcí tepelně usmrceného *Mycobacterium vaccae* na lupenku u lidských pacientů.

M. vaccae (ATCC číslo 15483) bylo kultivováno ve sterilním médiu 90 (kvasný výtažek 2,5 g/l; trypton 5 g/l; glukóza 1 g/l) při teplotě 37 °C. Buňky byly získány centrifugací a přeneseny do sterilního Middlebrook 7H9 media (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) s glukózou při teplotě 37 °C na jeden den. Medium pak bylo odstředěno k získání kapének bakterií a kultivační filtrát byl odstraněn. Kapénky bakterií byly pak znovu suspendovány v fosfátovém pufru se solankou v koncentraci 10 mg/ml, ekvivalent 10^{10} *M. vaccae* organismů na ml. Buněčná suspenze byla pak autoklávována po dobu 15 min při teplotě 120 °C a skladována zmražená při teplotě –20 °C. Před použitím byla suspenze *M. vaccae* rozpuštěna,

zředěna na koncentraci 5 mg/ml fosfátovým pufrem se solankou, autoklávována po dobu 15 min při teplotě 120 °C a za sterilních podmínek rozdělena po 0,2 ml do ampulí pro použití u pacientů.

Léčbu podstoupilo dvacet čtyři dobrovolníků trpících lupenkou, muži i ženy od 15 do 61 roků, kteří neměli jinou systémovou nemoc. Těhotné ženy nebyly do pokusu zařazeny. Pacienti měli PASI skóre 12 až 35. PASI skóre je měření umístění, velikosti a stupně odlupování kůže v místech na těle postižených lupenkou. PASI skóre vyšší než 12 znamená nemoc silně rozšířenou po těle. Studie byla zahájena obdobím čtyř týdnů, kdy nebyla pacientům poskytnuta žádná systémová léčba proti lupence ani žádná účinná lokální terapie. Poté byli 24 pacienti injikováni intradermálně 0,1 ml *M. vaccae* (ekvivalent 500 μg). Po dalších třech týdnech následovala druhá intradermální injekce stejnou dávkou *M. vaccae* (500 μg). Lupénka byla hodnocena v období čtyři týdny před první injekcí tepelně usmrceného *M. vaccae* až dvanáct týdnů po první injekci, jak je uvedeno dále:

A. PASI skóre byla určena v týdnech 4, 0, 3, 6 a 12 ;

B. Dotazník byl s pacienty vyplněn v týdnech 0, 3, 6 a 12 ; a

C. Postižená místa každého pacienta byla fotografována v týdnech 0, 3, 6, 9 a 12.

Údaje v tabulce 4 popisují věk, pohlaví a klinický profil každého pacienta.

Tabulka 4

Údaje o pacientech ve studii účinku *M. vaccae* na lupenku

Kód	pacient	věk/pohlaví	doba trvání nemoci	vstupní PASI skóre
PS-001	D.C.	49/ž	30 let	28,8
PS-002	E.S.	41/m	4 měsíců	19,2
PS-003	M.G.	24/ž	8 měsíců	18,5
PS-004	D.B.	54/m	2 let	12,2
PS-005	C.E.	58/ž	3 měsíců	30,5
PS-006	M.G.	18/ž	3 let	15,0
PS-007	L.M.	27/m	3 let	19,0
PS-008	C.C	21/ž	1 měsíců	12,2
PS-009	E.G	42/ž	5 měsíců	12,6
PS-010	J.G	28/m	7 let	19,4
PS-011	J.U	39/m	1 let	15,5
PS-012	C.S	47/m	3 let	30,9
PS-013	H.B	44/m	10 let	30,4

08.11.00

PS-014	N.J	41/m	17 let	26,7
PS-015	J.T	61/ž	15 let	19,5
PS-016	L.P	44/m	5 let	30,2
PS-017	E.N	45/m	5 let	19,5
PS-018	E.L	28/ž	19 let	16,0
PS-019	B.A	38/m	17 let	12,3
PS-020	P.P	58/ž	1 let	13,6
PS-021	L.I	27/ž	8 měsíců	22,0
PS-022	A.C	20/ž	7 měsíců	26,5
PS-023	C.A	61/ž	10 let	12,6
PS-024	F.T	39/m	15 let	29,5

U všech pacientů byla pozorována nehnisavá, lokalizovaná zarudlá, lehce zatvrdlá reakce v místě vpichu injekce. Nebyly zaznamenány žádné vedlejší účinky nebo stížnosti ze strany pacientů. Údaje uvedené v následující tabulce 5 jsou měření kožních reakcí v místě vpichu injekce 48 hodin, 72 hodin a 7 dní po první a druhé injekci tepelně usmrceného *M. vaccae* Údaje v dále uvedené tabulce 6 jsou PASI skóre pacientů v čase první injekce *M. vaccae* (den 0) a o 3, 6, 9, 12 a 24 týdnů později.

Je jasně vidět, že do 9. týdne po první injekci *M. vaccae* vykazovalo 16 z 24 pacientů významný posun v PASI skóre. Sedm ze čtrnácti pacientů, kteří dokončili 24 týdenní sledování, zůstalo stále bez klinických příznaků opětného vývoje závažné nemoci. Tyto výsledky ukazují účinnost několikanásobného intradermálního injikování deaktivovaného *M. vaccae* v léčbě lupenky. PASI skóre nižší než 10 ukazuje na velkou plochu zhojení postižených míst. Histopatologie kožních biopsií ukazuje, že normální kožní struktura se obnovuje. Pouze jeden z prvních sedmi pacientů, kteří ukončili 28 týdenní sledování měl recidivu.

08.11.00

Tabulka 5

Měření kožní reakce v milimetrech

kód	čas měření					
	první injekce			druhá injekce		
	48 hodin	**72 hodin**	**7 dní**	**48 hodin**	**72 hodin**	**7 dní**
PS-001	12x10	12x10	10x8	15x14	15x14	10x10
PS-002	18x14	20x18	18x14	16x12	18x12	15x10
PS-003	10x10	14x10	10x8	15x12	15x10	10x10
PS-004	14x12	22x18	20x15	20x20	20x18	14x10
PS-005	10x10	13x10	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno
PS-006	10x8	10x10	6x4	12x10	15x15	10x6
PS-007	15x15	18x16	12x10	15x13	15x12	12x10
PS-008	18x18	13x12	12x10	18x17	15x10	15x10
PS-009	13x13	18x15	12x8	15x13	12x12	12x7
PS-010	13x11	15x15	8x8	12x12	12x12	5x5
PS-011	17x13	14x12	12x11	12x10	12x10	12x10
PS-012	17x12	15x12	9x9	10x10	10x6	8x6
PS-013	18x11	15x11	15x10	15x10	15x13	14x6
PS-014	15x12	15x11	15x10	13x12	14x10	8x5
PS-015	15x12	16x12	15x10	7x6	14x12	6x4
PS-016	6x5	6x6	6x5	8x8	9x8	9x6
PS-017	20x15	15x14	14x10	15x15	17x16	neuvedeno
PS-018	14x10	10x8	10x8	12x12	10x10	10x10
PS-019	10x10	14x12	10x8	neuvedeno	15x14	15x14
PS-020	15x12	15x15	12x15	15x15	14x12	13x12
PS-021	15x12	15x12	7x4	11x10	11x10	11x8
PS-022	12x10	10x8	10x8	15x12	13x10	10x8
PS-023	13x12	14x12	10x10	17x17	15x15	neuvedeno
PS-024	10x10	10x10	10x8	10x8	8x7	8x7

08.11.00

Tabulka 6

Klinický stav pacienta po injekci *M. vaccae* (PASI skóre)

kód	den 0	týden 3	týden 6	týden 9	týden 12	týden 24
PS-001	28,8	14,5	10,7	2,2	0,7	0
PS-002	19,2	14,6	13,6	10,9	6,2	0,6
PS-003	18,5	17,2	10,5	2,7	1,6	0
PS-004	12,2	13,4	12,7	7,0	1,8	0,2
PS-005*	30,5	neuvedeno	18,7	neuvedeno	neuvedeno	0
PS-006	15,0	16,8	16,4	2,7	2,1	3,0
PS-007	19,0	15,7	11,6	5,6	2,2	0
PS-008	12,2	11,6	11,2	11,2	5,6	0
PS-009	12,6	13,4	13,9	14,4	15,3	13,0
PS-010	18,2	16,0	19,4	17,2	16,9	19,3
PS-011	17,2	16,9	16,7	16,5	16,5	15,5
PS-012	30,9	36,4	29,7	39,8**		
PS-013	19,5	19,2	18,9	17,8	14,7	17,8
PS-014	26,7	14,7	7,4	5,8	9,9	24,4***
PS-015	30,4	29,5	28,6	28,5	28,2	24,3
PS-016	30,2	16,8	5,7	3,2	0,8	3,3
PS-017	12,3	12,6	12,6	12,6	8,2	8,7
PS-018	16,0	13,6	13,4	13,4	13,2	12,8
PS-019	19,5	11,6	7,0	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno
PS-020	13,6	13,5	12,4	12,7	12,4	4,4
PS-021	22,0	20,2	11,8	11,4	15,5	15,7
PS-022	26,5	25,8	20,7	11,1	8,3	5,6
PS-023	12,6	9,2	6,6	5,0	4,8	12,6
PS-024	29,5	27,5	20,9	19,0	29,8	21,2

- * Pacientovi PS-005 byla podána pouze jedna dávka autoklávovaného *M.vaccae*.
- ** Pacient PS-012 byl vyřazen z pokusu, léčivem (penicilin) způsobená dermatitida
- *** Pacient PS-014 byl revakcinován

Pacienti, kterým bylo podáno *M.vaccae* mohli dosáhnout remise (PASI skóre = 0). Remise nebo zlepšení PASI skóre mohlo být dlouhodobé. Například, pacient PS-003 dosáhl

08.11.00

remise do 20. týdne a byl dosud v remisi 80. týden. Celkem 13 z 24 pacientů vykazovalo větší než 50 % zlepšení PASI skóre.

Pacient PS-001 dosáhl remise v 16. týdnu, recidiva nastala v 48. týdnu (PASI 2,7), pacient byl revakcinován injekcí *M.vaccae,* po které nastalo zlepšení PASI z 17,8 (týden 60) na 0,8 (týden 84). Zlepšení tedy může být dosaženo opakovanou léčbou.

Příklad 6

Účinek intradermální injekce DD-*M. vaccae* na lupenku u lidských pacientů

Tento příklad ilustruje účinek intradermální injekce DD-*M. vaccae* na lupenku. Léčbě bylo podrobeno sedm dobrovolníků trpících lupenkou , muži i ženy od 18 do 45 let, kteří neměli jinou systémovou nemoc. Těhotné ženy nebyly do pokusu zařazeny. Pacienti měli PASI skóre 12 až 24. PASI skóre je, jak bylo uvedeno výše, měření umístění, velikosti a stupně odlupování kůže v místech na těle postižených lupenkou. PASI skóre vyšší než 12 znamená nemoc silně rozšířenou po těle. Studie byla zahájena obdobím čtyř týdnů, kdy nebyla pacientům poskytnuta žádná systémová léčba proti lupence ani žádná účinná lokální terapie. Poté bylo 7 pacientů injikováno intradermálně 0,1 ml DD-*M. vaccae* (ekvivalent 100 μg). Po dalších třech týdnech následovala druhá intradermální injekce stejnou dávkou DD-*M. vaccae* (100 μg). Lupénka byla hodnocena v období čtyři týdny před první injekcí *M. vaccae* až šest týdnů po první injekci, jak je uvedeno dále:

A. PASI skóre byla určena v týdnech -4, 0, 3 a 6 ;

B. s pacienty byl vyplněn dotazník v týdnech 0, 3 a 6; a

C. postižená místa každého pacienta byla vyfotografována v týdnech 0 a 3.

Údaje v tabulce 7 popisují věk, pohlaví a klinický profil pacienta.

Tabulka 7

Údaje o pacientovi ve studii účinku DD-*M. vaccae* na lupenku.

Kód	**pacient**	**věk/pohlaví**	**Doba trvání nemoci**	**vstupní PASI skóre**
PS-025	A.S	25/ž	2 roky	12,2
PS-026	M.B	45/ž	3 měsíce	14,4
PS-027	A.G.	34/m	14 let	24,8

08.11.00

PS-028	E.M	31/m	4 roky	18,2
PS-029	A.L	44/m	5 měsíců	18,6
PS-030	V.B	42/m	5 let	21,3
PS-031	R.A	18/m	3 měsíce	13,0

U všech pacientů byla pozorována nehnisavá, lokalizovaná zarudlá, lehce zatvrdlá reakce v místě vpichu injekce. Nebyly zaznamenány žádné vedlejší účinky nebo stížnosti ze strany pacientů. Údaje uvedené v následující tabulce 8 jsou měření kožních reakcí v místě vpichu injekce 48 hodin, 72 hodin a 7 dní po první injekci DD-*M. vaccae,* a 48 hodin a 72 hodin po druhé injekci.

Tabulka 8

měření kožní reakce v milimetrech

Kód	**čas měření**				
	první injekce			**druhá injekce**	
	48 hodin	**72 hodin**	**7 dní**	**48 hodin**	**72 hodin**
PS-025	8x8	8x8	3x2	10x10	10x10
PS-026	12x12	12x12	8x8	neuvedeno	14x14
PS-027	9x8	10x10	10x8	9x5	9x8
PS-028	10x10	10x10	10x8	10x10	10x10
PS-029	8x6	8x6	5x5	8x8	8x8
PS-030	14x12	14x14	10x10	12x10	12x10
PS-031	10x10	12x12	10x6	14x12	12x10

Údaje v tabulce 9 jsou PASI skóre sedmi pacientů v okamžiku první injekce DD-*M. vaccae* (den 0), a o 3, 6, 12 a 24 týdnů později.

Tabulka 9

Klinický stav pacientů po injekci DD-*M. vaccae* (PASI skóre)

Kód	**den 0**	**týden 3**	**týden 6**	**týden 12**	**týden 24**
PS-025	12·2	4·1	1,8	1,4	1,7
PS-026	14·4	11·8	6,0	6,9	1,4

08.11.00

PS-027	24·8	23·3	18,3	9,1	10,6
PS-028	18·2	24·1	28,6	klesající	
PS-029	18,6	9,9	7,4	3,6	0,8
PS-030	21,3	15,7	13,9	16,5	13,6
PS-031	13,0	5,1	2,1	1,6	0,3

Je jasně vidět, že do 3. týdne po první injekci DD-*M. vaccae,* vykazovalo pět pacientů významné zlepšení PASI skóre. Do 24. týdne šest ze sedmi pacientů vykazovalo významné zlepšení PASI skóre.

Příklad 7

Příprava kompozic z *M. vaccae*

Tento příklad ilustruje výrobu různých složek *M. vaccae*.

Příprava (DD-) *M.vaccae* zbaveného lipidů a glykolipidů a analýzy kompozic

Tepelně usmrcené *M. vaccae* bylo připraveno podle postupu, který byl uveden výše v příkladu 1. Pro přípravu *M.vaccae* zbaveného lipidů bylo autoklávované *M.vaccae* získáno v kapénkách centrifugací, kapénky byly promyty vodou, opět sloučeny centrifugací a pak lyofilizovány. Všechno lyofilizované *M.vaccae* bylo uskladněno a označeno jako lyofilizované *M.vaccae.* Před použitím v pokusu bylo znovu suspendováno v PBS na požadovanou koncentraci. Lyofilizované *M.vaccae* reagovalo se směsí chloroform/metanol (2 : 1) po dobu 60 minut při pokojové teplotě, čímž došlo k extrakci lipidů a extrakce se jednou opakovala. Delipidizovaný zbytek po extrakci ze směsi chloroform/methanol byl dále smíchán s 50 % etanolem pro refluxi po dobu dvou hodin, číž byly odstraněny glykolipidy. Extrakce z 50 % etanolu byla dvakrát opakována. Skupina extraktů z 50 % etanolu byla použita jako zdroj *M. vaccae* glykolipidů (viz dále). Zbytek po extrakci z 50 % etanolu byl lyofilizován a zvážen. Množství připraveného

M.vaccae zbaveného lipidů a glykolipidů odpovídalo 11,1 % počáteční hmotnosti použitého *M.vaccae* před vysušením. Pro biologické zkoušky bylo *M. vaccae* (DD-*M. vaccae)* zbavené lipidů a glykolipidů znovu suspendováno ve fosfátovém pufru se solankou pomocí sonikace a sterilizováno v autoklávu.

Analýzy kompozic tepelně usmrceného *M. vaccae* a DD-*M. vaccae* jsou uvedeny v tabulce 9. Větší změny jsou patrné v mastných kyselinách kompozic DD-*M. vaccae* a

08.11.00

aminokyselinách kompozic DD-*M. vaccae* ve srovnání s nerozpustnými frakcemi tepelně usmrceného *M. vaccae.*

Údaje v tabulce 9 ukazují, že nerozpustná frakce tepelně usmrceného *M. vaccae* obsahuje 10 % hmotnostních lipidu a celkový obsah aminokyselin je 2750 nmol/mg nebo přibližně 33 % hmotnostních. DD-*M. vaccae* obsahuje 1,3 % hmotnostních lipidu a 4250 nmol/mg aminokyselin, což je přibližně 51 % hmotnostních.

Tabulka 9

Analýzy kompozic tepelně usmrceného *M. vaccae* a DD-*M. vaccae*

MONOSACHARIDOVÉ KOMPOZICE

cukerný alditol	*M. vaccae*	DD-*M. vaccae*
Inositol	3,2%	1,7%
Ribitol *	1,7%	0,4%
Arabinitol	22,7%	27,0%
Mannitol	8,3%	3,3%
Galactitol	11,5%	12,6%
Glucitol	52,7%	55,2%

KOMPOZICE S MASTNÝMI KYSELINAMI

mastná kyselina	*M. vaccae*	DD-*M. vaccae*
C14:0	3,9%	10,0%
C16:0	21,1%	7,3%
C16:1	14,0%	3,3%
C18:0	4,0%	1,5%
C18:1*	1,2%	2,7%
C18:1w9	20,6%	3,1%
C18:1w7	12,5%	5,9%
C22:0	12,1%	43,0%
C24:1*	6,5%	22,9%

Nerozpustná frakce tepelně usmrceného *M. vaccae* obsahuje 10 % lipidu a DD-*M. vaccae* obsahuje 1,3 % hmotnostních lipidu.

08.11.00

AMINOKYSELINOVÉ KOMPOZICE

nmol/mg	*M. vaccae*	DD-*M. vaccae*
ASP	231	361
THR	170	266
SER	131	199
GLU	319	505
PRO	216	262
GLY	263	404
ALA	416	621
CYS*	24	26
VAL	172	272
MET*	72	94
ILE	104	171
LEU	209	340
TYR	39	75
PHE	76	132
GlcNH2	5	6
HIS	44	77
LYS	108	167
ARG	147	272

Celkový obsah aminokyselin v nerozpustné frakci tepelně usmrceného *M. vaccae* je 2750 nmol/mg nebo přibližně 33 %. Celkový obsah aminokyselin v DD-*M. vaccae* je 4250 nmol/mg, nebo přibližně 51 hmotn. %.

Srovnání kompozic DD-*M. vaccae s* formami *M. tuberculosis* a *M. smegmatis* zbavenými lipidů a glykolipidů.

M. tuberculosis a *M. smegmatis* zbavené lipidů a glykolipidů byly připraveny s použitím dříve uvedených postupů pro zbavení lipidů a glykolipidů *M. vaccae.* Jak ukazuje tabulka 10, procento aminokyselin obsažených v kompozicích *DD-M. vaccae,* DD-*M. tuberkulosis* a DD-*M. smegmatis* se příliš neliší. Avšak celkové množství proteinu se mění- dvě dávky DD- *M. vaccae* obsahovaly 34 % a 55 % proteinu, zatímco DD-*M. tuberkulosis* a DD-*M. smegmatis* obsahovaly 79 % a 72 % proteinu, v tomto pořadí.

08.11.00

Tabulka 10

Aminokyselinová kompozice Mykobakteria zbaveného lipidů a glykolipidů

Amino kyselina	***DD-M.vaccae* dávka 1**	**DD-*M.vaccae* dávka 2**	**DD-*M.smegmatis***	**DD-*M.tuberculosis***
Asp	9,5	9,5	9,3	9,1
Thr	6,0	5,9	5,0	5,3
Ser	5,3	5,3	4,2	3,3
Glu	11,1	11,2	11,1	12,5
Pro	6,1	5,9	7,5	5,2
Gly	9,9	9,7	9,4	9,8
Ala	14,6	14,7	14,6	14,2
Cys	0,5	0,5	0,3	0,5
Val	6,3	6,4	7,2	7,8
Met	1,9	1,9	1,9	1,9
Ile	3,6	3,5	4,1	4,7
Leu	7,8	7,9	8,2	8,3
Tyr	1,4	1,7	1,8	1,8
Phe	4,2	4,0	3,2	3,0
His	1,9	1,8	2,0	1,9
Lys	4,1	4,0	4,1	4,2
Arg	5,8	5,9	6,2	6,4
celkové % proteinu	55,1	33,8	72,1	78,5

Analýzy monosacharidových kompozic ukazují významné rozdíly mezi DD-*M. vaccae,* a DD-*M. tuberculosis* a DD-*M. smegmatis.* Monosacharidové kompozice dvou dávek DD-*M. vaccae* byly stejné a odlišné od DD-*M. tuberculosis* a *M. smegmatis.* Konkrétně DD-*M. vaccae* obsahovalo volnou glukózu, zatímco DD-*M. tuberculosis* a *M. smegmatis* obsahovaly glycerol, jak ukazuje tabulka 11

08.11.00

Tabulka 11

Alditol Acetat	Hmotn.%	mol%
DD-M.vaccae skupina 1		
inositol	0,0	0,0
arabinóza	54,7	59,1
manóza	1,7	1,5
glukóza	31,1	28,1
galaktóza	12,5	11,3
	100,0	100,0
DD-M.vaccae skupina 2		
inositol	0,0	0,0
arabinóza	51,0	55,5
manóza	2,0	1,8
glukóza	34,7	31,6
galaktóza	12,2	11,1
	100,0	100,0
DD-M.smeg		
inositol	0,0	0,0
glycerol	15,2	15,5
arabinóza	69,3	70,7
xylóza	3,9	4,0
manóza	2,2	1,9
glukóza	0,0	0,0
galaktóza	9,4	8,0
	100,0	100,0
DD-Mtb		
inositol	0,0	0,0
glycerol	9,5	9,7
arabinóza	69,3	71,4
manóza	3,5	3,0
glukóza	1,5	1,3
galaktóza	12,4	10,7
	96,2	96,0

M. vaccae glykolipidy

Dříve uvedené spojené extrakty z 50 % etanolu byly vysušeny rotačním odpařováním, znovu rozpuštěny ve vodě a lyofilizovány. Množství získaného glykolipidu tvořilo 1,2 % původní hmotnosti použitého *M. vaccae* před vysušením. Pro biologické zkoušky byly glykolipidy rozpuštěny ve fosfátovém pufru se solankou.

08.11.00

Příklad 8

Vlastnosti *M. vaccae* zbaveného lipidů a glykolipidů a vlastnosti rekombinantních *proteinů M. vaccae* ovlivňující imunitu.

Tento příklad ilustruje vlastnosti různých složek *M. vaccae* ovlivňující imunitu.

Výroba interleukinu-12 z makrofágů

Úplné tepelně usmrcené *M. vaccae* a DD-*M. vaccae* prokázaly rozdílné vlastnosti pokud se týče stimulace cytokinu. Stimulace Th1 imunitní odpovědi byla zvýšena tvorbou interleukinu-12 (IL-12) z makrofágů. Schopnost různých přípravků *M. vaccae* stimulovat tvorbu IL-12 je zřejmá z následujícího textu.

Skupina C57BL/6J myší byla injikována intraperitoneálně DIFCO thioglykolátem a po třech dnech byly sloučeny peritoneální makrofágy a umístěny do buněčného kultivačního prostředí s interferonem gama po dobu tří hodin. Kultivační médium bylo odstraněno a byly přidávány různé koncentrace úplného tepelně usmrceného (autoklávovaného) *M. vaccae*, lyofilizovaného *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* a glykolipidů *M. vaccae*, které byly připraveny podle dříve uvedených postupů. Po dalších třech dnech při teplotě 37 °C byla kultivační suspenze testována na přítomnost IL-12 tvořených makrofágy.

Naopak, stejné přípravky *M. vaccae* byly testovány na schopnost stimulovat tvorbu interferonu gama z přírodních zabíječů- NK buněk. Buňky sleziny byly připraveny z Severe Combined Immunodeficient (SCID) myší. Tyto populace obsahovaly 75 - 80 % NK buněk. Slezinné buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C v kultivačním prostředí s různými koncentracemi tepelně usmrceného *M. vaccae*, DD-*M. vaccae*, nebo *M. vaccae* glykolipidů. Údaje na obr. 5 ukazují, že zatímco tepelně usmrcené *M. vaccae* a *M. vaccae* glykolipidy stimulují tvorbu interferonu gama, DD- *M. vaccae* stimuluje tvorbu interferonu gama poměrně málo. Údaje shromážděné na obr. 4 a 5 ukazují, že ve srovnání s úplným tepelně usmrceným *M. vaccae* je DD-*M. vaccae* lepší stimulátor IL-12 než interferonu gama.

Tyto výsledky ukazují, že odstraněním lipidových a glykolipidových složek z *M. vaccae* se odstraní molekulární komponenty, které stimulují interferon gama z NK buněk, čímž účinně odstraňují důležitý buněčný zdroj cytokinu, který má mnoho nežádoucích vedlejších účinků. DD-*M. vaccae* tak udržuje zvýšenou kapacitu Th1 imunity stimulací tvorby IL-12 , ale ztrácí nespecifické účinky, které mohou být způsobeny stimulací tvorby interferonu gama z NK buněk.

Účinek látky zvyšující účinek antigenu DD-*M. vaccae* a mnohé rekombinantní antigeny *M. vaccae* podle vynálezu, vyrobené podle způsobů uvedených dále závisí na měření stimulace vylučování IL-12 z myších peritoneálních makrofágů. Obrázek 6A a 6B a 6C obsahují údaje z oddělených pokusů, ve kterých byl skupině C57BL/6 myší (obr. 6A), BALB/c myší (obr. 6B)

08.11.00

nebo C3H/HeJ myší (obr. 6C) podán DIFCO thioglykolát intraperitoneálně. Po třech dnech byly peritoneální makrofágy sloučeny a umístěny do kultivačního prostředí s interferonem gama na dobu tří hodin. Kultivační médium bylo odstraněno a byly přidávány různé koncentrace *M. vaccae* rekombinantních proteinů GVs-3 (GV-3), GV-4P (GV-4P), GVc-7 (GV-7), GV-23, GV-27, tepelně usmrceného *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* (které je uvedeno na obrázcích jako delipidizované *M. vaccae* na obr. 6A, 6B a 6C), *M. vaccae* glykolipidů nebo lipopolysacharidů.

Po třech dnech při 37 °C byly kultivační supernatanty testovány na přítomnost IL-12 tvořeného makrofágy. Jak ukazuj obrázek 6A, 6B a 6C, rekombinantní proteiny a přípravky z *M. vaccae* stimulují tvorbu IL-12 z makrofágů.

V následujícím pokusu byly stimulovány IFNγ připravené peritoneální makrofágy z BALB/c myší 40 μg/ml rekombinantních proteinů *M. vaccae* v kultivačním prostředí po dobu 3 dnů a poté byly testovány na přítomnost IL-12 tvořených makrofágy. Jak ukazuje obrázek 7, v těchto pokusech vytvořily IFNγ připravené makrofágy v průběhu kultivace s kontrolním proteinem, ovalbuminem (ova) látku IL-12. Avšak rekombinantní proteiny GV 24B, 38BP, 38AP, 27, 5, 27B, 3, 23 a 22B stimulovaly více než dvojnásobné množství IL-12, které bylo pozorováno v kontrolních kulturách makrofágu.

Detekce nespecifického imunitního zesilovače z úplné *M. vaccae* a kultivační filtrát *M.vaccae*

Kultivační supernatant (S/N) *M. vaccae,* usmrcené *M.vaccae*, *M. vaccae* zbavené lipidů a *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů (DD - *M. vaccae*) připravené, jak bylo uvedeno dříve, byly testovány na účinnost látky zvyšující účinek antigenu při vyvolání cytotoxické T buněčné imunitní odpovědi na ovalbumin a strukturálně nezávislý protein v myších. Tato specifická cytotoxická odpověď proti albuminu byla zjištěna následujícím způsobem. Myši C57BL/6 (2 ve skupině) byly imunizovány intraperitoneální injekcí 100 μg ovalbuminu a následně testovány na látky zvyšující účinek antigenu: autoklávovaný *M. vaccae*; lipidů zbavené *M. vaccae,* lipidů zbavené *M. vaccae* s glykolipidy, extrahované (DD - *M. vaccae*) a proteiny extrahované s SDS; proteinový extrakt SDS s pronázou (enzym s degradovaným proteinem); kultivační filtrát úplného *M. vaccae* a tepelně usmrcené *M. tuberculosis* nebo tepelně usmrcené *M. bovis* BCG, *M. phlei* nebo *M. smegmatis* nebo kultivační filtrát *M. vaccae.* Po 10 dnech byly buňky sleziny stimulovány *in vitro* po dobu dalších 6 dní s buňkami E.G7, které jsou EL4 buňky (T buněčný lymfom odvozený z C57BL/6) naočkované ovalbuminovým genem a tedy vytvářející ovalbumin. Buňky sleziny pak byly testovány na schopnost zabíjet nespecificky EL4 cílové buňky nebo zabíjet specificky E.G7 ovalbumin vytvářející buňky. Účinnost zabíjení byla určena podle uvolnění ^{51} chromu, kterým byly buňky EL4 a E.G7 označeny (100 μCi na $2x10^6$) před

08.11.00

zkouškou zabíjení. Smrtící nebo cytolytická účinnost je vyjádřena jako procento specifického rozpadu buněk s použitím vzorce:

$$\frac{\text{cpm ve zkušebních kulturách - cpm v kontrolních kulturách}}{\text{cpm celkem - cpm v kontrolních kulturách}} \times 100\%$$

Je obecně známo, že cytotoxické buňky specifické k ovalbuminu s tvoří pouze u myší imunizovaných ovalbuminem s látkou posilující účinek antigenu, ale ne u myší imunizovaných samotným ovalbuminem.

Schéma tvořící obrázek 7 ukazuje účinek různých přípravků látek posilujících účinek antigenu odvozených z *M. vaccae* na tvorbu cytotoxických T buněk proti ovalbuminu u C57BL/6 myší. Jak je vidět na obrázku 7A cytotoxické buňky se tvořily u myší imunizovaných (i) 10 μg, (ii) 100 μg nebo (iii) 1 mg autoklávovaného *M. vaccae* nebo (iv) 75 μg kultivačním filtrátem *M. vaccae.* Obrázek 7B ukazuje, že cytotoxické buňky byly tvořeny u myší imunizovaných (i) 1 mg úpného autoklávovaného *M. vaccae* nebo (ii) 1 mg lipidů a glykolipidů zbaveného (DD-) *M. vaccae*. Jak ukazuje obrázek 7C(i), cytotoxické buňky byly tvořeny u myší imunizovaných 1 mg úplného autokávovaného *M. vaccae*; obrázek 7C(ii) ukazuje účinný materiál v rozpustném proteinovém extraktu s SDS z DD - *M. vaccae.* Obrázek 7C(iii) ukazuje, že účinný materiál v přípravku látky posilující účinek antigenu podle obrázku 7C(ii) byl zničen léčbou proteolytickým enzymem pronázou. Srovnání ukazuje, že 100 μg extrahovaných SDS proteinů mělo významně větší schopnost posilovat imunitu (obr. 7C(ii)) než 1 mg úplného autoklávovaného *M. vaccae* (obr. 7C(i)).

Myši imunizované 1 mg tepelně usmrceného *M. vaccae* (obr. 7D(i)) tvořily cytotoxické buňky k ovalbuminu, ale myši imunizované odděleně 1 mg tepelně usmrceného *M. tuberculosis* (obr. 7D(ii)), 1 mg *M. bovis* BCG (obr. 7D(iii)), 1 mg *M. phlei* (obr. 7D(iv)) nebo 1 mg *M. smegmatis* (obr. 7D(v)) netvořily cytotoxické buňky.

Tyto výsledky ukazují, že tepelně usmrcené *M. vaccae* a DD - *M. vaccae* má vlastnosti látky posilující účinek antigenu, které nebyly pozorovány u jiných mykobakterií. Kromě toho *M. vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů zabraňuje stimulační aktivitě NK buněk, ale nezpůsobuje snížení stimulační aktivity T buněk.

V odděleném pokusu byly myši imunizované ovalbuminem a 200 μg DD-*M.vaccae* ochuzeného o mykolickou kyselinu a arabinogalaktan také schopny tvořit cytotoxické buňky (maximální specifický rozpad buněk byl 28 % až 46 % ve srovnání s < 8 % specifického rozpadu u kontrolních myší imunizovaných samotým ovalbuminem).

08.11.00

Kultivační filtrát *M. vaccae* dříve popsaný byl rozdělen na frakce pomocí isoelektrické fokusace a frakce byly testovány na účinnost látky posilující účinek antigenu ve zkoušce na specifickou cytotoxickou odpověď proti ovalbuminu u C57BL/6 myší, jak bylo uvedeno dříve. Nevětší účinnost látek posilujících účinek antigenu se projevila u frakcí, které odpovídají pI 4,2 - 4,32 (frakce č. 7 - 9), 4,49 - 4,57 (frakce č. 13 - 17) a 4,81 - 5,98 (frakce č. 23 - 27).

Identifikace proteinů v DD-*M. vaccae* pomocí protilátek

BALB/c myši byly imunizovány intraperitoneálně 50 ug DD-*M. vaccae* jednou týdně po dobu 5 týdnů. V šestém týdnu byly myši usmrceny a byla shromážděna jejich séra. Séra byla testována na protilátky proti rekombinantním proteinům odvozeným z *M. vaccae*, které byly připraveny jak bude uvedeno dále, ve standardních s enzymy spojených zkouškách na imunitu.

Antiséra nereagovala s několika rekombinantními proteiny *M. vaccae* ani s ovalbuminem, který sloužil jako nezávislý negativní kontrolní protein v s enzymy spojených zkouškách (výsledky nejsou uvedeny). Antiséra z myší imunizované DD-*M. vaccae* reagovaly s GV antigeny odvozenými z *12 M. vaccae*. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12 dále. Antiséra popsaná GV3, 5P, 5, 7, 9, 22B, 24, 27, 27A, 27B, 33 a 45 jsou tedy přítomna v DD-*M. vaccae*.

Tabulka 12
Schopnost antiséra DD-*M.vaccae* reagovat s GV antigenty odvozenými z *M.vaccae*

GV Antigen	3	5P	5	7	9	22B	24	27	27A	27B	33	45
schopnost reagovat*	10^3	10^3	10^3	10^2	10^4	10^3	10^4	10^6	10^5	10^6	10^4	10^4

*Vyjádřená jako nejvyšší ředění séra z DD-*M. vaccae* imunizovaných myší vykazující větší schopnost reagovat, než sérum z neimunizovaných myší

Proteiny v DD-*M. vaccae* zjištěné na základě odpovědí T buněk

BALB/c myším bylo injikováno do každého chodidla 100 ug DD-*M. vaccae* v kombinaci s neúplnou Freundovou látkou posilující účinek antigenu a o 10 dní později byly myši usmrceny aby z nich mohly být získány buňky z podkoleních lymfatických uzlin. Buňky z imunizovaných a neimunizovaných kontrolních myší byly stimulovány *in vitro* rekombinantními GV proteiny odvozenými z *M. vaccae*. Po třech dnech byly testovány buněčná proliferace a tvorba IFNγ.

08.11.00

Odpověď na GV proteiny spočívající v proliferaci T buněk lymfatických uzlin získaných z myší imunizovaných DD-*M. vaccae*

Buňky lymfatických uzlin DD-*M. vaccae* imunizovaných myší nereagovaly proliferací na irelevantní protein, ovalbumin (údaje nejsou uvedeny). Jak ukazuje tabulka 13, buňky lymfatických uzlin imunizovaných myší reagovaly proliferací na GV 3, 7, 9, 23, 27, 27B, a 33. Odpovídající buňky z neimunizovaných myší nereagovaly proliferací na uvedené GV proteiny, což ukazuje na to, že myši imunizované DD-*M. vaccae* byly imunizovány těmito proteiny. Z toho plyne, že proteiny GV 3, 7, 9, 23, 27, 27B a 33 odvozené z *M.vaccae* jsou pravděpodobně přítomny v DD-*M.vaccae.*

Tabulka 13

Proliferace buněk lymfatických uzlin DD-*M.vaccae* imunizovaných a kontrolních myší jako odpověď na GV proteiny *in vitro*

GV protein	Stimulační index* pozorovaný v přítomnosti 50 μg/ml GV proteinů	
	DD-*M.vaccae* imunizované myši	kontrolní myši
GV3	4,63	1,52
GV7	3,32	1,27
GV9	6,48	2,64
GV23	4,00	1,76
GV27	5,13	1,40
GV27B	7,52	1,48
GV33	3,31	1,45

*Stimulační index = cpm z nárustu tritiovaného tymidinu v přítomnosti GV proteinu / cpm v nepřítomnosti GV proteinu

Tvorba IFNγ buňkami lymfatických uzlin DD-*M. vaccae* imunizovaných myší po *in vitro* stimulaci GV proteiny

Buňky lymfatických uzlin z neimunizovaných myší nevytváří IFNγ při stimulaci GV proteiny. Jak je ukázáno v tabulce 14 dále, buňky lymfatických uzlin z myší imunizovaných DD-*M. vaccae* vylučují IFNγ způsobem závislým na dávce, jsou-li stimulovány GV 3, 5, 23, 27A, 27B, 33, 45 nebo 46, což ukazuje na to, že myši byly imunizovány těmito proteiny. Když byly buňky imunizovaných myší stimulovány irelevantním proteinem, ovalbuminem (údaje nejsou

08.11.00

uvedeny), tak nebyla zjistitelná žádná tvorba IFNγ. Proteiny GV 3, 5, 23, 27A, 27B, 33, 45 a 46 jsou tedy pravděpodobně obsaženy v DD-*M. vaccae*.

Tabulka 14

Tvorba IFNγ v buňkách podkoleních lymfatických uzlin DD-*M.vaccae* imunizovaných myší po *in vitro* stimulaci GV proteinem

GV protein nebo kontrola	**IFNγ (ng/ml)**		
	Dávka GV proteinu použitá *in vitro* (μg/ml)		
	50	10	2
GV-3	8,22 ± 3,73	neměřitelné	neměřitelné
GV-4P	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
GV-5	8,90 ± 4,54	0,57 ± 0,40	neměřitelné
GV-5P	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
GV-7	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
GV-9	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
GV-13	1,64 ± 0,40	neměřitelné	neměřitelné
GV-14	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
GV-14B	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
GV-22B	20,15 ± 1,96	4,34 ± 0,02	neměřitelné
GV-23	41,38 ± 6,69	6,97 ± 2,78	neměřitelné
GV-24B	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
GV-27	46,86 ± 17,14	33,06 ± 17,61	10,14 ± 3,01
GV-27A	7,25 ± 4,36	neměřitelné	neměřitelné
GV-27B	100,36 ± 37,84	33,03 ± 7,54	14,33 ± 1,01
GV-29	5,93 ± 0,47	neměřitelné	neměřitelné
GV-33	9,82 ± 4,64	neměřitelné	neměřitelné
GV-38AP	1,44 ± 1,20	neměřitelné	neměřitelné
GV-38BP	5,62 ± 0,70	neměřitelné	neměřitelné
GV-42	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
GV-44	neměřitelné	neměřitelné	neměřitelné
DD-M.vaccae	109,59 ± 15,48	90,23 ± 6,48	65,16 ± 3,68
M. vaccae	68,89 ± 4,38	67,91 ± 7,92	48,92 ± 3,86

Proteiny v DD-*M.vaccae* jako nespecifické zesilovače imunity

V následujících pokusech bylo pět proteinů GV27, 27A, 27B, 23 a 45 použito jako nespecifické zesilovače imunity s ovalbuminovým antigenem k imunizaci myší, jak bylo uvedeno dříve v příkladu 6. Jak ukazuje obrázek 12, 50 ug kteréhokoli z rekombinantních

08.11.00

proteinů GV27, 27A, 27B, 23 a 45 prokázalo při injikování s 50 - 100 ug ovalbuminu vlastnosti látky posilující účinek antigenu, které spočívají ve schopnosti tvořit cytotoxické buňky proti ovalbuminu.

Příklad 9

Autoklávovaný *M. vaccae* tvoří cytotoxické CD8 T buňky proti *M. tuberculosis* infikovaným makrofágům

Tento příklad ukazuje schopnost usmrceného *M. vaccae* stimulovat cytotoxické CD8 T buňky, které přednostně zabíjejí makrofágy, které byly infikovány *M. tuberculosis.*

Myši byly imunizovány intraperitoneální injekcí 500 μg usmrceného *M. vaccae,* které bylo připraveno, jak bylo uvedeno dříve v příkladu 1. Dva týdny po imunizaci slezinné buňky imunizovaných myší byly vedeny přes kolonu obohacenou CD8 T buňkami (R&D Systems, St. Paul, MN, USA).

Slezinné buňky získané zpět ze sloupce vykazovaly obohacení na 90 % CD8 T buněk. Tyto T buňky stejně jako CD8 T buňky ze sleziny neimunizovaných myší byly testovány na schopnost zabíjet neinfikovaném makrofágy, nebo makrofágy, které byly infikovány *M. tuberculosis.*

Makrofágy byly získány z peritoneální dutiny myší pět dní po intraperitoneálním podání 1 ml 3 % thioglykolátu. Makrofágy byly infikovány pře noc *M. tuberculosis* v poměru dvě mykobakterie na makrofága. Všechny makrofágové přípravky byly označeny ^{51}chromem 2 μCi na 10^4 makrofágů. Poté byly makrofágy kultivovány s CD8 T buňkami přes noc (16 hodin) dokud nebylo zabíjením dosaženo poměru 30:1. Specifické zabíjení bylo sledováno pomocí uvolňování ^{51}chromu a vyjádřeno jako procento specifického rozpadu, určeného stejně jako v příkladu 5.

Po 3 dnech společné kultivace CD8 T buněk s makrofágy byla s použitím testu ELISA měřena tvorba IFN-γ a jeho uvolňování do média. Desky pro test ELISA byly pokryty monoklonální protilátkou z krys zaměřenou na myší IFN-γ (Pharmigen, San Diego, CA, USA) v PBS po dobu 4 hodin při teplotě 4 °C. Jamky byly blokovány PBS obsahující 0,2 % Tween 20 po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Desky byly poté čtyřikrát promyty v PBS obsahující 0,2 % Tween 20 a vzorky byly zředěny 1:2 v kultivačním médiu, v deskách ELISA byly inkubovány přes noc při pokojové teplotě. Desky byly znovu promyty a do každé jamky byla přidána biotinylovaná monoklonální krysí protilátka proti myší IFN-γ (Pharmigen) zředěná na 1 μg/ml in PBS. Desky byly poté inkubovány po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě, promyty a byla

08.11.00

přidána křenová peroxidáza s avidinem D (Sigma A-3151) v ředění 1 : 4000 v PBS. Po další hodině inkubace při pokojové teplotě byly desky promyty a byl přidán substrát OPD. Po 10 minutách byla reakce zastavena 10 % (objemových) HCl. Byla stanovena optická hustota na 490 nm. Bylo pozitivně zjištěno, že frakce získané z obou replik dávaly dvakrát větší OD, než je průměr OD z buněk kultivovaných v médiu samotném.

Jak je ukázáno v tabulce 15, buňky CD8 T ze sleziny myší imunizovaných *M. vaccae* byly cytotoxické pro makrofágy infikované *M. tuberculosis* a nezpůsobovaly rozpad neinfikovaných makrofágů. Buňky CD8 T z neimunizovaných myší nezpůsobovaly rozpad makrofágů. Buňky CD8 T z přirozených nebo neimunizovaných myší tvořily IFN-γ, když byly kultivovány spolu s infikovanými makrofágy. Množství IFN-γ tvořeného při společné kultivaci bylo větší s CD8 T buňkami získanými z *M. vaccae* imunizovaných myší.

Tabulka 15

Účinek s infikovanými a neinfikovanými makrofágy *M. tuberculosis*

	% Specifický rozpad makrofágů		**IFN-γ (ng/ml)**	
CD8 T buňky	neinfikované	infikované	neinfikované	infikované
kontrola	0	0	0,7	24,6
imunizováno *M. vaccae*	0	95	2,2	43,8

Příklad 10

Čištění a charakterizace polypeptidu z kultivačního filtrátu *M. vaccae*

Tento příklad ilustruje přípravu rozpustných proteinů *M. vaccae* z kultivačního filtrátu. Pokud nebude uvedeno jinak, všechny procentní hodnoty v následujícím textu jsou hmotnosti na objem.

M. vaccae (ATCC číslo 15483) bylo kultivováno ve sterilním médiu 90 při teplotě 37 °C. Buňky byly získány centrifugací a přemístěny do sterilního média Middlebrook 7H9 s glukózou při teplotě 37 °C po dobu jednoho dne. Médium bylo podrobeno centrifugaci (k odstranění objemu buněk) a filtrováno přes filtr 0,45 μm do sterilní láhve.

Kultivační filtrát byl zakoncentrován lyofilizací a znovu rozpuštěn v MilliQ vodě. Malé množství nerozpustného materiálu bylo odstraněno filtrací přes membránu 0,45 μm. Kultivační

08.11.00

filtrát byl zbaven solí filtrací přes membránu v 400 ml míchací jednotce Amicon, která obsahovala membránu s hraniční hodnotou (MWCO) pro molekulární hmotnost 3kDa. Tlak byl udržován na 50 psi s použitím dusíku. Kultivační filtrát byl opakovaně zakoncentrován membránovou filtrací a ředěn vodou, dokud nebyla vodivost vzorku menší než 1,0 mS. Tento postup snížil objem 20 l přibližně na 50 ml. Koncentrace proteinů byla zjištěna Bradfordovou proteinovou zkouškou (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Solí zbavený kultivační filtrát byl rozdělěn na frakce iontoměničovou chromatografií na sloupci Q-Sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) (16 x 100 mm) vyváženo 10 mM Tris HCl pufrem pH 8,0. Polypeptidy byly přečištěny elucí s lineárním gradientem NaCl od 0 do 1,0 M ve výše zmíněném systému pufrů. Sloupcový eluent byl sledován na vlnové délce 280 nm.

Skupina polypeptidů eluovaných z iontového výměnného sloupce byla zakoncentrována v 400 ml míchací jednotce Amicon, která obsahovala membránu 3kDa MWCO. Tlak byl udržován na 50 psi s použitím dusíku. Polypeptidy byly opakovaně zakoncentrovány membránovou filtrací a ředěny 1 % glycinem dokud nebyla vodivost vzorku menší než 0,1 mS.

Přečištěné polypeptidy byly pak rozděleny na frakce pomocí přípravné izoelektrické fokusace v zařízení Rotofor (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gradient pH byl stanoven se směsí amfolytů (Pharmacia Biotech) obsahující 1,6 % pH 3,5 až 5,0 amfolytů a 0,4 % pH 5,0 až 7,0 amfolytů. Kyselina octová (0,5 M) byla použita jako anolyt a 0,5 M ethanolaminu jako katolyt. Isoelektrická fokusace byla prováděna při konstantním výkonu 12W po dobu 6 hodin podle návodu výrobce. Bylo získáno 20 frakcí.

Frakce z izoelektrické fokusace byly sloučeny a polypeptidy byly přečištěny na sloupci Vydac C4 (Separations Group, Hesperia, CA, USA) s velikostí pórů 300 Angstremu, velikost částic 5 mikronů (10 x 250 mm). Polypeptidy byly přečištěny elucí na sloupci s lineárním gradientem acetonitrilu (0 % až 80 % objemových) v 0,05 % (objemových) trifluoroctové kyselině (TFA). Rychlost proudění byla 2,0 ml/min a HPLC eluent byl sledován na 220 nm. Frakce obsahující polypeptidy byly sloučeny pro dosažení maximální čistoty jednotlivých vzorků.

Relativně hojné množství frakcí polypeptidů bylo znovu podrobeno chromatografii na sloupci Vydac C4 (Separations Group, Hesperia, CA, USA) s velikostí pórů 300 Angstremu, velikost částic 5 mikronů (4,6 x 250 mm). Polypeptidy byly přečištěny elucí ze sloupce s lineárním gradientem od 20 % do 60 % (objemových) acetonitrilu v 0,05 % (objemových) TFA při rychlosti proudění 1,0 ml/min. Sloupec eluentu byl sledován na 220 nm. Frakce obsahující elucí přečištěné polypeptidy byly sloučeny pro dosažení maximální čistoty jednotlivých vzorků.

08.11.00

Bylo získáno přibližně 20 vzorků s polypeptidy a ty byly analyzována na čistotu na polyakrylamidovém gelu podle postupu Laemmli (Laemmli, U. K., Nature 277:680-685, 1970).

Polypeptidové frakce, které byly významně kontaminovány, byly dále přečištěny s použitím sloupce Mono Q (Pharmacia Biotech), velikost částice 10 mikronů (5 x 50 mm), nebo s použitím sloupce Vydac Diphenyl (Separations Group), velikost pórů 300 Angstremu, velikost částic 5 mikronů (4,6 x 250 mm). Z Mono Q sloupce byly polypeptidy přečištěny elucí s lineárním gradientem od 0 až 0,5 M NaCl v 10 mM Tris HCl pH 8,0. Ze sloupce Vydac Diphenyl byly polypeptidy přečištěny elucí s lineárním gradientem acetonitrilu (20 % až 60 % objemových) v 0,1 % TFA. Rychlost proudění byla 1,0 ml/min a eluent sloupce byl sledována na 220 nm pro oba sloupce. Nejlepší frakce polypeptidů byly sloučena a analyzovány na čistotu na 15 % polyakrylamidovém gelu, jak bylo uvedeno dříve.

Pro určení sekvence byly polypeptidy jednotlivě vysušeny na Biobrene™ (Perkin Elmer/Applied BioSystems Division, Foster City, CA) - s použitím filtru ze skelné vaty. Filtry s polypeptidy byly vloženy do Perkin Elmer/Applied BioSystems Procise 492 proteinového sekvenčního zařízení a polypeptidy byly sekvenovány od amino konce s použitím tradiční Edmanovy chemie. Sekvence aminokyselin byla zjištěna pro každý polypeptid srovnáním časového zpoždění PTH derivátu aminokyseliny oproti odpovídajícímu standardnímu PTH derivátu.

Vnitřní sekvence byly také určeny na nějakých antigenech digerací antigenů s endoproteázou Lys-C, nebo chemickým štěpením antigenu s bromkyanem. Peptidy získané těmito postupy byly odděleny reverzní fázovou HPLC na sloupci Vydac C18 s použitím mobilní fáze 0,05 % (objemových) kyseliny trifluoroctové s gradienem acetonitrilu obsahujícím 0,05 (objemových) TFA (1 %/min). Eluent byl sledován na 214 nm. Hlavní vnitřní peptidy byly určeny podle jejich UV absorbance a jejich sekvence na N konci byly určeny jak bylo uvedeno dříve.

S použitím dříve uvedených postupů bylo izolováno šest rozpustných antigenů *M. vaccae* označených GVc-1, GVc-2, GVc-7, GVc-13, GVc-20 a GVc-22. Určené sekvence N- konce a vnitřní sekvence pro GVc-1 jsou uvedeny v SEQ ID č. : 1, 2 a 3, v tomto pořadí; sekvence N-konce pro GVc-2 je uvedena v SEQ ID č.: 4; vnitřní sekvence pro GVc-7 jsou uvedeny v SEQ ID č. : 5 až 8; vnitřní sekvence pro GVc-13 jsou uvedeny v SEQ ID č. : 9 až 11; vnitřní sekvence pro GVc-20 je uvedena v SEQ ID č. : 12; a sekvence N-konce pro GVc-22 jsou uvedeny v SEQ ID č. : 56 až 59, v tomto pořadí. Každá ze zde popisovaných peptidových sekvencí začíná aminokyselinovým zbytkem, který je pravděpodobně na této pozici v polypeptidu, podle známé specificity štěpení bromkyanem (Met) nebo Lys-C (Lys).

08.11.00

Kromě dříve uvedené přípravné izoelektrické fokusační procedury byly tři další polypeptidy označené jako GVc-16, GVc-18 a GVc-21 izolovány s využitím přípravného čistícího kroku využívajícího elektroforézy (SDS-PAGE) s gelem obsahující dodecylsulfát polyakrylamid sodný. Přesněji, frakce obsahující směsi polypeptidů z přípravného kroku izoelektrického fokusačního přečištění popsaného dříve byly přečištěny přípravnou metodou SDS-PAGE na 15 % polyakrylaminovém gelu. Vzorky byly rozpuštěny v pufru srážejícím vzorek a naneseny na gel. Oddělené proteiny byly přeneseny na polyvinylidenovou difluoridovou (PVDF) membránu pomocí elektroblotingu v 10 mM pufru 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonilová kyselina (CAPS) s pH 11 obsahujícím 10 % (objemových) methanolu. Přenesené proteinové skupiny byly určeny pomocí barvení PVDF membrány Coomassie blue. Oblasti PVDF membrány pokryté nejhojnějšímu druhy polypeptidů byly vyříznuty a přímo vloženy do vzorkové kazety proteinového sekvenčního zařízení Perkin Elmer/Applied BioSystems Procise 492. Proteinové sekvence byly určeny jak bylo uvedeno dříve. Sekvence N konce pro GVc-16, GVc-18 a GVc-21 jsou uvedeny v SEQ ID č.: 13, 14 a 15, v tomto pořadí.

Další antigeny označené jako GVc-12, GVc-14, GVc-15, GVc-17 a GVc-19, byly izolovány s využitím přípravného čistícího kroku SDS-PAGE jako doplňku k chromatografickým postupům uvedeným dříve. Přesněji, frakce obsahující směs antigenů z dříve popsaného čistícího kroku Vydac C4 HPLC byly rozděleny na frakce přípravnou metodo SDS-PAGE na polyakrylamidovém gelu. Vzorky byly rozpuštěny v pufru, který nesráží vzorek, a naneseny na gel. Oddělené proteiny byly přemístěny na PVDF membránu pomocí elektroblotingu v 10 mM CAPS pufru, pH 11 obsahujícím 10 % (objemových) metanolu. Přenesené proteinové skupiny byly určeny barvením PVDF membrány Coomassie blue. Oblasti PVDF membrány pokryté nejhojnějšímu druhy polypeptidů byly vyříznuty a přímo vloženy do vzorkové kazety proteinového sekvenačního zařízení Perkin Elmer/Applied BioSystems Procise 492. Proteinové sekvence byly určeny jak bylo uvedeno dříve. Sekvence N konce pro GVc-12, GVc-14, GVc-15, GVc-17 a GVc-19 jsou uvedeny v SEQ ID č.: 16 až 20, v tomto pořadí.

Všechny dříve uvedené aminokyselinové sekvence byly srovnány se známými aminokyselinovými sekvencemi uvedenými v databázi SwissProt (verze R32) s použitím GeneAssist systému. Nebyly získány žádné významné homologní aminokyselinové sekvence se sekvencemi GVc-2 až GVc-22. Bylo zjištěno, že aminokyselinová sekvence pro GVc-1 má jistou podobnost s dříve určenou sekvencí z *M. bovis* a *M. tuberculosis*. Zejména pro GVc-1 byla zjištěna jistá homologie s *M. tuberculosis* MPT83 a buněčným povrchovým proteinem, stejně jako s MPT70. Tyto proteiny tvoří část skupiny proteinů (Harboe a kol., *Sca. J. Immunol. 42*:46-51, 1995).

08.11.00

Následující studie vedly k izolaci sekvencí DNA pro GVc-13, GVc-14 a GVc-22 (SEQ ID č.142, 107 a 108, v tomto pořadí). Odpovídající předpokládané aminokyselinové sekvence pro GVc-13, GVc-14 a GVc-22 jsou uvedeny v SEQ ID č.143, 109 a 110, v tomto pořadí. Sekvence DNA určena pro úplnou délku genu, který kóduje GVc-13 je uvedena v SEQ ID č.195 s odpovídající předpokládanou aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID č.196.

Další studie s GVc-22 naznačují, že pouze část genu, který kóduje GVc-22 byla klonována. Když byla vložena do expresního vektoru pET16, nedošlo k žádné proteinové expresi. Následné prohledání *M. vaccae* *Bam*HI genomové DNA knihovny s nekompletním genovým fragmentem vedlo k izolaci úplného genu kódujícího GVc-22. Pro rozlišení mezi plnou délkou klonu a částí GVc-22, byl antigen exprimovaný podle úplného genu nazván GV-22B. Určená nukleotidová sekvence genu kódujícího GV-22B a předpokládaná aminokyselinová sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č.: 144 a 145 v tomto pořadí.

Amplifikace primerů AD86 a AD112 (SEQ ID č.60 a 61, v tomto pořadí) byla navržena podle aminokyselinové sekvence GVc-1 (SEQ ID č.1) a genové sekvence *M. tuberculosis* MPT70. S použitím těchto primerů byl amplifikován 310 bp fragment z genomové DNA *M. vaccae* a vklonován do vektoru pBluescript II SK^+ (Stratagene) z *Eco*RV. Sekvence vloženého klonu je uvedena v SEQ ID č.62. Vložená část tohoto klonu byla použita pro prohledání *M. vaccae* genomové DNA knihovny vytvořené v lambda ZAP-Express (Stratagene, La Jolla, CA). Izolovaný klon obsahoval otevřený čtecí rámec homologní s antigenem MPT83 *M. tuberculosis* a byl přejmenován na GV-1/83. Tento gen byl také homologní s s antigenem MPB83 *M. bovis*. Určená nukleotidová sekvence a předpokládaná aminokyselinová sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č.: 146 a 147 v tomto pořadí.

Z aminokyselinové sekvence uvedené v SEQ ID č.: 1 a 2 byly navrženy degenerované oligonukleotidy EV59 a EV61 (SEQ ID č.: 148 a 149 v tomto pořadí).

S použitím PCR byl amplifikován fragment o 100 párech bazí, vklonován do plazmidu pBluescript II SK^+ a sekvecován (SEQ ID č.150) podle standardních procedur (Sambrook et al. *Ibid*). Naklonovaný inzert byl použit k mapování *M. vaccae* genomové DNA knihovny vytvořené v lambda ZAP-Express. Izolovaný klon vykazoval homologii s antigenem *M. tuberculosis* MPT70 a antigenem *M. bovis* MPB70 a byl pojmenován GV-1/70. Určená nukleotidová sekvence a předpokládaná aminokyselinová sekvence pro GV-1/70 jsou uvedeny v SEQ ID č.: 151 a 152 v tomto pořadí. Pro expresi a přečištění byly geny kódující GV1/83, GV1/70, GVc-13, GVc-14 a GV-22B vklonovány do expresního vektoru pET16 (Novagen, Madison, WI). Exprese a purifikace byly provedeny podle návodu výrobce.

08.11.00

Přečištěné polypeptidy byly zkoumány na schopnost způsobit proliferaci T buněk a tvorbu IFN-γ v buňkách periferních krve imunních lidských dárců. O těchto dárcích je známo, že mají pozitivní kožní test PPD (přečištěný proteinový derivát *M. tuberculosis*) a jejich T buňky vykazovaly proliferaci jako reakci na PPD. Darované PBMC a surové rozpustné proteiny z kultivačního filtrátu *M. vaccae* byly kultivovány v médiu obsahujícím RPMI 1640 doplněné 10 % (objemovými) autologního séra, penicilinem (60 μg/ml), streptomycinem (100 μg/ml), a glutaminem (2 mM).

Po 3 dnech bylo odstraněno 50 μl média z každé jamky pro stanovení hladiny IFN-γ, jak bude popsáno dále. Desky byly kultivovány další 4 dny a pak doplněno 1μCi/jamku tritiovaného tymidinu na dalších 18 hodin, byl z nich získán tritiový doplněk určený s použitím scintilačního počitadla. Bylo pozitivně zjištěno, že frakce stimulující proliferaci získané z obou replik způsobily dvakrát větší proliferaci, než je proliferace pozorovaná u buněk kultivovaných v médiu samotném.

IFN-γ bylo měřeno s použitím testu ELISA. Desky pro test ELISA byly pokryty monoklonální myší protilátkou zaměřenou proti lidskému IFN-γ (Endogen, Wobural, MA) 1 μg/ml fosfátový pufr se solankou (PBS) po dobu 4 hodin při teplotě 4 °C.

Jamky byly blokovány PBS obsahujícím 0,2 % Tween 20 po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Desky pak byly čtyřikrát promyty PBS/0,2% Tween 20 a vzorky byly zředěny 1 : 2 v kultivačním mediu v deskách ELISA byly ikubovány přes noc při pokojové teplotě. Desky byly opět promyty a do každé jamky bylo přidáno biotinilované polyklonální králičí sérem proti lidským IFN-γ (Endogen), zředěné na 1 μg/ml v PBS. Desky pak byly inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě, promyty, byla přidána křenová peroxidáza s avidinem A (Vector Laboratories, Burlingame, CA) v ředění 1 : 4000 v PBS. Po další hodině inkubace při pokojové teplotě byly desky promyty a byl přidán ortofenylendiaminový (OPD) substrát. Reakce byla zastavena po 10 minutách 10 % (objemových) HCl. Optická hustota (OD) byla určena na 490 nm. Bylo pozitivně zjištěno, že frakce získané z obou replik mají dvakrát větší OD, než je průměrné OD u buněk kultivovaných v médiu samotném.

Příklady polypeptidů, které obsahují sekvence stimulující proliferaci monoklonálních (PBMC) T buněk periferní krve a tvorbu IFN-γ jsou uvedeny v tabulce 16, kde (-) znamená nedostatečnou účinnost, (+/-) znamená polypeptidy s výsledkem méně než dvakrát vyšším než je účinnost prostředí kontrolního média (+) znamená polypeptidy dvakrát až čtyřikrát účinnější než je kontrolní médium a (++) znamená polypeptidy, které mají účinnost větší než čtyřnásobnou účinnost než prostředí.

08.11.00

Tabulka 16

antigen	proliferace	IFN-γ
GVc-1	++	+/-
GVc-2	+	++
GVc-7	+/-	-
GVc-13	+	++
GVc-14	++	+
GVc-15	+	+
GVc-20	+	+

Příklad 11

Přečištění a charakterizace polypeptidů z kultivačního filtrátu *M. vaccae* pomocí elektroforézy na 2 dimenzionálním polyakrylamicovém gelu.

Rozpustné proteiny *M. vaccae* byly izolovány z kultivačního filtrátu s použitím elektroforézy na dvourozměrném polyakrylamidovém gelu, jak bude popsáno dále. Nebude-li uvedeno jinak, všechny procentuální hodnoty v následujícím textu jsou hmotnosti na objem.

M. vaccae (ATCC číslo 15483) bylo kultivováno ve sterilním Mediu 90 při teplotě 37 °C. *M. tuberkulosis* kmen H37Rv (ATCC číslo 27294) byl kultivován ve sterilním médiu Middlebrook 7H9 s Tween 80 a přísadami oleová kyselina/ albumin/ dextróza/ kataláza (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Buňky byly získány centrifugací a přemístěny do sterilního média Middlebrook 7H9 s glukózou při teplotě 37 °C na dobu jednoho dne. Medium bylo pak podrobeno centrifugaci (k odloučení obsahu buněk) a filtrováno přes 0,45 μm filtr do sterilních lahví. Kultivační filtrát byl zakoncentrován lyofilizací, znovu zředěn MilliQ vodou. Malé množství nerozpustného materiálu bylo odstraněno filtrací přes 0,45 μm membránový filtr. Kultivační filtrát byl zbaven solí filtrací přes membránu v 400 ml míchací jednotce Amicon, která obsahovala membránu 3kDa (MWCO). Tlak byl udržován na 60 psi s použitím dusíku. Kultivační filtrát byl opakovaně zakoncentrován membránovou filtrací a ředěn vodou, dokud nebyla vodivost vzorku menší než 1,0 mS. Tento postup snížil objem 20 l přibližně na 50 ml. Koncentrace proteinů byla zjištěna Bradfordovou proteinovou zkouškou (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Solí zbavený kultivační filtrát byl rozdělěn na frakce iontovou výměnnou chromatografií na sloupci Q-Sepharose (Pharmacia Biotech) (16 x 100 mm) vyváženo 10 mM Tris HCl

08.11.00

pufrem pH 8,0. Polypeptidy byly přečištěny elucí s lineárním gradientem NaCl od 0 do 1,0 M ve výše zmíněném systému pufrů. Sloupcový eluent byl sledován na vlnové délce 280 nm.

Skupina polypeptidů přečištěných elucí z iontového výměnného sloupce byla rozdělena na frakce přípravnou elektroforézou na 2D gelu. Vzorky obsahující 200 až 500 μg polypeptidu byly upraveny 8M močovinou a umístěny do sloupců polyakrylamidového gelu (průměr 2 mm, délka 150 mm, pH 5 až 7) pro izoelectrickou fokusaci. Po kroku izoelectrické fokusace byly gely prvního rozměru vyváženy snížením pufru a umístěny do gelů druhého rozměru (16 % polyakrylamid). Polypeptidy ze separace druhého rozměru byly přemístěny na PVDF membrány pomocí elektroblotingu v 10 mM CAPS pufru pH 11 obsahujícím 10 % (objemových) metanolu. PVDF membrány byly barveny na proteiny Coomassie blue. Oblasti PVDF obsahující polypeptidy byly vyříznuty a přímo vloženy do vzorkové kazety proteinového sekvenačníhp zařízení Perkin Elmer/Applied BioSystems Procise 492. Polypeptidy byly sekvencovány z amino- konce s použitím tradiční Edmanovy chemie. Aminokyselinová sekvence každého polypeptidu byla určena srovnáním zpoždění PTH derivátu aminokyseliny s odpovídajícím standardem pro PTH derivát. Pomocí těchto postupů bylo izolováno dvanáct polypeptidů označených jako: GVs-1, GVs-3, GVs-4, GVs-5, GVs-6, GVs-8, GVs-9, GVs-10, GVs-11, GV-34 a GV-35. Sekvence N- konce určené pro tyto polypeptidy jsou uvedeny v SEQ ID č.: 21 až 29, 63 a 64, v tomto pořadí. Pro rozšíření aminokyselinové sekvence dříve získané pro GVs-9 bylo přečištěné více proteinů s použitím dříve uvedených postupů. Rozšířená aminokyselinová sekvence pro GVs-9 je uvedena v SEQ ID č.65. Výsledkem dalších studií bylo izolování DNA sekvence pro GVs-9 (SEQ ID č.111) a GV-35 (SEQ ID č.155). Odpovídající předpokládané aminokyselinové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č.112 a 156, v tomto pořadí. Rozšířená DNA sekvence pro GVs-9 je uvedena v SEQ ID č.153 a odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č.154. Předpokládaná aminokyselinová sekvence pro GVs-9 byla upravena v SEQ ID č.197. Všechny tyto aminokyselinové sekvence byly srovnány se známými aminokyselinovými sekvencemi v databázi SwissProt (verze R35 plus aktualizace). Nebyly zjištěny žádné významné homologní úseky kromě GVs-3, GVs-4, GVs-5 a GVs-9. GVs-9 vykazovalo určitou homologii se dvěma dříve uvedenými proteiny *M. tuberkulosis*, konkrétně s prekurzorem kutinázy *M. tuberkulosis* a s hypotetickým 22,6 kDa proteinem *M. tuberkulosis*. GVs-3, GVs-4 a GVs-5 opět vykazovaly jistou podobnost s 85A a 85B proteiny *M. leprae* (SEQ ID č. : 30 a 31, v tomto pořadí), *M. tuberkulosis* (SEQ ID č. : 32 a 33, v tomto pořadí) a *M. bovis* (SEQ ID č. : 34 a 35, v tomto pořadí) a s antigenem 85C proteinu z *M. leprae* (SEQ ID č.36) a *M. tuberkulosis* (SEQ ID č.37).

08.11.00

Příklad 12

Postup klonování DNA pro *M. vaccae* antigenu série 85.

Pokusné vzorky pro antigeny 85A, 85B, a 85C byly připraveny polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s použitím degenerovaných oligonukleotidů (SEQ ID č. : 38 a 39) navržených pro oblasti genomových sekvencí antigenu 85, které se uchovávají mezi členy rodiny v daných mykobakteriálních druzích a mezi mykobakteriálními druhy. Tyto oligonukleotidy byly použity za méně přísných podmínek k amplifikaci cílové sekvence z genomové DNA *M. vaccae*. Vhodná velikost, 485 párů bazí, byla určena, přečištěna a vklonována do T-koncové pBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA). Dvacet čtyři jednotlivých kolonií bylo náhodně testováno na přítomnost antigenu 85 jako výsledku PCR, pak sekvencováno s použitím automatického sekvenačního zařízení Perkin Elmer/Applied Biosystems model 377 a M13-bazických primerů, T3 a T7. Hledání homologních sekvencí v genové bance ukázalo, že dvacet tři klonů obsahuje inzertovanou sekvenci, která vykazuje významnou homologii s publikovanými geny antigenu 85 z *M. tuberkulosis* a *M. bovis*. Přibližně polovina byla více homologní s genovou sekvencí antigenu 85C a zbytek byl více podobný sekvenci antigenu 85B. Nadto byly tyto dvě předpokládané genomové sekvence antigenu 85 *M. vaccae* z 80 % homologní navzájem. Pro tuto vysokou podobnost byl tento PCR fragment antigenu 85 vybrán pro prohlížení genomové knihovny *M. vaccae* při nízkém rozlišení pro všechny tři geny antigenu 85.

Genomová knihovna *M. vaccae* byla zpracována lambda Zap-Express (Stratagene, La Jolla, CA) klonováním *Bam*HI částečně uspořádané genomové DNA do jednoduše uspořádaného λ vektoru, s 3,4 x 10^5 , čímž vznikají nezávislé plakety tvořící jednotky. Pro zamýšlené prohledávání bylo dvacet sedm tisíc plaket z této neamplifikační knihovny pokryto při nízkém rozlišení na osm desek 100 cm^2 . Pro každou desku byl vzat dvojitý plakový lift na Hybond-N^+ nylonovou membránu (Amersham International, United Kingdom) a hybridizován za podmínek snížené citlivosti (55 ^oC) pro výrobu antigenu 85C radiem označeného produktu PCR. Auroradiografie ukázala, že sedmdesát devět plaket za těchto podmínek shodně hybridizovalo na vzorek antigen 85C. Třináct pozitivně hybridizujících plaket bylo náhodně vybráno pro další analýzu a odstraněno z desek knihovny, každý pozitivní klon byl použit k tvorbě sekundárních prohledávacích desek obsahujících asi 200 plaket. Duplikované lifty každé desky byly vzaty s použitím Hybond-N^+ nylonové membrány a hybridizovány za podmínek použitých v předchozím prohlížení. Namnožené pozitivně hybridizující plakety byly zjištěny na každé ze třinácti prohledávaných desek. Pro další analýzu byly vzaty z každé sekundární desky dva dobře izolované pozitivní fágy. S použitím *in vitro* excise bylo

08.11.00

konvertováno do plazmidu fágu dvacet šest plaket a restrikčně mapováno. Na základě tohoto mapování bylo možno rozdělit klony do čtyř tříd. Pomocí automatického sekvenačního zařízení Perkin Elmer/Applied Biosystems model 377 byly získány údaje o sekvenci 5' a 3' konců inzertovaných úseků několika reprezentantů každé skupiny a primery T3 a T7. Sekvenční homologie byla určena s použitím analýzy BLASTN podle databáze EMBL. Dvě z těchto sad klonů byly homologní s geny antigenu 85A *M. bovis* a *M. tuberculosis*, každý obsahoval buď 5' nebo 3' konec genu *M. vaccae* (Tento gen byl rozštěpen během tvorby knihovny protože obsahuje vnitřní úsek *Bam*HI). Bylo zjištěno, že zbývající klony obsahují sekvence homologní s antigeny 85B a 85C ze skupiny mykobakteriálních druhů. K určení zbývajících nukleotidových sekvencí pro každý gen byly vytvořeny a sekvencovány vhodné subklony. Překrývající se sekvence byly zarovnány pomocí počítačového programu DNA Strider. Zjištěné DNA sekvence pro antigeny 85A, 85B a 85C *M. vaccae* jsou uvedeny v SEQ ID č. : 40 až 42, v tomto pořadí, předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. : 43 až 45, v tomto pořadí.

Antigeny GVs-3 a GVs-5 *M. vaccae* byly exprimovány a přečištěny jak je uvedeno dále. Amplifikační primery byl navrženy z inzertovaných sekvencí of GVs-3 a GVs-5 (SEQ ID č.40 a 42, v tomto pořadí) s použitím sekvenčních údajů ve směru předpokládané vedoucí sekvence na 3' konci klonu. Sekvence primerů pro GVs-3 jsou uvedeny v SEQ ID č. 66 a 67 a sekvence primerů pro GVs-5 jsou uvedeny v SEQ ID č. 68 a 69. A *Xho*I restrikční místo bylo přidáno k primerům pro GVs-3, a *Eco*RI a *Bam*HI restrikční místa byla přidána k primerům pro GVs-5 pro výhodné klonování.

Následující amplifikace z genomové DNA *M. vaccae*, fragmenty byly vklonovány do vhodného místa pProEX HT pro prokaryotického expresního vektoru (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD) a podrobeny sekvencování pro potvrzení správného čtecího rámce a orientace. Exprese a purifikace rekombinantního proteinu byla provedena podle návodu výrobce.

Exprese fragmentu *M. vaccae* antigenu GVs-4 (antigen 85B homologní) byla provedena jak bude uvedeno dále. Dříve uvedené primery AD58 a AD59 byly použity pro amplifikaci fragmentu 485 párů bazí z genomové DNA *M. vaccae*. Tento fragment byl přečištěn gelem podle standardních postupů a vklonován do pBluescript z *Eco*RV obsahujícího přidané dTTP zbytky. Tyto sekvence bazí inzertovaného úseku z pěti klonů byly určeny a bylo zjištěno, že jsou identické. Tyto inzertované úseky měly nejvyšší homologii s to Ag85B z *M. tuberkulosis*. Inzertovaný úsek z jednoho z klonů byl vklonován do *Eco*RI/*Xho*I míst pProEX HT prokaryotického expresního vektoru (Gibco BRL), exprimovány a purifikovány podle návodu výrobce. Tento klon byl přejmenován na GV-4P, protože pouze část genu byla exprimována.

08.11.00

Aminokyselinová a DNA sekvence pro neúplný klon GV-4P jsou uvedeny v SEQ ID č. 70 a 106, v tomto pořadí.

Podobné klonování GV-4P, amplifikace primerů AD58 a AD59, byl k amplifikaci použit 485 bp fragment z klonu obsahujícího GVs-5 (SEQ ID NO:42). Tento fragment se naklonoval do expresního vektoru pET16 a byl nazván GV-5P. Stanovená nukleotidová sekvence a předpokládaná sekvence aminokyseliny GV-5P jsou poskytnuty v SEQ ID č: 157 a 158, v tomto pořadí.

S použitím postupů podobných těm, které byly popsány dříve, byly v následujících studiích znovu vklonovány GVs-3, GV-4P a GVs-5 do alternativního vektoru pET16 (Novagen, Madison, WI).

Schopnost přečištěných rekombinantních GVs-3, GV-4P a GVs-5 stimulovat proliferaci T buněk a tvorbu interferonu-γ v lidských PBL z PPD-positivních, zdravých dárcích byla testována jak bude uvedeno dále. Výsledky této zkoušky jsou uvedeny v tabulce 17, kde (-) znamená nedostatečnou účinnost, (+/-) znamená polypeptidy s výsledkem méně než dvakrát vyšším než je účinnost prostředí kontrolního média (+) znamená polypeptidy dvakrát až čtyřikrát účinnější než je kontrolní médium a (++) znamená polypeptidy, které mají účinnost větší než čtyřnásobnou účinnost vzhledem k prostředí.

Tabulka 17

	dárce G97005		dárce G97006		dárce G97007		dárce G97008		dárce G97009		dárce G97010	
	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ
GVs-3	++	+	N	N	++	++	++	++	++	+/-	+	++
GV -4P	+	+/-	N	N	+	++	++	++	+/-	+/-	+/-	++
GVs-5	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	+	++

N - neurčeno

Příklad 13

Postup klonování DNA pro antigeny *M. vaccae*

Testovací vzorek 84 párů bazí pro antigen GVc-7 *M. vaccae* byl amplifikován s použitím degenerovaných oligonukleotidů, které kódují aminokyselinovou sekvenci GVc-7 (SEQ ID č: 5-8). Tento testovací vzorek byl použit k prohlížení knihovny genomové DNA *M. vaccae* jak bylo popsáno v příkladu 12. Zjištěná nukleotidová sekvence pro GVc-7 je uvedena v SEQ ID č. 46 a předpokládaná aminokyselinová sekvence v SEQ ID č. 47. Srovnáním těchto sekvencí se sekvencemi v databance byla zjištěna homologie s předpokládaným membránovým proteinem 15,8 kDa *M. tuberkulosis*.

08.11.00

Sekvence SEQ ID č. 46 byla použita k navržení amplifikačních primerů (uvedeno v SEQ ID č.71 a 72) pro expresní klonování genu GVc-7 s použitím údajů o sekvenci ve směru od předpokládané vedoucí sekvence. Pro výhodné klonování bylo k primerům přidáno restrikční místo *Xho*I . Následně po amplifikaci z genomové DNA *M. vaccae* byly fragmenty vklonovány do místa *Xho*I prokaryotického expresního vektoru pProEX HT (Gibco BRL) a podrobeny sekvencování pro potvrzení správného čtecího rámce a orientace. Exprese a přečištění fúzního proteinu bylo provedeno podle návodu výrobce. V následných studiích byl GVc-7 znovu vklonován do vektoru pET16 (Novagen).

Schopnost přečištěného rekombinantního GVc-7 stimulovat proliferaci T buněk a stimulovat tvorbu interferonu-γ v lidských PBL z PPD pozitivních zdravých dárců byla testována, jak bylo uvedeno dříve. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 18, kde (-) znamená nedostatečnou účinnost, (+/-) znamená polypeptidy s výsledkem méně než dvakrát vyšším než je účinnost prostředí kontrolního média (+) znamená polypeptidy dvakrát až čtyřikrát účinnější než je kontrolní médium a (++) znamená polypeptidy, které mají účinnost větší než čtyřnásobnou vzhledem k prostředí.

Tabulka 18

Dárce	Proliferace	Interferon-γ
G97005	++	+/-
G97008	++	+
G97009	+	+/-
G97010	+/-	++

Redundantní oligonukleotidový testovací vzorek (SEQ ID č. 73; na který se odkazujeme jako na MPG15) byl navržen pro peptidovou sekvenci GVs-8 uvedenou v SEQ ID č. 26 a použit k prohledání knihovny genomové DNA *M. vaccae* s použitím standardních postupů. Byly izolovány dva genomové klony obsahující geny kódující čtyři různé antigeny. Zjištěné sekvence DNA pro GVs-8A (přejmenovaná na GV-30), GVs-8B (přejmenovaná na GV-31), GVs-8C (přejmenovaná na GV-32) a GVs-8D (přejmenovaná na GV-33) jsou uvedeny v SEQ ID č.: 48-51, v tomto pořadí, s odpovídajícími aminokyselinovými sekvencemi jak je uvedeno v SEQ ID č.: 52-55, v tomto pořadí. GV-30 obsahuje oblasti vykazující jistou podobnost se známými prokaryotickými valyl-tRNA syntetázami; GV-31 vykazuje jistou podobnost s aspartát semialdehyd dehydrogenázou *M. smegmatis;* GV-32 vykazuje jistou podobnost s genem pro folylpolyglutamát syntázu *H. influenza.* GV-33 obsahuje otevřený čtecí rámec, který vykazuje

08.11.00

jistou podobnost se sekvencí dříve zjištěnou v *M. tuberculosis* a *M. leprae,* ale úplná funkce nebyla zjištěna.

Určená částečná DNA sekvence pro GV-33 je uvedena v SEQ ID č.74 a odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č.75. Sekvenční údaje z 3' konce klonu vykazují homologii s dříve určeným vnějším membránovým proteinem 40,6 kDa *M. tuberculosis.* Následné studie vedly k izolaci úplné sekvence DNA pro GV-33 (SEQ ID č.193). Odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č.194.

Gen kódující GV-33 byl amplifikován z genomové DNA *M. vaccae* s primery založenými na určené nukleotidové sekvenci. Tento DNA fragment byl vklonován do pBluescript II SK^+ (Stratagene) odvozeného z *Eco*Rv a poté přenesen do expresního vektoru pET16. Rekombinantní protein byl přečištěn podle návodu výrobce.

Schopnost přečištěného rekombinantního GV-33 stimulovat proliferaci T buněk a stimulovat tvorbu interfernonu γ v lidské PBL byla testována jak bylo popsáno dříve.
Výsledky jsou ukázány v tabulce 19, kde (-) znamená nedostatečnou účinnost, (+/-) znamená polypeptidy s výsledkem méně než dvakrát vyšším než je účinnost prostředí kontrolního média (+) znamená polypeptidy dvakrát až čtyřikrát účinnější než je kontrolní médium a (++) znamená polypeptidy, které mají účinnost větší než čtyřnásobnou vzhledem k prostředí.

Tabulka 19
Stimulační aktivita polypeptidů

Dárce	Proliferace	Interferon-γ
G97005	++	+
G97006	++	++
G97007	-	+/-
G97008	+/-	-
G97009	+/-	-
G97010	+/-	++

Příklad 14

Izolace proteinů z DD-*M. vaccae*

Baktérie *M. vaccae* byly kultivovány, peletizovány a autoklávovány jak bylo uvedeno v příkladu 1. Kultivační filtráty živého *M. vaccae* odpovídají supernatantu, který vznikl po 24 hodinové kultivaci *M. vaccae* v médiu 7H9 s glukózou. Delipidovaná forma *M. vaccae* byla

připravena sonikací autoklávovaného *M. vaccae* ve čtyřech třicetisekundových dávkách na ledu s použitím Virsonic sonicator (Virtis, Disa, USA). Materiál byl poté centrifugován (9000 otáček/minutu, 20 minut, rotor JA10, brzda = 5). Výsledný pelet byl suspendován ve 100 ml směsi chloroform/metanol (2:1), inkubován za pokojové teploty po dobu 1 hodiny, znovu centrifugován a extrakce ze směsi chloroform/metanol byla opakována. Centrifugací získaný pelet byl vysušen ve vakuu, zvážen a znovu suspendován v PBS 50 mg (suchá váha) na ml jako *M. vaccae* zbavené lipidů.

Glykolipidy byly odstraněny z přípravku *M. vaccae* zbaveného lipidů refluxí v 50 % (objemových) etanolu po dobu 2 hodin. Nerozpustný materiál byl vyloučen centrifugací (10,000 ot/min, rotor JA20, 15 minut, brzda = 5). Extrakce refluxí s 50 % (objemovými) etanolu byla opakována ještě dvakrát. Nerozpustný materiál byl vyloučen centrifugací a promyt v PBS. Proteiny byly extrahovány opětovným suspendováním peletu v 2 % SDS v PBS při teplotě 56 °C po dobu 2 hodin. Nerozpustný materiál byl vyloučen centrifugací a extrakce s 2 % SDS/PBS při teplotě 56 °C byla opakována ještě dvakrát. Vzniklé SDS extrakty byly ochlazeny na 4 °C, sraženina SDS byla odstraněna centrifugací (10,000 ot/min, rotor JA20, 15 minut, brzda = 5). Proteiny byly vysráženy ze supernatantu přidáním stejného objemu acetonu a inkubováním při teplotě -20 °C po dobu 2 hodin. Vysrážené proteiny byly sloučeny centrifugací, promyty v 50 % objemových acetonu, vysušeny ve vakuu, a rozpuštěny v PBS.

SDS extrahované proteiny získané z DD-*M. vaccae* byly analyzovány elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Po barvení stříbrem byly pozorovány tři hlavní pásy. V následujících pokusech byla analyzována větší množství SDS extrahovaných proteinů z DD-*M.vaccae* elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Při barvení Coomassie blue se objevilo několik pásů. Protein reprezentovaný pásem průměrné molekulární hmotnosti 30 kDa byl označen jako GV-45. Určená sekvence N konce pro GV-45 je uvedena v SEQ ID č.187. Protein průměrné molekulární hmotnosti 14 kDa byl označen GV-46. Určená aminokyselinová sekvence N konce pro GV-46 je uvedena v SEQ ID č.208.

V následujících studiích bylo připraveno více SDS extrahovaných proteinů popsaných dříve, příprava: SDS-PAGE na BioRad Prep Cell (Hercules, CA). Frakce odpovídající rozsahům molekulární hmotnosti byly vysráženy trichloroctovou kyselinou pro odstranění SDS před testováním na účinnost látky posilující účinek antigenu ve zkoušce na specifickou cytotoxickou odpověď proti ovalbuminu u myší C57BL/6 jak bylo uvedeno dříve. Účinnost látky posilující účinnost antigenu byla nejvyšší ve frakcích s molekulární hmotností 60 až 70 kDa. Nejhojnější protein v tomto velikostním rozsahu byl přečištěn pomocí SDS-PAGE na polyvinyliden-difluoridové (PVDF) membráně a poté sekvencován. Sekvence prvních deseti

08.11.00

aminokyselinových zbytků je uvedena v SEQ ID č.:76. Porovnáním těchto sekvencí se sekvencemi v genové bance, jak bylo popsáno dříve, byla zjištěna homologie s genem proteinu tepelného šoku 65 (GroEL) z *M. tuberculosis* naznačující, že tento protein je *M. vaccae* členem skupiny proteinů GroEL.

Expresní knihovna genomové DNA *M. vaccae* v *Bam*H1-lambda ZAP-Express (Stratagene) byla prohledána s použitím séra z cynomolgních? opic imunizovaných proteiny vylučovanými *M. vaccae* připravenými, jak bylo uvedeno dříve. Pozitivní plakety byly určeny s použitím kolorimetrického systému. Tyto plakety byly podle standardních postupů opakovaně prohledávány dokud nebyly čisté. pBK-CMV plazmid fágu 2-1 obsahující inzertovaný úsek byl vyříznut z lambda ZAP Express (Stratagene) vektoru za přítomnosti ExAssist pomocného fágu podle návodu výrobce. Sekvence bází 5' konce inzertovaného úseku tohoto klonu, dále označovaného jako GV-27, byla určena s použitím sekvencování Sanger s fluorescenčními primery na automatickém sekvenačním zařízení Perkin Elmer/Applied Biosystems Division. Určená nukleotidová sekvence částečného *M. vaccae* GroEL homologního klonu GV-27 je uvedena v SEQ ID č. 77 a předpokládaná aminokyselinová sekvence v SEQ ID č. 78. Bylo zjištěno, že tento klon je homologní s *M. tuberculosis* GroEL. Částečná sekvence proteinu 65 kDa tepelného šoku *M. vaccae* byla publikována Kapur a kol. (*Arch. Pathol. Lab. Med. 119* : 131 - 138, 1995). Nukleotidová sekvence fragmentu podle Kapur a kol. je uvedena v SEQ ID č. 79 a předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 80.

V následných studiích byly získány prodloužené (plné délky s výjimkou předpokládaných 51 koncových nukleotidů) DNA sekvence GV-27 (SEQ ID č.113). Odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 114. Následující studie vedly k izolaci úplné sekvence DNA GV-27 (SEQ ID č. 159). Odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 160. Ukázalo se, že GV-27 je z 93,7 % identický s *M. tuberculosis* GroEL na úrovni aminokyselin.

Dva peptidové fragmenty obsahující sekvence N konce (dále označované jako GV-27A) a karboxylové koncové sekvence GV-27 (dále označované jako GV-27B) byly připraveny s použitím postupů dobře známým odborníkům v dané oblasti. Nukleotidové sekvence pro GV-27A a GV-27B jsou uvedeny v SEQ ID č. 115 a 116, v tomto pořadí, a odpovídající aminokyselinové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č. 117 a 118. Následné studie vedly k izolaci prodloužené DNA sekvence pro GV-27B. Tato sekvence je uvedena v SEQ ID č. 161, a odpovídající aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 162. Sekvence GV-27A je z 95,8 % identická se sekvencí *M. tuberculosis* GroEL a obsahuje kratší sekvenci *M. vaccae* podle Kapur a kol., jak bylo uvedeno dříve. Sekvence pro GV-27B vykazuje asi 92,2 % shodu

08.11.00

s odpovídající oblastí *M. tuberculosis* HSP65. pBK-CMV plazmid fágu 3-1 byl izolován podle stejného návodu jako GV-27.

pBK-CMV plazmid fágu 3-1 byl izolován podle stejného návodu, jako GV-27. Antigen kódovaný touto DNA byl pojmenován GV-29. Určené nukleotidové sekvence 5' konce a 3' konce genu jsou uvedeny v SEQ ID č.: 163 a 164 v tomto pořadí a odpovídající předpokládané aminokyselinové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č.: 165 a 166 v tomto pořadí. GV-29 vykazuje homologii k amidolyáze močoviny kvasninek.

Určená DNA sekvence pro úplný gen kódující GV-29 je uvedena v SEQ ID č.198, a odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 199. DNA kódující GV-29 byla vklonována do vektoru pET16 (Novagen, Madison, WI) pro expresi a přečištění podle standardních postupů.

Příklad 15

Postup klonování DNA pro antigeny *M. vaccae* GV-23, GV-24, GV-25, GV-26, GV-38A A GV-38B

M. vaccae (ATCC číslo 15483) bylo pěstováno ve sterilním médiu 90 při teplotě 37 °C po dobu 4 dní a získáno centrifugací. Buňky byly znovu suspendovány v 1 ml Trizol (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, Maryla) a RNA byla extrahována podle standardního návodu výrobce. *M. tuberculosis* kmen H37Rv (ATCC číslo 27294) byl pěstován ve sterilním médiu Middlebrook 7H9 medium s Tween 80™ a olejovou kyselinou/ albumin/dextróza/ aditivní kataláza (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) při teplotě 37 °C a získána za vhodných laboratorních bezpečnostních podmínek. Buňky byly znovu suspendovány v 1 ml Trizolu (Gibco BRL) a RNA byla extrahována podle standardního návodu výrobce.

Úplná RNA *M. tuberculosis* a *M. vaccae* byla ochuzena o ribozomální RNA (rRNA) jednotek 16S a 23S hybridizací frakce úplné RNA na oligonukleotidy AD10 a AD11 (SEQ ID č.81 a 82), které jsou komplementární k rRNA *M. tuberculosis*. Tyto oligonukleotidy byly navrženy z mykobakteriální sekvence rRNA jednotky 16S popsané v Bottger (*FEMS Microbiol. Lett. 65*:171-176, 1989) a ze sekvence uložené v databankách. Ochuzení bylo provedeno hybridizací úplné RNA na oligonukleotidy AD10 a AD11 znehybněné na nylonových membránách (Hybond N, Amersham International, United Kingdom). Hybridizace byla opakována, dokud nebyly rRNA pásy viditelné na agarózovém gelu barveném etidium - bromidem. Oligonukleotid AD12 (SEQ ID č.83) skládající se z 20 zbytků dATP byl napojen na 3' konce obohacené mRNA frakce s použitím RNA ligázy. První řetězcová cDNA syntéza byla

08.11.00

provedena podle standardních postupů s použitím oligonukleotidu AD7 (SEQ ID č.: 84) obsahujícího poly(dT) sekvenci.

cDNA *M. tuberculosis* a *M. vaccae* byly použity jako šablony pro jednostranně specifickou PCR (3S-PCR). Pro tento postup byl navržen degenerovaný oligonukleotid AD1 (SEQ ID NO:85) založený na uskladněné vedoucí sekvenci a sekvenci membránového proteinu. Po 30 cyklech amplifikace s použitím primeru AD1 jako 5' primeru a AD7 jako 3' primeru byly produkty odděleny na gelu močovina/polyakrylamid. DNA pásy specifické pro *M. vaccae* byly vyříznuty a znovu amplifikovány s použitím primerů AD1 a AD7. Po gelovém přečištění byly pásy vklonovány do pGEM-T (Promega) a byla určena bázová sekvence.

Vyhledávání s určenými nukleotidy a předpokládanými aminokyselinovými sekvencemi pásu 12B21 (SEQ ID č.: 86 a 87, v tomto pořadí) ukázalo homologii ke genu *pota E.coli,* který kóduje ATP vázající protein ABC transportního komplexu spermidin/putrescin popsaného v Furuchi et al. (*Jnl. Biol. Chem. 266*: 20928-20933, 1991). Transportní komplex spermidin/putrescin *E.coli* se skládá ze čtyř genů a je členem skupiny ABC transportérů. ABC transportéry (ATP-vazebná kazeta) se běžně skládají ze čtyř genů: ATP vázající gen, periplasmický nebo substrát vázající gen a dva transmembránové geny. Transmembránové geny kódují proteiny charakteristické tím, že každý z nich má šest membrány spojujících oblastí.

Homology (podle podobnosti) tohoto ABC transportéru byly zjištěny v genomech *Haemophilus influenza* (Fleischmann a kol. *Science 269* :496-512, 1995) a *Mycoplasma genitalium* (Fraser, a kol. *Science, 270*:397-403, 1995).

Knihovna genomové DNA *M. vaccae* vytvořená v BamH1-štěpená lambda ZAP Express (Stratagene) byla sondována s radioaktivně označeným pásem o 238 párech bází 12B21 podle standardních postupů. Plaketa byla přečišťována do dosažení čistoty opakovaným prohledáváním a byl identifikován plazmid fágu obsahující 4,5 kb vloženou sekvenci s použitím Southern blotingu a hybridizace. Nukleotidová sekvence homologu úplné *M. vaccae pota* (ATP vázající protein) byla zjištěna subklonováním 4,5 kb fragmentu a bázového sekvencování. Gen se skládal z 1449 párů bází včetně 5' oblasti, kde neproběhla translace o délce 320 párů bází obsahující pravděpodobně -10 a -35 promotorových elementy.

Nukleotidová a předpokládaná aminokyselinová sekvence homologu *M. vaccae pota* jsou uvedeny v SEQ ID č. 88 a 89, v tomto pořadí.

Nukleotidová sekvence genu *M. vaccae pota* byla použita pro návrh primerů EV24 a EV25 (SEQ ID č. 90 a 91) pro expresní klonování. Amplifikovaný DNA fragment byl vklonován do prokaryotického expresního systému pProEX HT (Gibco BRL) a přidáním 0,6 mM isopropylthio-β-galaktosidu (IPTG) byla indukována exprese ve vhodné hostitelské *E.coli.*

08.11.00

Rekombinantní protein byl pojmenován GV-23 a přečištěn z inkluzních tělísek podle návodu výrobce. V následných studiích byl GV-23 (SEQ ID č. 88) znovu klonován do alternativního vektoru pET16 (Novagen). Aminokyselinová sekvence SEQ ID č. 89 má ATP vazebné místo na zbytcích 34 až 41. Na zbytcích 166 až 163 SEQ ID č.89 je uchována oblast, kterou lze nalézt ve skupině proteinů ATP transportérů. Z těchto zjištění se lze domnívat, že GV-23 je ATP vazebný protein.

Subklon 322 bp *Sal*1-*Bam*H1 na 3' konci vložené sekvence 4,5 kb popsaný dříve vykazuje homologii s genem *potd* (periplasmický protein) spermidin/putrescin ABC transportního komplexu *E. coli.* Nukleotidová sekvence tohoto subklonu je uvedena v SEQ ID č.:92. Pro určení tohoto genu byl radiem označený vložený úsek tohoto subklonu použit pro prohledání knihovny genomové DNA *M. vaccae* vytvořené v *Sal*1-místa lambda Zap Express (Stratagene) s použitím standardních postupů. Byl určen klon jehož 1342 párů bází vykazovalo homologii s *potd* genem *E. coli. Potd* homolog *M. vaccae* byl určen subklonováním a bázovým sekvencováním. Určený nukleotid a předpokládaná aminokyselinová sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č.93 a 94.

Pro expresní klonování byly navrženy primery EV-26 a EV-27 (SEQ ID č.: 95-96) z určeného *potd* homologu *M. vaccae.* Amplifikovaný fragment byl vklonován do pProEX HT prokaryotického expresního systému (Gibco BRL). Exprese ve vhodné hostitelské *E. coli* byla indukována přidáním 0,6 mM IPTG a rekombinantní protein byl nazván GV-24. Rekombinantní antigen byl přečištěn z inkluzních tělísek podle návodu dodavatele. V následných studiích byl GV-24 (SEQ ID č.93) znovu klonován do alternativního vektoru pET16 (Novagen).

Pro zvýšení rozpustnosti přečištěného rekombinantního antigenu byl gen kódující GV-24 mimo signální peptid znovu klonován do expresního vektoru s použitím amplifikačních primerů EV101 a EV102 (SEQ ID č.: 167 a 168). Výsledek byl pojmenován GV-24B. Nukleotidová sekvence GV-24B je uvedena v SEQ ID č.169 a předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 170. Tento fragment byl klonován do pET16 pro expresi a přečištění GV-24B podle návodu výrobce.

Schopnost přečištěných rekombinantních proteinů GV-23 a GV-24 stimulovat proliferaci T buněk a tvorbu interferonu-γ v lidském PBL byla stanovena, jak je uvedeno dříve. Výsledky těchto testů jsou uvedeny v tabulce 20, kde (-) znamená nedostatečnou účinnost, (+/-) znamená polypeptidy s výsledkem méně než dvakrát vyšším než je účinnost prostředí kontrolního média (+) znamená polypeptidy dvakrát až čtyřikrát účinnější než je kontrolní médium a (++) znamená polypeptidy, které mají účinnost větší než čtyřnásobnou vzhledem k prostředí a (neurčeno) znamená, že výsledek nebyl stanoven.

09.1.00

Tabulka 20

	Dárce G97005		Dárce G97006		Dárce G97007		Dárce G97008		Dárce G97009		Dárce G97010	
	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ	Prolif	IFN-γ
GV-23	++	++	++	++	+	+	++	++	+	-	+	++
GV-24	++	+	++	+	N	N	+	+/-	+	+/-	+/-	++

N - neurčeno

Byla nalezena sekvence bází přiléhající k genovému homologu *M. vaccae potd* pro stanovení homologie ke genu *potb* komplexu ABC transportérů spermidin/putrescin *E.coli*, který je jedním ze dvou transmembránových proteinů v komplexu ABC transportérů. Homolog *M. vaccae potb* (označovaný jako GV-25) byl určen pomocí dalšího subklonování a bázového sekvencování. Určený nukleotid a předpokládaná aminokyselinová sekvence pro GV-25 jsou uvedeny v SEQ ID č.: 97 a 98, v tomto pořadí.

Další subklonování a analýza bázovým sekvencováním přiléhajících 509 párů bází neodhalila významnou homologii s PotC, s druhým transmembránovým proteinem *E.coli*, a naznačuje, že druhý transmembránový protein se nevyskytuje v *M. vaccae* homologu ABC transportéru. Nicméně byl určen otevřený čtecí rámec s homologií s acetyl transferázou acetyl-CoA *M. tuberculosis* začínající 530 páry bází po směru transmembránového proteinu a translací vzniklý protein byl pojmenován GV-26. Určená částečná nukleotidová sekvence a předpokládaná aminokyselinová sekvence pro GV-26 jsou uvedeny v SEQ ID č.99 a 100, v tomto pořadí.

S použitím podobného postupu izolování GV-23, 3S-PCR pás 12B28 (SEQ ID č.119), popsaného dříve byla prohledána genomová knihovna *M. vaccae* sestavená v BamHI-místě lambda ZAP Express (Stratagene). Klon izolovaný z knihovny obsahoval nový otevřený čtecí rámec a antigen kódovaný tímto genem byl pojmenován GV-38A. Určená nukleotidová sekvence a předpokládaná aminokyselinová sekvence GV-38A jsou uvedeny v SEQ ID č.120 a 121, v tomto pořadí. Následné studie vedly k izolování prodloužené DNA sekvence pro GV-38A uvedené v SEQ ID č.171. Odpovídající aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č.172. Porovnání těchto sekvencí se sekvencemi uloženými v genové bance ukázalo určitou homologii s neznámým proteinem *M. tuberculosis* dříve identifikovaným v kosmidu MTCY428,12. (SPTREMBL:P71915).

Proti směru genu GV-38A byl určen druhý nový otevřený čtecí rámec a antigen kódovaný tímto genem byl pojmenován GV-38B. Určené nukleotidové sekvence 5' a 3' konce pro GV-38B jsou uvedeny v SEQ ID č.122 a 123, v tomto pořadí a odpovídající předpokládané aminkyselinové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č.124 a 125, v tomto pořadí. Další studie

09.11.00

vedly k izolování úplné DNA sekvence pro GV-38B, jenž je uvedena v SEQ ID č.173. Odpovídající aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č.174. Bylo zjištěno, že tento protein vykazuje homologii k neznámému proteinu *M. tuberculosis* identifikovanému v kosmidu MTCY428,11 (SPTREMBL: P71914).

Oba antigeny GV-38A a GV-38B byly amplifikovány pro expresní klonování v pET16 (Novagen). GV-38A byl amplifikován s primery KR11 a KR12 (SEQ ID č.126 a 127) a GV-38B s primery KR13 a KR14 (SEQ ID č.128 a 129). Exprese proteinů v hostitelských buňkách BL21(DE3) byla indukována 1 mM IPTG, nicméně nedošlo k žádné proteinové expresi. Na N koncích antigenů GV-38A a GV-38B byly identifikovány hydrofobní oblasti, které mohou zabránit expresi těchto proteinů. Hydrofobní oblasti přítomné v GV-38A byly určeny jako možný transmembránový motiv se šesti membrány spojujícími oblastmi. Pro expresi antigenů bez hydrofobních oblastí byly navrženy primery KR20 pro GV-38A, (SEQ ID č.130) a KR21 pro GV-38B (SEQ ID č.131). Zkrácený gen GV-38A byl amplifikován s primery KR20 a KR12 a zkrácený gen GV-38B s primery KR21 a KR14. Určené nukleotidové sekvence zkrácených GV38A a GV-38B jsou uvedeny v SEQ ID č.132 a 133, v tomto pořadí a odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č.134 a 135, v tomto pořadí. Prodloužená DNA sekvence pro zkrácené GV-38A a GV-38B jsou uvedeny v SEQ ID č. 175 a 176, v tomto pořadí a odpovídající předpokládané aminokyselinové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č. 177 a 178, v tomto pořadí.

08.11.00

Příklad 16

Přečištění a charakterizace polypeptidů z kultivačního filtrátu *M. vaccae* pomocí přípravné izoelektrické fokusace a přípravné elektroforézy na polyakrylamidovém gelu

Rozpustné proteiny *M. vaccae* z kultivačního filtrátu s použitím přípravné izoelektrické fokusace a přípravné elektroforézy na polyakrylamidovém gelu jak bude uvedeno dále. Pokud nebude uvedeno jinak, všechny procentuální hodnoty v následujícím příkladu jsou váhové jednotky na objem.

M. vaccae (ATCC číslo 15483) bylo kultivováno ve 250 l sterilního média 90, které bylo rozděleno na frakce pomocí ultrafiltrace pro odstranění všech proteinů, které měly molekulární hmotnost větší než 10 kDa. Médium bylo centrifugováno pro odstranění bakterií a sterilizováno filtrací přes 0,45 μm filtr. Sterilní filtrát byl zakoncentrován ultrafiltrací přes membránu s hraniční hodnotou molekulární hmotnosti 10 kDa.

Proteiny byly izolovány ze zakoncentrovaného kultivačního filtrátu vysrážením s 10 % kyselinou trichloroctovou. Vystrážené proteiny byly znovu rozpuštěny ve 100 mM Tris.HCl pH 8,0 a znovu vysráženy s přídavkem stejného objemu acetonu. Sraženina vzniklá s acetonem byla rozpuštěna ve vodě a proteiny byly znovu vysráženy přidáním stejného množství směsi chloroform/metanol 2 : 1 (objemových). Sraženina vzniklá ze směsi chloroform/metanol byla rozpuštěna ve vodě a roztok byl lyofilizován.

Lyofilizovaný protein byl rozpuštěn v izoelektrickém fokusačním pufru, který obsahoval 8 M deionizované močoviny, 2 % Triton X-100, 10 mM dithiotreitolu a 2 % amfolytů (pH 2,5 - 5,0). Vzorek byl rozdělen na frakce pomocí přípravné izoelektrické fokusace v horizontální nádrži obsahující gel Ultrodex při konstantním výkonu 8 Wattů po dobu 16 hodin. Proteiny byly eluovány z frakcí z gelové nádrže s vodou a zakoncentrovány vysrážením s 10 % kyselinou trichloroctovou.

Skupiny frakcí obsahující proteiny, které jsou předmětem zájmu, byly určeny pomocí analytické elektroforézy na polyakrylamidovém gelu a rozděleny na frakce pomocí pomocí přípravné elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Vzorky byly rozděleny na frakce na gelech 12,5 % SDS-PAGE a podrobeny elektroblotingu na nitrocelulózové membráně. Poloha proteinů na membránách byla určena barvením Ponceau Red, poté byly proteiny odbarveny vodou a eluovány z membrán se směsí 40 % acetonitril/0,1M hydrogenuhličitan amonný pH 8,9 a pak zakoncentrovány lyofilizací.

Eluované proteiny byly testovány na schopnost indukovat proliferaci a sekreci interferonu γ u lymfocytů periferní krve imunních dárců, jak bylo uvedeno dříve. Pro další výzkum byly vybrány proteiny vyvolávající v těchto testech silnou odpověď.

08.11.00

Vybrané proteiny byly dále přečištěny chromatografií zpětné fáze na sloupci Vydac Protein C4 s použitím systému trifluoroctová kyselina-acetonitril. Byly připraveny přečištěné proteiny pro určení proteinové sekvence pomocí elektroforézy na SDS - polyakrylamidovém gelu a elektroblotingu na PVDF membránách. Proteinové sekvence byly určeny jak bylo uvedeno v příkladu 3. Proteiny byly pojmenovány GV-40, GV-41, GV-42, GV-43 a GV-44. Určené sekvence N konce pro tyto polypeptidy jsou uvedeny v SEQ ID č.: 101-105, v tomto pořadí. Následné studie vedly k izolování DNA sekvencí 5' konce, středního fragmentu a 3' konce pro GV-42 (SEQ ID č.136, 137 a 138, v tomto pořadí). Odpovídající předpokládané aminokyselinové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č.139, 140 a 141, v tomto pořadí.

Po provedení standardních procedur DNA amplifikace a DNA klonování, jak byly uvedeny v příkladu 13, byly klonovány geny kódující GV-41 a GV-42. Určené nukleotidové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č: 179 a 180 a odpovídající předpokládané aminokyselinové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID č.: 181 a 182. Následující pokusy vedly ke klonování úplného genu, který kóduje GV-41 a který byl pojmenován GV-41B. Určená nukleotidová sekvence a předpokládaná aminokyselinová sekvence GV-41B jsou uvedeny v SEQ ID č: 202 a 203, v tomto pořadí. GV-41 vykazuje homologii s ribozomálním recyklačním faktorem *M. tuberculosis* a *M. leprae* a GV-42 vykazuje homologii s proteinem FAP-A *M. avium.* Z plné délky sekvence GV-42 byla zjištěna aminokyselinová sekvence určující GV-43 (SEQ ID č.104), což značí, že aminokyselinová sekvence pro GV-42 a GV-43 byla získána ze stejného proteinu.

Podle standardních postupů byla připravena myší polyklonální antiséra proti GV-40 a GV-44. Tato antiséra byla použita k prohlížení knihovny genomové DNA *M. vaccae* sestávající z náhodně odstřižených fragmentů DNA. Klony kódující GV-40 a GV-44 byly určeny a sekvencovány. Určená nukleotidová sekvence částečného genu, který kóduje GV-40, je uvedena v SEQ ID č.183 a předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedeny v SEQ ID č:184. Úplný gen kódující GV-40 nebyl klonován a antigen kódovaný tímto částečným genem byl pojmenován GV-40P. Prodloužená DNA sekvence pro GV-40P je uvedena v SEQ ID č.206 a odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 207. Určena nukleotidová sekvence genu kódujícího GV-44 je uvedena v SEQ ID č.185 a předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 186. Dalším sekvencování byla získána určená DNA sekvence pro úplný gen kódující GV-44 a je uvedena v SEQ ID č. 204 a odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č. 205. Byla nalezena homologie GV-40 k *M. leprae* elongačnímu faktoru G a homologie k *M. leprae* glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáze.

08.11.00

Příklad 17

Izolace antigenů GV-45 a GV-46 DD-*M. vaccae*

Proteiny byly extrahovány z DD-*M. vaccae* (500 mg; připraveno jak bylo uvedeno dříve) suspendováním v 10 ml 2 % SDS/PBS a ohřátím na teplotu 50 °C po dobu 2 h. Nerozpustný zbytek byl odstraněn centrifugací a proteiny vyráženy ze supernatantu přidáním stejného objemu acetonu a inkubováním při teplotě - 20 °C po dobu 1 hodiny. Vysrážené proteiny byly sloučeny centrifugací, rozpuštěny v redukčním pufru vzorku a rozděleny na frakce přípravnou elektroforézou na SDS polyakrylamidovém gelu. Oddělené proteiny byly podrobeny elektroblotingu na PVDF membráně ve směsi 10 mM CAPS/0,01 % SDS pH 11,0 a sekvence N konce byly určeny v sekvenačním zařízení plynné fáze.

Z těchto pokusů byl izolován protein reprezentovaný pásem přibližné molekulární hmotnosti 30 kDa, navržený jako GV-45. Určená sekvence N konce pro GV-45 je uveden v SEQ ID č. 187. Ze stejného experimentu byl získán protein přibližné molekulární hmotnosti 14 kDa, navržený jako GV-46. Určená aminokyselinová sekvence N konce pro GV-46 je uveden v SEQ ID č. 208. GV-46 je homologický s vysoce konzervovaným mykobakteriálním hostitelským integračním faktorem *M. tuberculosis* a *M. smegmatis*.

Podle aminokyselinové sekvence GV-45 byly navrženy degenerované oligonukleotidy KR32 a KR33 (SEQ ID č.: 188 a 189, v tomto pořadí). Po provedení standardních postupů (Sambrook, *Ibid*) byl fragment 100 párů bází amplifikován, klonován do plazmidu pBluescript II SK^+ (Stratagene, La Jolla, CA) a sekvencován (SEQ ID č.190). Klonovaný vložený úsek byl použit při prohledávání knihovny genomové DNA *M. vaccae* vytvořené v *Bam*HI-v místě lambda ZAP-Express (Stratagene). Izolovaný klon vykazoval homologii s proteiny 35 kDa *M. tuberkculosis* a 22 kDa *M. leprae* obsahujícími motivy podobné bakteriálním histonům na N konci a jedinečný C konec skládající se z pěti aminokyselinových bázových opakování. Určená nukleotidová sekvence pro GV-45 je uvedena v SEQ ID č.191 a odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č.192. Dodatečným sekvencováním byla získána určená sekvence DNA pro úplný gen kódující GV-45 a je uvedena v SEQ ID č.200 a odpovídající předpokládaná aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID č.201.

Příklad 18

Imunogenní a imunomodulační vlastnosti rekombinantních proteinů získaných z *M. vaccae*

A. Indukce proliferace T buněk a tvorby IFN γ

08.11.00

Imunogenicita rekombinantních proteinů *Mycobacterium vaccae* (GV rekombinantní proteiny) byla testována pomocí naočkování BALB/cByJ myších samic do obou zadních chodidel 10 ug rekombinantních GV proteinů emulgovaných v neúplné Freundově látce posilující účinek antigenu (IFA). Kontrolním myším byl podán fosfátový pufr se solankou v IFA. Buňky získané o 10 dní později z popliteálních lymfatických uzlin byly stimulovány imunizujícím GV proteinem a testovány na proliferaci měřením zvýšení tritiovaného tymidinu. Množství interferonu gama (IFNγ) tvořeného a vylučovaného těmito buňkami do kultivačního supernatantu byly testovány pomocí standardního testu ELISA. Jak je ukázáno v tabulce 21, která shrnuje odpovědi proliferací, bylo zjištěno, že všechny GV proteiny indukují odpověď T buněk proliferací. T buňky lymfatických uzlin imunizované myši reagovaly na imunizaci specifickým GV proteinem proliferací. Buňky lymfatických uzlin neimunizovaných myší nereagovaly na GV proteiny proliferací. Údaje v tabulce 22 ukazují tvorbu IFNγ, která ukazuje, že většina GV proteinů stimulovala tvorbu IFNγ buňkami lymfatických uzlin myší imunizovaných odpovídajícím GV proteinem. Když byly buňky lymfatických uzlin neimunizovaných myší kultivovány s jednotlivými GV proteiny, nebyla zjištěna tvorba IFNγ.

GV proteiny jsou tedy imunogeny co se týče schopnosti stimulovat proliferaci T buněk a/nebo tvorbu IFNγ při podávání subkutaneální injekcí. K antigenům specifické stimulační účinky na proliferaci T buněk a tvorbu IFNγ jsou dvě výhodné vlastnosti vakcín proti tuberkulóze.

08.11.00

Tabulka 21
Imunogenní vlastnosti GV proteinů: proliferace

GV protein	Proliferace (cpm)		
	Dávka GV proteinu použitá *in vitro* (μg/ml)		
	50	2	0,08
GV-1/70	31,550 ± 803	19,058 ± 2,449	5,596 ± 686
GV-1/83	18,549 ± 2,716	23,932 ± 1,964	11,787 ± 1,128
GV-3	34,751 ± 1,382	6,379 ± 319	4,590 ± 1,042
GV-4P	26,460 ± 1,877	10,370 ± 667	6,685 ± 673
GV-5	42,418 ± 2,444	23,902 ± 2,312	13,973 ± 772
GV-5P	35,691 ± 159	14,457 ± 1,185	8,340 ± 725
GV-7	38,686 ± 974	22,074 ± 3,698	15,906 ± 1,687
GV-9	30,599 ± 2580	15,260 ± 2,764	4,531 ± 1,240
GV-13	15,296 ± 2,006	7,163 ± 833	3,701 ± 243
GV-14	27,754 ± 1,872	13,001 ± 3,273	9,897 ± 2,833
GV-14B	10,761 ± 485	5,075 ± 1,470	2,341 ± 289
GV-22B	3,199 ± 771	3,255 ± 386	1,841 ± 318
GV-23	35,598 ± 1,330	15,423 ± 2,858	7,393 ± 2,188
GV-24B	43,678 ± 2,190	30,307 ± 1,533	15,375 ± 2,594
GV-27	18,165 ± 3,300	16,329 ± 1,794	6,107 ± 1,773
GV-27A	23,723 ± 850	6,860 ± 746	4,295 ± 780
GV-27B	31,602 ± 1,939	29,468 ± 3,867	30,306 ± 1,912
GV-29	20,034 ± 3,328	8,107 ± 488	2,982 ± 897
GV-33	41,529 ± 1,919	27,529 ± 1,238	8,764 ± 256
GV-35	29,163 ± 2,693	9,968 ± 314	1,626 ± 406
GV-38AP	28,971 ± 4,499	17,396 ± 878	8,060 ± 810
GV-38BP	19,746 ± 245	11,732 ± 3,207	6,264 ± 875
GV-40P	25,185 ± 2,877	19,292 ± 2,294	10,883 ± 893
GV-41B	24,646 ± 2,714	12,627 ± 3,622	5,772 ± 1,041
GV-42	25,486 ± 3,029	20,591 ± 2,021	13,789 ± 775
GV-44	2,684 ± 1,995	3,577 ± 1,725	1,499 ± 959
GV-45	9,554 ± 482	3,683 ± 1,127	1,497 ± 199

08.11.00

Tabulka 22
Imunogenní vlastnosti GV proteinů: tvorba IFNγ

GV protein	IFNγ (ng/ml)		
	Dávka GV proteinu použitá *in vitro* (μg/ml)		
	50	10	2
GV-1/70	24,39 ± 6,66	6,19 ± 1,42	1,90 ± 0,53
GV-1/83	11,34 ± 5,46	5,36 ± 1,34	2,73 ± 1,55
GV-3	3,46 ± 0,30	1,57 ± 0,04	neurčeno
GV-4P	6,48 ± 0,37	3,00 ± 0,52	1,38 ± 0,50
GV-5	4,08 ± 1,41	6,10 ± 2,72	2,35 ± 0,40
GV-5P	34,98 ± 15,26	9,95 ± 3,42	5,68 ± 0,79
GV-7	33,52 ± 3,08	25,47 ± 4,14	9,60 ± 1,74
GV-9	92,27 ± 45,50	88,54 ± 16,48	30,46 ± 1,77
GV-13	11,60 ± 2,89	2,04 ± 0,58	1,46 ± 0,62
GV-14	8,28 ± 1,56	3,19 ± 0,56	0,94 ± 0,24
GV-14B	neurčeno	neurčeno	neurčeno
GV-22B	neurčeno	neurčeno	neurčeno
GV-23	59,67 ± 14,88	30,70 ± 4,48	9,17 ± 1,51
GV-24B	6,76 ± 0,58	3,20 ± 0,50	1,97 ± 0,03
GV-27	72,22 ± 11,14	30,86 ± 10,55	21,38 ± 3,12
GV-27A	4,25 ± 2,32	1,51 ± 0,73	neurčeno
GV-27B	87,98 ± 15,78	44,43 ± 8,70	21,49 ± 5,60
GV-29	7,56 ± 2,58	1,22 ± 0,56	neurčeno
GV-33	7,71 ± 0,26	8,44 ± 2,35	1,52 ± 0,24
GV-38AP	23,49 ± 5,89	8,87 ± 1,62	4,17 ± 1,72
GV-38BP	5,30 ± 0,95	3,10 ± 1,19	1,91 ± 1,01
GV-40P	15,65 ± 7,89	10,58 ± 1,31	3,57 ± 1,53
GV-41B	16,73 ± 1,61	5,08 ± 1,08	2,13 ± 1,10
GV-42	95,97 ± 23,86	52,88 ± 5,79	30,06 ± 8,94
GV-44	neurčeno	neurčeno	neurčeno

06.11.00

B. Stimulace subpopulace lymfocytů

Schopnost rekombinantních proteinů *M. vaccae* podle vynálezu, tepelně usmrceného *M. vaccae* a DD-*M. vaccae* stimulovat subpopulace lymfocytů byla zjištěna zkoumáním zvyšování exprese CD69 (povrchový protein exprimovaný na stimulovaných buňkách).

PBMC z normálních dárců (5 x 10^6 buněk/ml) bylo stimulováno 20 ug/ml buď teplem usmrcených *M. vaccae* buněk nebo DD-*M. vaccae* nebo rekombinantních GV-22B (SEQ ID č.145), GV-23 (SEQ ID č.89), GV-27 (SEQ ID č.160), GV27A (SEQ ID č.117), GV-27B (SEQ ID č.162) nebo GV-45 (SEQ ID č.201) po dobu 24 hodin. Exprese CD69 byla určena barvením kultivovaných buněk monoklonální protilátkou proti CD56, buňky αβT nebo buňky γδT v kombinaci s monoklonální protilátkou proti CD69 a následnou průtokovou cytometrickou analýzou.

Tabulka 23 ukazuje procento αβT buněk, γδT buněk a NK buněk exprimujících CD69 po stimulaci tepelně usmrceným *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* nebo rekombinantními proteiny *M. vaccae*. Tyto výsledky ukazují, že tepelně usmrcené *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* a GV-23 stimulují expresi CD69 v subpopulacích lymfocytů při srovnání s kontrolou (nestimulované buňky), zvlášť vysoké hladiny exprese CD69 byly pozorovány u NK buněk. Bylo zjištěno, že GV-45 zvyšuje expresi CD69 αβT buňkami.

Tabulka 23
Stimulace exprese CD69

	αβT buňky	γδT buňky	NK buňky
kontrola	3,8	6,2	4,8
teplem usmrcené *M.vaccae*	8,3	10,2	40,3
DD-*M. vaccae*	10,1	17,5	49,9
GV-22B	5,6	3,9	8,6
GV-23	5,8	10,0	46,8
GV-27	5,5	4,4	13,3
GV-27A	5,5	4,4	13,3
GV-27B	4,4	2,8	7,1
GV-45	11,7	4,9	6,3

Schopnost rekombinantního proteinu GV-23 (20 ug/ml) indukovat expresi CD69 v subpopulaci lymfocytů byla srovnána se známou schopností látky zvyšující účinek antigenu MPL/TDM/CWS (monofosforyl-lipid A/ trehalóza 6'6' dimykolát; Sigma, St. Louis, MO; v konečném ředění 1 : 20) a CpG ODN (Promega, Madison, WI; 20 ug/ml) indukovat Th-1 a se

08.11.00

známou schopností látky zvyšující účinek antigenu hydroxid hlinitý (Superfos Biosector, Kvistgard, Denmark; v konečném ředění 1 : 400) a choleratoxin (20 ug/ml) indukovat Th-2 s použitím dříve uvedených postupů. . MPL/TDM/CWS a hydroxid hlinitý byly použity v maximální koncentraci, která nezpůsobuje buněčnou toxicitu. Obr. 8A až 8C ukazují stimulci CD69 exprese αβT buňkami, γδT buňkami a NK buňkami, v tomto pořadí. GV-23, MPL/TDM/CWS a CpG ODN indukovaly expresi CD69 NK buňkami, zatímco hydroxid hlinitý a choleratoxin ne.

C. Stimulace tvorby cytokinu

Schopnost rekombinantních proteinů *M. vaccae* podle vynálezu stimulovat tvorbu cytokinu v PBMC byla testována jak je uvedeno dále. PBMC z normálních dárců (5 x 10^6 buňek/ml) byly stimulovány 20 ug/ml buď tepelně usmrcenými buňkami *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* nebo rekombinantními GV-22B (SEQ ID č. 145), GV-23 (SEQ ID č. 89), GV-27 (SEQ ID č.160), GV-27A (SEQ ID č. 117), GV-27B (SEQ ID č. 162) nebo GV-45 (SEQ ID č. 201) po dobu 24 hodin. Byly získány kultivační supernatanty a testovány na tvorbu IL-1β, TNF-α, IL-12 a IFN-γ s použitím standardní sady testů ELISA (Genzyme, Cambridge, MA) podle návodu výrobce. Obr. 9A až 9D ukazují stimulaci tvorby IL-1β, TNF-α, IL-12 a IFN-γ, v tomto pořadí. Bylo zjištěno, že tepelně usmrcené *M. vaccae* a DD-*M. vaccae* stimulují tvorbu všech čtyř testovaných cytokinů, zatímco rekombinantní GV-23 a GV-45 stimulují tvorbu IL-1β, TNF-α a IL-12. Obr. 10A až 10C ukazují stimulaci tvorby IL-1β, TNF-α a IL-12, v tomto pořadí, v lidských PBMC (určeno jak bylo uvedeno dříve) různými koncentracemi GV-23 a GV-45.

Obr. 11A až 11D ukazují stimulaci tvorby IL-1β, TNF-α, IL-12 a IFN-γ, v tomto pořadí, v PBMC proteinem GV-23 ve srovnání se stimulací těmito látkami zvyšujícími účinek antigenu: MPL/TDM/CWS (v konečném ředění 1 : 20), CpG ODN (20 ug/ml), hydroxid hlinitý (v konečném ředění 1:400) a choleratoxin (20 ug/ml). GV-23, MPL/TDM/CWS a CpG ODN indukovaly významné hladiny všech čtyř testovaných cytokinů, hladiny tvorby IL-1β pozorované pro GV-23 byly vyšší než při použití jakékoli jiné známé látky zvyšující účinek antigenu. Hydroxid hlinitý a choleratoxin indukovaly pouze zanedbatelná množství těchto čtyř cytokinů.

D. Stimulace antigen rozpoznávajících buněk

Schopnost tepelně usmrceného *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* a rekombinantních proteinů *M. vaccae* zvyšovat expresi ko-stimulačních molekul CD40, CD80 a CD86 na B buňkách, monocytech a dendritických buňkách byla zjištěna jak bude uvedeno dále.

08.11.00

Monoklonální buňky periferní krve ochuzené o T buňky a obsahující převážně B buňky, monocyty a dendritické buňky byly stimulovány 20 ug/ml buď buněk tepelně usmrceného *M. vaccae*, DD-*M. vaccae* nebo rekombinantních proteinů GV-22B (SEQ ID č. 145), GV-23 (SEQ ID č. 89), GV-27 (SEQ ID č. 160), GV-27A (SEQ ID č. 117), GV-27B (SEQ ID č. 162) nebo GV-45 (SEQ ID č. 201) po dobu 48 hodin. Byly získány stimulované buňky a analyzovány na zvýšení CD40, CD80 a CD86 s použitím 3-barevné proudové cytometrické analýzy. Tabulky 24, 25 a 26 ukazují silně zvýšenou fluorescenční intenzitu pro dendritické buňky, monocytes, a B buňky, v tomto pořadí, oproti nízké fluorescenční intenzitě kontroly (nestimulované buňky).

Tabulka 24

Stimulace exprese CD40, CD80 a CD86 v dendritických buňkách.

	CD40	CD80	CD86
kontrola	0	0	0
Tepelně usmrcené *M. vaccae*	6,1	3,8	1,6
DD-*M. vaccae*	6,6	4,2	1,6
GV-22B	4,6	1,9	1,6
GV-23	6,0	4,5	1,8
GV-27	5,2	1,9	1,6
GV-27A	2,3	0,9	1,0
GV-27B	2,6	1,1	1,1
GV-45	5,8	3,0	3,1

Tabulka 25

Stimulace exprese CD40, CD80 a CD86 v monocytech

	CD40	CD80	CD86
kontrola	0	0	0
Tepelně usmrcené*M. vaccae*	2,3	1,8	0,7
DD-*M. vaccae*	1,9	1,5	0,7
GV-22B	0,7	0,9	1,1
GV-23	2,3	1,5	0,7
GV-27	1,5	1,4	1,2

08.11.00

GV-27A	1,4	1,4	1,4
GV-27B	1,6	1,2	1,2
GV-45	1,6	1,2	1,0

Tabulka 26

Stimulace exprese CD40, CD80 a CD86 v B buňkách

	CD40	CD80	CD86
kontrola	0	0	0
Tepelně usmrcené *M. vaccae*	1,6	1,0	1,7
DD-*M. vaccae*	1,5	0,9	1,7
GV-22B	1,1	0,9	1,2
GV-23	1,2	1,1	1,4
GV-27	1,1	0,9	1,1
GV-27A	1,0	1,1	0,9
GV-27B	1,0	0,9	0,9
GV-45	1,2	1,1	1,3

Jak bylo ukázáno dříve, zvýšené hladiny exprese CD40, CD80 a CD86 byly pozorovány v dendritických buňkách, monocytech a B buňkách všech testovaných kompozic. Hladiny exprese byly nejvíce zvýšeny v dendritických buňkách, přičemž nejvyšší hladiny exprese byly získány pro tepelně usmrcené *M. vaccae*, DD-*M. vaccae*, GV-23 a GV-45. Obr. 12A až 12C ukazují stimulci exprese CD40, CD80 a CD86, v tomto pořadí, v dendritických buňkách různými koncentracemi GV-23 a GV-45.

Schopnost GV-23 (20 ug/ml) stimulovat expresi CD40, CD80 a CD86 v dendritických buňkách byla srovnána se schopností látek zvyšujících účinek antigenu MPL/TDM/CWS (v konečném ředění 1 : 20) a CpG ODN (20 ug/ml) indukovat Th-1 a se známou schopností látek zvyšujících účinek antigenu hydroxid hlinitý (v konečném ředění 1 : 400) a choleratoxin (20 ug/ml) indukovat Th-2. GV-23, MPL/TDM/CWS a CpG ODN způsobily významné zvýšení CD40, CD80 a CD86, zatímco choleratoxin a hydroxid hlinitý indukovaly mírnou nebo zanedbatelnou stimulaci dendritických buněk, v tomto pořadí.

D. Maturace a funkce dendritických buněk

06.11.00

Účinek rekombinantního proteinu GV-23 *M. vaccae* na maturaci a funkci dendritických buněk byl zkoumán jak je uvedeno dále.

Přečištěné dendritické buňky (5 x 10^4 až 10^5 buněk/ml) byly stimulovány GV-23 (20 ug/ml) nebo LPS (10 ug/ml) jako pozitivní kontrolou. Buňky byly kultivovány po dobu 20 hodin a pak analyzovány na expresi CD83 (maturační marker) a CD80 pomocí proudové cytometrie. Nestimulované buňky byly použity jako negativní kontrola. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 27.

Tabulka 27

Stimulace exprese CD83 v dendritických buňkách

podaná látka	%CD83-positivních dendritických buněk	% CD80-positivních dendritických buněk
kontrola	15 ± 8	9 ± 6,6
GV-23	35 ± 13,2	24,7 ± 14,2
LPS	36,3 ± 14,8	27,7 ± 13

údaj = průměr ± SD (n=3)

Schopnost GV-23 zvýšit aktivitu dendritických buněk ve funkci antigen rozpoznávajících buněk byla určena pomocí testu (MLR). Přečištěné dendritické buňky byly kultivovány v samotném mediu nebo s GV-23 (20 ug/ml) po dobu 18 až 20 hodin a pak stimulovány alochtonními T buňkami (2 x 10^5 buněk/jamku). Po třech dnech inkubace byl přidán (^{3}H)-tymidin. O den později byly získány buňky a byla měřena zvýšená radioaktivita. Obr. 13 ukazuje vzrůst zvýšení (^{3}H)-tymidinu se vzrůstem průměru dendritických buněk k T buňkám. Významně vyšší hladiny nárůstu radioaktivity byly pozorovány v buňkách GV-23 stimulovaných ve srovnání s nestimulovanými buňkami, což naznačuje, že GV-23 zvyšuje smíšenou reakce dendriticých buněk a leukocytů.

Ačkoli byly k popisu vynálezu pro ilustraci použity určité podrobnosti a některé konkrétní příklady pro jasnější pochopení, mohou být provedeny změny a modifikace, aniž by byl to vedlo nad rozsah vynálezu, který má být omezen pouze připojenými nároky.

08.11.00

PV2000-2321

(opravené nároky určené pro úplný průzkum)

7886

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polypeptid obsahující imunogenní část izolovaného *M. vaccae* antigenu, kde antigen zahrnuje sekvence vybrané ze skupiny sestávající z: sekvencí SEQ ID č: 1 až 4, 9 až 16, 18 až 21, 23, 25, 26, 28, 29, 44, 45, 47, 52 až 55, 63, 64, 70, 75, 89, 94, 98, 100 až 105, 109, 110, 112, 121, 124, 134, 135, 140, 141, 143, 145, 147, 152, 154 156, 158, 160, 162, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 196, 197, 199, 201, 203, 205 a 207.

2. Polypeptid obsahující imunogenní část izolovaného *M. vaccae* antigenu, kde antigen zahrnuje sekvence vybrané ze skupiny sestávající z:

(a) sekvencí majících alespoň asi 50 % zbytků identických se sekvencemi SEQ ID č: 1 až 4, 9 až 16, 18 až 21, 23, 25, 26, 28, 29, 44, 45, 47, 52-55, 63, 64, 70, 75, 89, 94, 98, 100 až 105, 109, 110, 112, 121, 124, 134, 135, 140, 141, 143, 145, 147, 152, 154 156, 158, 160, 162, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 196, 197, 199, 201, 203, 205 a 207, podle měření pomocí počítačového algoritmu BLASTP;

(b) sekvence mající alespoň asi 75 % zbytků identických se sekvencemi SEQ ID č: 143, 145, 147, 152, 154 156, 158, 160, 162, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 196, 197, 199, 201, 203, 205 a 207 podle měření pomocí počítačového algoritmu BLASTP; a

(c) sekvence mající alespoň asi 95 % zbytků identických se sekvencemi SEQ ID č: 143, 145, 147, 152, 154 156, 158, 160, 162, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 181, 182, 184, 186, 187, 192, 194, 196, 197, 199, 201, 203, 205 a 207 podle měření pomocí počítačového algoritmu BLASTP.

3. Polypeptid obsahující imunogenní část izolovaného *M. vaccae* antigenu, kde antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci kódovanou polynukleotidem vybraným ze skupiny sestávající z:

(a) sekvence SEQ ID č: 40 až 42, 46, 48 až 51, 74, 88, 93, 97, 99, 106 až 108, 111, 120, 122, 123, 132, 133, 136 až 138, 142, 144, 146, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 164, 169, 171, 173, 175, 176, 179, 180, 183, 185, 191, 193, 195, 198 a 200;

06.11.00

(b) komplementy sekvencí SEQ ID č: 40 až 42, 46, 48 až 51, 74, 88, 93, 97, 99, 106 až 108, 111, 120, 122, 123, 132, 133, 136 až 138, 142, 144, 146, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 164, 169, 171, 173, 175, 176, 179, 180, 183, 185, 191, 193, 195, 198 a 200; a

(c) sekvence, které jsou alespoň s asi 99 % pravděpodobností stejné jako sekvence (a) nebo (b), podle měření pomocí počítačového algoritmu BLASTN.

4. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid podle kteréhokoli z nároků 1 až 3.

5. Expresní vektor obsahující polynukleotid podle nároku 4.

6. Hostitelská buňka transformovaná expresním vektorem podle nároku 5.

7. Hostitelská buňka podle nároku 6, kde hostitelská buňka je vybrána ze skupiny sestávající z *E. coli*, mykobakteriálních, hmyzích, kvasinkových a savčích buněk.

8. Fúzní protein obsahující alespoň jeden polypeptid podle kteréhokoli z nároků 1 až 3.

9. Farmaceutická kompozice obsahující polypeptid podle kteréhokoli z nároků 1 až 3 a fyziologicky přijatelný nosič.

10. Farmaceutická kompozice obsahující polynukleotid podle nároku 4 a fyziologicky přijatelný nosič.

11. Farmaceutická kompozice obsahující fúzní protein podle nároku 8 a fyziologicky přijatelný nosič.

12. Vakcína obsahující polypeptid podle kteréhokoli z nároků 1 až 3 a zesilovač nespecifické imunitní odpovědi.

13. Vakcína obsahující polynukleotid podle nároku 4 a zesilovač nespecifické imunitní odpovědi.

08.11.00

14. Vakcína obsahující fúzní protein podle nároku 8 a zesilovač nespecifické imunitní odpovědi.

15. Vakcína podle kteréhokoli z nároků 12 až 14, kde zesilovač nespecifické imunitní odpovědi je adjuvans.

16. Vakcína podle kteréhokoli z nároků 12 až 14, kde zesilovač nespecifické imunitní odpovědi je vybrán ze skupiny sestávající z:
    (a) buněk *M. vaccae* zbavených lipidů a glykolipidů;
    (b) deaktivovaných buněk *M. vaccae*; a
    (c) filtrátu kultury *M. vaccae*;
    (a) složek přítomných nebo odvozených z kterékoliv směsi z (a) až (d).

17. Způsob posílení imunitní odpovědi u pacienta, zahrnující podání pacientovi farmaceutické kompozice podle kteréhokoli z nároků 9 až 11.

18. Způsob posílení imunitní odpovědi u pacienta, zahrnující podávání pacientovi vakcíny podle kteréhokoli z nároků 12 až 14.

19. Způsob podle kteréhokoli z nároků 17 a 18, kde imunitní odpověď je Th1 odpověď.

20. Způsob léčby nemocí u pacienta, zahrnující podávání pacientovi farmaceutické kompozice podle kteréhokoli z nároků 9 až 11.

21. Způsob léčby nemocí u pacienta, zahrnující podání pacientovi vakcíny podle kteréhokoli z nároků 12 až 14.

22. Způsob podle kteréhokoli z nároků 20 a 21, kde nemoc je vybrána ze skupiny sestávající z imunitní poruchy, infekční nemoci, kožní nemoci a nemoci dýchací soustavy.

08.11.00

23. Způsob podle nároku 22, kde je nemoc vybrána ze skupiny sestávající z mykobakteriální infekce, astma, lupénky, dermatitid, alergické rýmy, sarcoidózy, alopecia areata, rakovina plic a karcinomů kůže.

24. Způsob léčby nemocí u pacienta, zahrnující podání kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z

(a) buňky *M. vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů;

(b) buňky *M. vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů ochuzené o mykolové kyseliny;

(c) buňky *M. vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;

(d) buňky *M. vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a

(e) složek přítomných nebo odvozených z kterékoliv směsi z (a) až (d).

25. Způsob přípravy podle nároku 24, kde je nemoc vybrána ze skupiny sestávající z mykobakteriální infekce, astma, lupénky, dermatitid, alergické rýmy, sarcoidózy, alopecia areata, rakovina plic a karcinomů kůže.

26. Způsob posílení nespecifické imunitní odpovědi na antigen zahrnující podávání polypeptidu, polypeptid obsahuje imunogenní část *M. vaccae* antigenu, kde *M. vaccae* antigen obsahuje sekvenci vybranou ze skupiny sestávající z

(a) sekvence SEQ ID č. 89, 114, 117, 118 a 201;

(b) sekvence mající alespoň asi 97 % zbytků identických se sekvencí uvedenou v SEQ ID č. 114, 117, 118 podle měření pomocí počítačového algoritmu BLASTP.

(c) sekvence mající alespoň asi 80 % zbytků identických se sekvencí SEQ ID č. 89 a 201 podle měření pomocí počítačového algoritmu BLASTP.

27. Způsob detekce mykobakteriální infekce u pacienta, zahrnující:

(a) kontakt dermálních buněk pacienta s jedním nebo více polypeptidy, podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3; a

(b) zjištění imunitní odpovědi na pacientově kůži.

28. Způsob podle nároku 27, kde imunitní odpověď je zatvrdnutí.

08.11.00

29. Diagnostická souprava obsahující:

(a) polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3; a

(b) zařízení umožňující dostatečný kontakt polypeptidu s dermálními buňkami pacienta.

30. Způsob detekce mykobakteriální infekce biologickém vzorku, zahrnující:

(a) kontakt biologického vzorku s polypeptidem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3; a

(b) zjištění přítomnosti protilátek, které se váží k polypeptidu ve vzorku.

31. Způsob podle nároku 30, kde polypeptid(y) jsou vázány na pevný podklad.

32. Způsob podle nároku 30, kde biologický vzorek je vybrán ze skupiny sestávající z celé krve, séra, plazmy, slin, mozkomíšního moku a moči.

33. Způsob detekce mykobakteriální infekce v biologickém vzorku, zahrnující:

(a) kontakt biologického vzorku s vazebným činidlem, které je schopné vázat polypeptid podle podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3; a

(b) zjištění proteinu nebo polypeptidu, který se váže na vazebné činidlo ve vzorku.

34. Způsob podle nároku 33, kde vazebné činidlo je monoklonální protilátka.

35. Způsob podle nároku 33, kde vazebné činidlo je polyklonální protilátka.

36. Diagnostická souprava, zahrnující:

(a) alespoň jeden polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3; a

(b) detekční činidlo.

37. Souprava podle nároku 36, kde polypeptid je imobilizován na pevném nosiči.

38. Souprava podle nároku 36, kde detekční činidlo obsahuje identifikační skupinu, připojenou na vazebné činidlo.

08.11.00

39. Souprava podle nároku 38, kde vazebné činidlo je vybráno ze skupiny, sestávající z anti-imunoglobulinů, proteinu G, proteinu A a laktinů.

40. Souprava podle nároku 38, kde identifikační skupina je vybrána z radioizotopů, fluorescenčních skupin, luminiscenčních skupin, enzymů, biotinu a barvících částic.

41. Monoklonální protilátka, která se váže k polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3.

42. Polyklonální protilátka, která se váže k polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3.

43. Způsob posílení nespecifické imunitní odpovědi na antigen, zahrnující podávání kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z:

(a) buňky *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;

(b) buňky *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;

(c) buňky *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů;

(d) filtrátu kultury *M.vaccae* buněk.

44. Polypeptid obsahující imunogenní část antigenu *M.vaccae*, kde antigen zahrnuje sekvenci vybranou ze skupiny sestávající z:

(a) sekvence uvedené v SEQ ID NOS: 114, 117 a 118; a

(b) sekvence mající alespoň asi 97% zbytků identických se sekvencí SEQ ID NOS: 114, 117 a 118.

45. Kompozice zahrnující složku vybranou ze skupiny sestávající z:

(a) buňky *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů;

(b) buňky *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;

(c) buňky *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;

(d) buňky *M. vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a

(e) složek přítomných nebo odvozených z kterékoliv směsi z (a) až (e).

08.11.00

46. Kompozice podle nároku 45, kde mykobakteriální buňky zahrnují *M. vaccae* buňky.

47. Kompozice obsahující buňky *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů, mající obsah aminokyselin alespoň 40 hmotn.%.

48. Kompozice obsahující buňky *M.vaccae* zbavené lipidů a glykolipidů, mající obsah lipidů menší než 3 hmotn.%.

49. Kompozice podle kteréhokoli nároku 45 až 48 ve formě vhodné k dodání do dýchacích cest, nebo lokalizované v plicích.

50. Způsob úpravy rovnováhy populace buněk Th1 a Th2 ve vzorku populace, podáním kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z:
(a) mykobakteriální buňky zbavené lipidů;
(b) mykobakteriální buňky zbavené glykolipidů;
(c) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů;
(d) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;
(e) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;
(f) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a
(g) složky přítomné nebo odvozené z kterékoliv směsi z (a) až (f).

51. Způsob aktivace T buněk ve vzorku populace, podáním kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z:
(a) mykobakteriální buňky zbavené lipidů;
(b) mykobakteriální buňky zbavené glykolipidů;
(c) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů;
(d) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;
(e) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;
(f) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a
(g) složky přítomné nebo odvozené z kterékoliv směsi z (a) až (f).

08.11.00

52. Způsob aktivace NK buněk ve vzorku populace, podáním kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z:

a) mykobakteriální buňky zbavené lipidů;

b) mykobakteriální buňky zbavené glykolipidů;

c) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů;

d) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;

e) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;

f) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a

g) složky přítomné nebo odvozené z kterékoliv směsi z (a) až (f).

53. Způsob stimulace produkce cytokinů ve vzorku populace, podáním kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z:

a) mykobakteriální buňky zbavené lipidů;

b) mykobakteriální buňky zbavené glykolipidů;

c) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů;

d) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;

e) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;

f) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a

g) složky přítomné nebo odvozené z kterékoliv směsi z (a) až (f).

54. . Způsob zvýšení exprese ko-stimulačních molekul na alespoň jedné z dendritických buněk a monocytů ve vzorku populace, podáním kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z:

a) mykobakteriální buňky zbavené lipidů;

b) mykobakteriální buňky zbavené glykolipidů;

c) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů;

d) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;

e) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;

08.11.00

f) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a

g) složky přítomné nebo odvozené z kterékoliv směsi z (a) až (f).

55. Způsob urychlení vývoje a funkce dendritické buňky ve vzorku populace, podáním kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z:

a) mykobakteriální buňky zbavené lipidů;

b) mykobakteriální buňky zbavené glykolipidů;

c) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů;

d) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;

e) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;

f) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a

g) složky přítomné nebo odvozené z kterékoliv směsi z (a) až (f).

56. Způsob snížení hromadění eosinofilů ve vzorku buněčné nebo tkáňové populaci, podáním kompozice obsahující složku vybranou ze skupiny sestávající z:

a) mykobakteriální buňky zbavené lipidů;

b) mykobakteriální buňky zbavené glykolipidů;

c) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů;

d) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny;

e) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů, ochuzené o mykolové kyseliny a arabinogalaktan;

f) mykobakteriální buňky zbavené lipidů a glykolipidů ošetřené kyselinou; a

g) složky přítomné nebo odvozené z kterékoliv směsi z (a) až (f).

57. Způsob podle kteréhokoli z nároků 50 až 56, kde mykobakteriálními buňkami jsou buňky *M. vaccae.*

58. Použití kompozice podle kteréhokoli z nároků 45 až 48, kde nemoc je vybrána ze skupiny sestávající z poruch imunity, zánětlivých onemocnění, nemocí kůže a nemocí respiračního systému.

06.11.00

59. Použití kompozice podle kteréhokoli z nároků 45 až 48, pro výrobu léku pro léčení nemoci vybrané ze skupiny sestávající z poruch imunity, zánětlivých onemocnění, nemocí kůže a nemocí respiračního systému.

60. Použití kompozice podle kteréhokoli z nároků 45 až 48, pro výrobu léku pro léčení nemoci vybrané ze skupiny sestávající z mykobakteriální infekce, astma, lupénky, alergické rýmy, sarcoidózy, alopecia areata, rakovina plic a karcinomů kůže.

08.11.00

PV 2000-2341

Seznam sekvencí

<110> Tan, Paul L.J.
Watson, James D.
Visser, Elizabeth S.
Skinner, Margot A.
Prestidge, Ross L.

<120> Kompozice získané z *Mycobacterium vaccae* a způsoby jejich použití

<130> 11000.1002c2PCT

<150> 09/205,426
<151> 1998-12-04

<150> 09/156,181
<151> 1998-09-17

<150> 09/095,855
<151> 1998-06-11

<150> 08/996,624
<151> 1997-12-23

<150> 08/997,362
<151> 1997-12-23

<150> 08/997,080
<151> 1997-12-23

<160> 208

<170> FastSEQ for Windows verze 3.0

<210> 1
<211> 25
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (7)...(7)

<400> 1

```
Ala Pro Val Gly Pro Gly Xaa Ala Ala Tyr Val Gln Gln Val Pro Asp
 1               5                  10                  15
Gly Pro Gly Ser Val Gln Gly Met Ala
            20                  25
```

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>

<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)

<400> 2
Met Xaa Asp Gln Leu Lys Val Asn Asp Asp
1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)

<400> 3
Met Xaa Pro Val Pro Val Ala Thr Ala Ala Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 4
Thr Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Tyr Val Asp His Val Glu Gln Ala
1 5 10 15
Lys Phe Gly Asp Leu
20

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (25)...(25)

<400> 5
Met Gln Ala Phe Asn Ala Asp Ala Tyr Ala Phe Ala Lys Arg Glu Lys
1 5 10 15
Val Ser Leu Ala Pro Gly Val Pro Xaa Val Phe Glu Thr
20 25

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (6)...(6)

<400> 6
Met Ala Asp Pro Asn Xaa Ala Ile Leu Gln Val Ser Lys Thr Thr Arg

1 5 10 15
Gly Gly Gln Ala Ala
20

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 7
Met Pro Ile Leu Gln Val Ser Gln Thr Gly Arg
1 5 10

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)

<221> NEJISTÉ
<222> (6)...(6)

<400> 8
Met Xaa Asp Pro Ile Xaa Leu Gln Leu Gln Val Ser Ser Thr
1 5 10

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 9
Lys Ala Thr Tyr Val Gln Gly Gly Leu Gly Arg Ile Glu Ala Arg Val
1 5 10 15

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)

<400> 10
Lys Xaa Gly Leu Ala Asp Leu Ala Pro
1 5

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>

<221> NEJISTÉ
<222> (12)...(12)
<223> Zbytek může být buď Glu, nebo Ile

<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)

<400> 11
Lys Xaa Tyr Ala Leu Ala Leu Met Ser Ala Val Xaa Ala Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (10)...(10)

<400> 12
Lys Asn Pro Gln Val Ser Asp Glu Leu Xaa Thr
1 5 10

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (9)...(9)

<400> 13
Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Xaa Gly Asp Pro Ala Ala Val Val
1 5 10 15
Ala Ala Met Ser Thr
20

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (5)...(5)

<400> 14
Glu Ala Glu Val Xaa Tyr Leu Gly Gln Pro Gly Glu Leu Val Asn
1 5 10 15

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)
<223> Zbytek může být buď Gly, nebo Ala

<221> NEJISTÉ
<222> (15)...(15)
<223> Zbytek může být buď Pro, nebo Ala

<221> NEJISTÉ
<222> (7)...(7)

<400> 15
Ala Xaa Val Val Pro Pro Xaa Gly Pro Pro Ala Pro Gly Ala Xaa
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 16
Ala Pro Ala Pro Asp Leu Gln Gly Pro Leu Val Ser Thr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 17
Ala Thr Pro Asp Trp Ser Gly Arg Tyr Thr Val Val Thr Phe Ala Ser
1 5 10 15
Asp Lys Leu Gly Thr Ser Val Ala Ala
20 25

<210> 18
<211> 25
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (15)...(15)
<223> Zbytek může být buď Ala, nebo Arg

<221> NEJISTÉ
<222> (23)...(23)
<223> Zbytek může být buď Val, nebo Leu

<221> NEJISTÉ
<222> (16)...(16)

<400> 18
Ala Pro Pro Tyr Asp Asp Arg Gly Tyr Val Asp Ser Thr Ala Xaa Xaa
1 5 10 15

Ala Ser Pro Pro Thr Leu Xaa Val Val
20 25

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 19
Glu Pro Glu Gly Val Ala Pro Pro
1 5

<210> 20
<211> 25
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (21)...(22)

<400> 20
Glu Pro Ala Gly Ile Pro Ala Gly Phe Pro Asp Val Ser Ala Tyr Ala
1 5 10 15
Ala Val Asp Pro Xaa Xaa Tyr Val Val
20 25

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (7)...(7)

<400> 21
Ala Pro Val Gly Pro Gly Xaa Ala Ala Tyr Val Gln Gln Val Pro
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 22
Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Met Val Pro Ser
1 5 10 15

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 23
Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Met Val Pro Ser Pro
1 5 10 15

Ser Met Gly

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 24
Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Asp Val Phe Ser
1 5 10 15

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (1)...(2)

<400> 25
Xaa Xaa Thr Gly Leu His Arg Leu Arg Met Met Val Pro Asn
1 5 10

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (16)...(16)
<223> Zbytek může být buď Ser, nebo Val

<221> NEJISTÉ
<222> (17)...(17)
<223> Zbytek může být buď Gln, nebo Val

<400> 26
Val Pro Ala Asp Pro Val Gly Ala Ala Ala Gln Ala Glu Pro Ala Xaa
1 5 10 15
Xaa Arg Ile Asp
20

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (4)...(4)
<223> Zbytek může být buď Tyr, nebo Pro

<221> NEJISTÉ
<222> (8)...(8)

<223> Zbytek může být buď Val, nebo Gly

<221> NEJISTÉ
<222> (9)...(9)
<223> Zbytek může být buď Ile, nebo Tyr

<221> NEJISTÉ
<222> (3)...(3)

<400> 27
Asp Pro Xaa Xaa Asp Ile Glu Xaa Xaa Phe Ala Arg Gly Thr
1 5 10

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 28
Ala Pro Ser Leu Ser Val Ser Asp Tyr Ala Arg Asp Ala Gly Phe
1 5 10 15

<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)
<223> Zbytek může být buď Leu, nebo Pro

<221> NEJISTÉ
<222> (1)...(1)

<221> NEJISTÉ
<222> (5)...(5)

<221> NEJISTÉ
<222> (7)...(7)

<221> NEJISTÉ
<222> (10)...(10)

<400> 29
Xaa Xaa Leu Ala Xaa Ala Xaa Leu Gly Xaa Thr Val Asp Ala Asp Gln
1 5 10 15

<210> 30
<211> 330
<212> PRT
<213> Mycobacterium leprae

<400> 30
Met Lys Phe Val Asp Arg Phe Arg Gly Ala Val Ala Gly Met Leu Arg
1 5 10 15

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

<210> 31
<211> 327
<212> PRT
<213> Mycobacterium leprae

<400> 31

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

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

<210> 32
<211> 338
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 32

```
Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg
 1               5                  10                  15
Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val
            20                  25                  30
Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly
        35                  40                  45
Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp
    50                  55                  60
Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile
                85                  90                  95
Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val
            100                 105                 110
Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro
        115                 120                 125
Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu
    130                 135                 140
```

```
Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro
145                 150                 155                 160
Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu
                165                 170                 175
Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met
            180                 185                 190
Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly
        195                 200                 205
Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly
    210                 215                 220
Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val
225                 230                 235                 240
Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn
                245                 250                 255
Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu
            260                 265                 270
Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn
        275                 280                 285
Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr
    290                 295                 300
His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp
305                 310                 315                 320
Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln
                325                 330                 335
Gly Ala
```

<210> 33
<211> 325
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33

```
Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met
 1               5                  10                  15
Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
            20                  25                  30
Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val
        35                  40                  45
Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val
    50                  55                  60
Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp
65                  70                  75                  80
Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro
                85                  90                  95
Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val
            100                 105                 110
Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly
        115                 120                 125
Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu
    130                 135                 140
Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser
145                 150                 155                 160
Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala
                165                 170                 175
Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu
            180                 185                 190
```

Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met
195 200 205
Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser
210 215 220
Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu
225 230 235 240
Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro
245 250 255
Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe
260 265 270
Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly
275 280 285
Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp
290 295 300
Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser
305 310 315 320
Ser Leu Gly Ala Gly
325

<210> 34
<211> 338
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

<400> 34
Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg
1 5 10 15
Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val
20 25 30
Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly
35 40 45
Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp
50 55 60
Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile
85 90 95
Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val
100 105 110
Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro
115 120 125
Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro
145 150 155 160
Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu
165 170 175
Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met
180 185 190
Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly
195 200 205
Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly
210 215 220
Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val
225 230 235 240
Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn
245 250 255

```
Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu
            260                 265                 270
Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn
        275                 280                 285
Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr
    290                 295                 300
His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp
305                 310                 315                 320
Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln
                325                 330                 335
Gly Ala
```

<210> 35
<211> 323
<212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

<400> 35

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

Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu
305 310 315 320
Gly Ala Gly

<210> 36
<211> 333
<212> PRT
<213> Mycobacterium leprae

<400> 36
Met Lys Phe Leu Gln Gln Met Arg Lys Leu Phe Gly Leu Ala Ala Lys
1 5 10 15
Phe Pro Ala Arg Leu Thr Ile Ala Val Ile Gly Thr Ala Leu Leu Ala
20 25 30
Gly Leu Val Gly Val Val Gly Asp Thr Ala Ile Ala Val Ala Phe Ser
35 40 45
Lys Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met
50 55 60
Gly His Asp Ile Lys Ile Gln Phe Gln Gly Gly Gly Gln His Ala Val
65 70 75 80
Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Glu Asp Tyr Asn Gly Trp Asp
85 90 95
Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Glu Tyr Tyr His Ser Gly Leu Ser Val
100 105 110
Ile Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asn Trp Tyr Gln
115 120 125
Pro Ser Gln Gly Asn Gly Gln His Tyr Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe
130 135 140
Leu Thr Gln Glu Met Pro Ser Trp Leu Gln Ala Asn Lys Asn Val Leu
145 150 155 160
Pro Thr Gly Asn Ala Ala Val Gly Leu Ser Met Ser Gly Ser Ser Ala
165 170 175
Leu Ile Leu Ala Ser Tyr Tyr Pro Gln Gln Phe Pro Tyr Ala Ala Ser
180 185 190
Leu Ser Gly Phe Leu Asn Pro Ser Glu Gly Trp Trp Pro Thr Met Ile
195 200 205
Gly Leu Ala Met Asn Asp Ser Gly Gly Tyr Asn Ala Asn Ser Met Trp
210 215 220
Gly Pro Ser Thr Asp Pro Ala Trp Lys Arg Asn Asp Pro Met Val Gln
225 230 235 240
Ile Pro Arg Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Ile Trp Val Tyr Cys Gly
245 250 255
Asn Gly Ala Pro Asn Glu Leu Gly Gly Asp Asn Ile Pro Ala Lys Phe
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Thr Leu Ser Thr Asn Glu Ile Phe Gln Asn Thr Tyr
275 280 285
Ala Ala Ser Gly Gly Arg Asn Gly Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly
290 295 300
Thr His Ser Trp Pro Tyr Trp Asn Gln Gln Leu Val Ala Met Lys Pro
305 310 315 320
Asp Ile Gln Gln Ile Leu Asn Gly Ser Asn Asn Asn Ala
325 330

<210> 37
<211> 340
<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 37

```
Met Thr Phe Phe Glu Gln Val Arg Arg Leu Arg Ser Ala Ala Thr Thr
 1               5                  10                  15
Leu Pro Arg Arg Val Ala Ile Ala Ala Met Gly Ala Val Leu Val Tyr
            20                  25                  30
Gly Leu Val Gly Thr Phe Gly Gly Pro Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser
        35                  40                  45
Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Ala Ser Met
    50                  55                  60
Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Gly Gly Gly Pro His Ala Val
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp
                85                  90                  95
Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Glu Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Val
            100                 105                 110
Ile Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Thr Asp Trp Tyr Gln
        115                 120                 125
Pro Ser Gln Ser Asn Gly Gln Asn Tyr Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe
    130                 135                 140
Leu Thr Arg Glu Met Pro Ala Trp Leu Gln Ala Asn Lys Gly Val Ser
145                 150                 155                 160
Pro Thr Gly Asn Ala Ala Val Gly Leu Ser Met Ser Gly Gly Ser Ala
                165                 170                 175
Leu Ile Leu Ala Ala Tyr Tyr Pro Gln Gln Phe Pro Tyr Ala Ala Ser
            180                 185                 190
Leu Ser Gly Phe Leu Asn Pro Ser Glu Gly Trp Trp Pro Thr Leu Ile
        195                 200                 205
Gly Leu Ala Met Asn Asp Ser Gly Gly Tyr Asn Ala Asn Ser Met Trp
    210                 215                 220
Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Lys Arg Asn Asp Pro Met Val Gln
225                 230                 235                 240
Ile Pro Arg Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Ile Trp Val Tyr Cys Gly
                245                 250                 255
Asn Gly Thr Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asp Asn Ile Pro Ala Lys Phe
            260                 265                 270
Leu Glu Gly Leu Thr Leu Arg Thr Asn Gln Thr Phe Arg Asp Thr Tyr
        275                 280                 285
Ala Ala Asp Gly Gly Arg Asn Gly Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly
    290                 295                 300
Thr His Ser Trp Pro Tyr Trp Asn Glu Gln Leu Val Ala Met Lys Ala
305                 310                 315                 320
Asp Ile Gln His Val Leu Asn Gly Ala Thr Pro Pro Ala Ala Pro Ala
                325                 330                 335
Ala Pro Ala Ala
            340
```

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> syntetizovaná sekvence
<220>
<223> sonda vyrobená v laboratoři

<400> 38

agcggctggg acatcaacac 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Sonda vyrobená v laboratoři

<400> 39
cagacgcggg tgttgttggc 20

<210> 40
<211> 1211
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 40
ggtaccggaa gctggaggat tgacggtatg agacttcttg acaggattcg tgggccttgg 60
gcacgccgtt tcggcgtcgt ggctgtcgcg acagcgatga tgcctgcttt ggtgggcctg 120
gctggagggt cggcgaccgc cggagcattc tcccggccag gtctgccggt ggagtacctg 180
atggtgcctt cgccgtcgat ggggcgcgac atcaagatcc agttccagag cggtggcgag 240
aactcgccgg ctctctacct gctcgacggc ctgcgtgcgc aggaggactt caacggctgg 300
gacatcaaca ctcaggcttt cgagtggttc ctcgacagcg gcatctccgt ggtgatgccg 360
gtcggtggcc agtccagctt ctacaccgac tggtacgccc ccgcccgtaa caagggcccg 420
accgtgacct acaagtggga gaccttcctg acccaggagc tcccgggctg gctgcaggcc 480
aaccgcgcgg tcaagccgac cggcagcggc cctgtcggtc tgtcgatggc gggttcggcc 540
gcgctgaacc tggcgacctg gcacccggag cagttcatct acgcgggctc gatgtccggc 600
ttcctgaacc cctccgaggg ctggtggccg ttcctgatca acatctcgat gggtgacgcc 660
ggcggcttca aggccgacga catgtggggc aagaccgagg ggatcccaac agcggttgga 720
cagcgcaacg atccgatgct gaacatcccg accctggtcg ccaacaacac ccgtatctgg 780
gtctactgcg gtaacggcca gcccaccgag ctcggcggcg gcgacctgcc cgccacgttc 840
ctcgaaggtc tgaccatccg caccaacgag accttccgcg acaactacat cgccgcgggt 900
ggccacaacg gtgtgttcaa cttcccggcc aacggcacgc acaactgggc gtactggggt 960
cgcgagctgc aggcgatgaa gcctgacctg caggcgcacc ttctctgacg gttgcacgaa 1020
acgaagcccc cggccgattg cggccgaggg tttcgtcgtc cggggctact gtggccgaca 1080
taaccgaaat caacgcgatg gtggctcatc aggaacgccg agggggtcat tgcgctacga 1140
cacgaggtgg gcgagcaatc cttcctgccc gacggagagg tcaacatcca cgtcgagtac 1200
tccagcgtga a 1211

<210> 41
<211> 485
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 41
agcggctggg acatcaacac cgccgccttc gagtggtacg tcgactcggg tctcgcggtg 60
atcatgcccg tcggcgggca gtccagcttc tacagcgact ggtacagccc ggcctgcggt 120
aaggccggct gccagaccta caagtgggag acgttcctga cccaggagct gccggcctac 180
ctcgccgcca acaaggggt cgacccgaac cgcaacgcgg ccgtcggtct gtccatggcc 240
ggttcggcgg cgctgacgct ggcgatctac cacccgcagc agttccagta cgccgggtcg 300
ctgtcgggct acctgaaccc gtccgagggg tggtggccga tgctgatcaa catctcgatg 360
ggtgacgcgg gcggctacaa ggccaacgac atgtggggtc caccgaagga cccgagcagc 420
gcctggaagc gcaacgaccc gatggtcaac atcggcaagc tggtggccaa caacaccccc 480
ctctc 485

<210> 42

<211> 1052
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 42

```
gttgatgaga aaggtgggtt gtttgccgtt atgaagttca cagagaagtg gcggggctcc      60
gcaaaggcgg cgatgcaccg ggtgggcgtt gccgatatgg ccgccgttgc gctgcccgga     120
ctgatcggct tcgccggggg ttcggcaacg gccggggcat tctcccggcc cggtcttcct     180
gtcgagtacc tcgacgtgtt ctcgccgtcg atgggccgcg acatccgggt ccagttccag     240
ggtggcggta ctcatgcggt ctacctgctc gacggtctgc gtgcccagga cgactacaac     300
ggctgggaca tcaacacccc tgcgttcgag tggttctacg agtccggctt gtcgacgatc     360
atgccggtcg gcggacagtc cagcttctac agcgactggt accagccgtc tcggggcaac     420
gggcagaact acacctacaa gtgggagacg ttcctgaccc aggagctgcc gacgtggctg     480
gaggccaacc gcggagtgtc gcgcaccggc aacgcgttcg tcggcctgtc gatggcgggc     540
agcgcggcgc tgacctacgc gatccatcac ccgcagcagt tcatctacgc ctcgtcgctg     600
tcaggcttcc tgaacccgtc cgagggctgg tggccgatgc tgatcgggct ggcgatgaac     660
gacgcaggcg gcttcaacgc cgagagcatg tggggcccgt cctcggaccc ggcgtggaag     720
cgcaacgacc cgatggtcaa catcaaccag ctggtggcca acaacacccg gatctggatc     780
tactgcggca ccggcacccc gtcggagctg gacaccggga ccccgggcca gaacctgatg     840
gccgcgcagt tcctcgaagg attcacgttg cggaccaaca tcgccttccg tgacaactac     900
atcgcagccg gcggcaccaa cggtgtcttc aacttcccgg cctcgggcac ccacagctgg     960
gggtactggg ggcagcagct gcagcagatg aagcccgaca tccagcgggt tctgggagct    1020
caggccaccg cctagccacc caccccacac cc                                  1052
```

<210> 43
<211> 326
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 43

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

Gly Asp Ala Gly Gly Phe Lys Ala Asp Asp Met Trp Gly Lys Thr Glu
210 215 220
Gly Ile Pro Thr Ala Val Gly Gln Arg Asn Asp Pro Met Leu Asn Ile
225 230 235 240
Pro Thr Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Ile Trp Val Tyr Cys Gly Asn
245 250 255
Gly Gln Pro Thr Glu Leu Gly Gly Gly Asp Leu Pro Ala Thr Phe Leu
260 265 270
Glu Gly Leu Thr Ile Arg Thr Asn Glu Thr Phe Arg Asp Asn Tyr Ile
275 280 285
Ala Ala Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asn Phe Pro Ala Asn Gly Thr
290 295 300
His Asn Trp Ala Tyr Trp Gly Arg Glu Leu Gln Ala Met Lys Pro Asp
305 310 315 320
Leu Gln Ala His Leu Leu
325

<210> 44
<211> 161
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 44
Ser Gly Trp Asp Ile Asn Thr Ala Ala Phe Glu Trp Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Gly Leu Ala Val Ile Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser
20 25 30
Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys
35 40 45
Trp Glu Thr Phe Leu Thr Gln Glu Leu Pro Ala Tyr Leu Ala Ala Asn
50 55 60
Lys Gly Val Asp Pro Asn Arg Asn Ala Ala Val Gly Leu Ser Met Ala
65 70 75 80
Gly Ser Ala Ala Leu Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Gln
85 90 95
Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ser Glu Gly Trp Trp
100 105 110
Pro Met Leu Ile Asn Ile Ser Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala
115 120 125
Asn Asp Met Trp Gly Pro Pro Lys Asp Pro Ser Ser Ala Trp Lys Arg
130 135 140
Asn Asp Pro Met Val Asn Ile Gly Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Pro
145 150 155 160
Leu

<210> 45
<211> 334
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 45
Met Lys Phe Thr Glu Lys Trp Arg Gly Ser Ala Lys Ala Ala Met His
1 5 10 15
Arg Val Gly Val Ala Asp Met Ala Ala Val Ala Leu Pro Gly Leu Ile
20 25 30

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

<210> 46
<211> 795
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 46

```
ctgccgcggg tttgccatct cttgggtcct gggtcgggag gccatgttct gggtaacgat      60
ccggtaccgt ccggcgatgt gaccaacatg cgaacagcga caacgaagct aggagcggcg     120
ctcggcgcag cagcattggt ggccgccacg gggatggtca gcgcggcgac ggcgaacgcc     180
caggaagggc accaggtccg ttacacgctc acctcggccg gcgcttacga gttcgacctg     240
ttctatctga cgacgcagcc gccgagcatg caggcgttca acgccgacgc gtatgcgttc     300
gccaagcggg agaaggtcag cctcgccccg ggtgtgccgt gggtcttcga aaccacgatg     360
gccgacccga actgggcgat ccttcaggtc agcagcacca cccgcggtgg gcaggccgcc     420
ccgaacgcgc actgcgacat cgccgtcgat ggccaggagg tgctcagcca gcacgacgac     480
ccctacaacg tgcggtgcca gctcggtcag tggtgagtca cctcgccgag agtccggcca     540
gcgccggcgg cagcggctcg cggtgcagca ccccgaggcg ctgggtcgcg cgggtcagcg     600
cgacgtaaag atcgctggcc ccgcgcggcc cctcggcgag gatctgctcc gggtagacca     660
ccagcacggc gtctaactcc agacccttgg tctgcgtggg tgccaccgcg cccgggacac     720
```

cgggcgggcc gatcaccacg ctggtgccct cccggtccgc ctccgcacgc acgaaatcgt 780
cgatggcacc ggcga 795

<210> 47
<211> 142
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 47

```
Met Arg Thr Ala Thr Thr Lys Leu Gly Ala Ala Leu Gly Ala Ala Ala
 1               5                  10                  15
Leu Val Ala Ala Thr Gly Met Val Ser Ala Ala Thr Ala Asn Ala Gln
            20                  25                  30
Glu Gly His Gln Val Arg Tyr Thr Leu Thr Ser Ala Gly Ala Tyr Glu
        35                  40                  45
Phe Asp Leu Phe Tyr Leu Thr Thr Gln Pro Pro Ser Met Gln Ala Phe
    50                  55                  60
Asn Ala Asp Ala Tyr Ala Phe Ala Lys Arg Glu Lys Val Ser Leu Ala
65                  70                  75                  80
Pro Gly Val Pro Trp Val Phe Glu Thr Thr Met Ala Asp Pro Asn Trp
                85                  90                  95
Ala Ile Leu Gln Val Ser Ser Thr Thr Arg Gly Gly Gln Ala Ala Pro
            100                 105                 110
Asn Ala His Cys Asp Ile Ala Val Asp Gly Gln Glu Val Leu Ser Gln
        115                 120                 125
His Asp Asp Pro Tyr Asn Val Arg Cys Gln Leu Gly Gln Trp
    130                 135                 140
```

<210> 48
<211> 300
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 48

```
gccagtgcgc caacggtttt catcgatgcc gcacacaacc ccggtgggcc ctgcgcttgc    60
cgaaggctgc gcgacgagtt cgacttccgg tatctcgtcg gcgtcgtctc ggtgatgggg   120
gacaaggacg tggacgggat ccgccaggac ccgggcgtgc cggacgggcg cggtctcgca   180
ctgttcgtct cgggcgacaa ccttcgaaag ggtgcggcgc tcaacacgat ccagatcgcc   240
gagctgctgg ccgcccagtt gtaagtgttc cgccgaaatt gcattccacg ccgataatcg   300
```

<210> 49
<211> 563
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 49

```
ggatcctcgg ccggctcaag agtccgcgcc gaggtggatg tgacgctgga cggctacgag    60
ttcagtcggg cctgcgaggc gctgtaccac ttcgcctggg acgagttctg cgactggtat   120
gtcgagcttg ccaaagtgca actgggtgaa ggtttctcgc acaccacggc cgtgttggcc   180
accgtgctcg atgtgctgct caagcttctg cacccggtca tgccgttcgt caccgaggtg   240
ctgtggaagg ccctgaccgg gcgggccggc gcgagcgaac gtctgggaaa tgtggagtca   300
ctggtcgtcg cggactggcc cacgcccacc ggatacgcgc tggatcaggc tgccgcacaa   360
cggatcgccg acacccagaa gttgatcacc gaggtgcgcc ggttccgcag cgatcagggt   420
ctggccgacc gccagcgggt gcctgcccgg ttgtccggca tcgacaccgc gggtctggac   480
gcccatgtcc cggcggtgcg cgcgctggcc tggcttgacc gagggtgatg agggcttcac   540
cgcgtccgaa tcggtcgagg tgc                                           563
```

<210> 50
<211> 434
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 50
gggccgggcc cgaggatgag caagttcgaa gtcgtcaccg ggatggcgtt cgcggctttc 60
gccgacgcgc ccatcgacgt cgccgtcgtc gaggtcgggc tcggtggtcg ctgggacgcg 120
acgaacgtgg tgaacgcacc ggtcgcggtc atcaccccga tcggggtgga ccacaccgac 180
tacctcggtg acacgatcgc cgagatcgcc ggggagaagg ccggaaatca tcacccgcca 240
gccgacgacc tggtgccgac cgacaccgtc gccgtgctgg cgcggcaggt tcccgaggcc 300
atggaggtgc tgctggccca ggcggtgcgc tcggatgcgg ctgtagcgcg cgaggattcg 360
gagtgcgcgg tgctgggccg tcaggtcgcc atcggcggca gctgctccgg ttgcaggggc 420
tcggtggcgt ctac 434

<210> 51
<211> 438
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 51
ggatcccact cccgcgccgg cggcggccag ctggtacggc cattccagcg tgctgatcga 60
ggtcgacggc taccgcgtgc tggccgaccc ggtgtggagc aacagatgtt cgccctcacg 120
ggcggtcgga ccgcagcgca tgcacgacgt cccggtgccg ctggaggcgc ttcccgccgt 180
ggacgcggtg gtgatcgcca acgaccacta cgaccacctc gacatcgaca ccatcgtcgc 240
gttggcgcac acccagcggg ccccgttcgt ggtgccgttg ggcatcggcg cacacctgcg 300
caagtggggc gtccccgagg cgcggatcgt cgagttggac tggcacgaag cccaccgcat 360
cgacgacctg acgctggtct gcaccccgc ccggcacttc tccggccggt tgttctcccg 420
cgactcgacg ctgtgggc 438

<210> 52
<211> 87
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 52
Ala Ser Ala Pro Thr Val Phe Ile Asp Ala Ala His Asn Pro Gly Gly
1 5 10 15
Pro Cys Ala Cys Arg Arg Leu Arg Asp Glu Phe Asp Phe Arg Tyr Leu
20 25 30
Val Gly Val Val Ser Val Met Gly Asp Lys Asp Val Asp Gly Ile Arg
35 40 45
Gln Asp Pro Gly Val Pro Asp Gly Arg Gly Leu Ala Leu Phe Val Ser
50 55 60
Gly Asp Asn Leu Arg Lys Gly Ala Ala Leu Asn Thr Ile Gln Ile Ala
65 70 75 80
Glu Leu Leu Ala Ala Gln Leu
85

<210> 53
<211> 175
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 53
Gly Ser Ser Ala Gly Ser Arg Val Arg Ala Glu Val Asp Val Thr Leu
1 5 10 15

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

<210> 54
<211> 144
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 54

```
Gly Pro Gly Pro Arg Asn Ser Lys Phe Glu Val Val Thr Gly Met Ala
 1               5                  10                  15
Phe Ala Ala Phe Ala Asp Ala Pro Ile Asp Val Ala Val Val Glu Val
            20                  25                  30
Gly Leu Gly Gly Arg Trp Asp Ala Thr Asn Val Val Asn Ala Pro Val
        35                  40                  45
Ala Val Ile Thr Pro Ile Gly Val Asp His Thr Asp Tyr Leu Gly Asp
    50                  55                  60
Thr Ile Ala Glu Ile Ala Gly Glu Lys Ala Gly Asn His His Pro Pro
65                  70                  75                  80
Ala Asp Asp Leu Val Pro Thr Asp Thr Val Ala Val Leu Ala Arg Gln
                85                  90                  95
Val Pro Glu Ala Asn Glu Val Leu Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Asp
            100                 105                 110
Ala Ala Val Ala Arg Glu Asp Ser Glu Cys Ala Val Leu Gly Arg Gln
        115                 120                 125
Val Ala Ile Gly Gly Ser Cys Ser Gly Cys Arg Gly Ser Val Ala Ser
    130                 135                 140
```

<210> 55
<211> 145
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 55

```
Asp Pro Thr Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser Trp Tyr Gly His Ser Ser
 1               5                  10                  15
Val Leu Ile Glu Val Asp Gly Tyr Arg Val Leu Ala Asp Pro Val Trp
            20                  25                  30
```

```
Ser Asn Arg Cys Ser Pro Ser Arg Ala Val Gly Pro Gln Arg Met His
         35                  40                  45
 Asp Val Pro Val Pro Leu Glu Ala Leu Pro Ala Val Asp Ala Val Val
     50                  55                  60
 Ile Ser Asn Asp His Tyr Asp His Leu Asp Ile Asp Thr Ile Val Ala
 65                  70                  75                  80
 Leu Ala His Thr Gln Arg Ala Pro Phe Val Val Pro Leu Gly Ile Gly
                 85                  90                  95
 Ala His Leu Arg Lys Trp Gly Val Pro Glu Ala Arg Ile Val Glu Leu
             100                 105                 110
 Asp Trp His Glu Ala His Arg Ile Asp Asp Leu Thr Leu Val Cys Thr
         115                 120                 125
 Pro Ala Arg His Phe Ser Gly Arg Leu Phe Ser Arg Asp Ser Thr Leu
     130                 135                 140
 Trp
 145
```

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (1)...(1)
<223> Zbytek může být buďGly, Ile, Leu or Val

<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)
<223> Zbytek může být buďIle, Leu, Gly, or Ala

<221> NEJISTÉ
<222> (5)...(5)

<221> NEJISTÉ
<222> (9)...(9)

<400> 56

```
Xaa Xaa Ala Pro Xaa Gly Asp Ala Xaa Arg
 1               5                  10
```

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (7)...(7)
<223> Zbytek může být buďIle or Leu

<400> 57

```
Pro Glu Ala Glu Ala Asn Xaa Arg
 1               5
```

<210> 58
<211> 11

<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (4)...(4)
<223> Zbytek může být buďGln or Gly

<221> NEJISTÉ
<222> (5)...(5)
<223> Zbytek může být buďGly or Gln

<400> 58
Thr Ala Asn Xaa Xaa Glu Tyr Tyr Asp Asn Arg
1 5 10

<210> 59
<211> 34
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 59
Asn Ser Pro Arg Ala Glu Ala Glu Ala Asn Leu Arg Gly Tyr Phe Thr
1 5 10 15
Ala Asn Pro Ala Glu Tyr Tyr Asp Leu Arg Gly Ile Leu Ala Pro Ile
20 25 30
Gly Asp

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 60
ccggtgggcc cgggctgcgc 20

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> vyrobano v laboratoři
<400> 61
tggccggcca ccacgtggta 20

<210> 62
<211> 313
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 62
gccggtgggc ccgggctgcg cggaatacgc ggcagccaat cccactgggc cggcctcggt 60

gcagggaatg tcgcaggacc cggtcgcggt ggcggcctcg aacaatccgg agttgacaac 120
gctgtacggc tgcactgtcg ggccagctca atccgcaagt aaacctggtg gacaccctca 180
acagcggtca gtacacggtg ttcgcaccga ccaacgcggc atttagcaag ctgccggcat 240
ccacgatcga cgagctcaag accaattcgt cactgctgac cagcatcctg acctaccacg 300
tggtggccgg cca 313

<210> 63
<211> 18
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (7)...(17)

<400> 63
Glu Pro Ala Gly Pro Leu Pro Xaa Tyr Asn Glu Arg Leu His Thr Leu
1 5 10 15
Xaa Gln

<210> 64
<211> 25
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (21)...(21)

<400> 64
Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Gly Arg Thr Leu
1 5 10 15
Thr Val Gln Gln Xaa Asp Thr Phe Leu
20 25

<210> 65
<211> 26
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (3)...(3)

<221> NEJISTÉ
<222> (21)...(22)

<221> NEJISTÉ
<222> (24)...(24)

<400> 65
Asp Pro Xaa Pro Asp Ile Glu Val Glu Phe Ala Arg Gly Thr Gly Ala
1 5 10 15
Glu Pro Gly Leu Xaa Xaa Val Xaa Asp Ala
20 25

<210> 66
<211> 32
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 66
accgccctcg agttctcccg gccaggtctg cc 32

<210> 67
<211> 32
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 67
aagcacgagc tcagtctctt ccacgcggac gt 32

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 68
catggatcca ttctcccggc ccggtcttcc 30

<210> 69
<211> 26
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 69
tttgaattct aggcggtggc ctgagc 26

<210> 70
<211> 161
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 70

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

```
    50                  55                  60
Lys Gly Val Asp Pro Asn Arg Asn Ala Ala Val Gly Leu Ser Met Ala
65                  70                  75                  80
Gly Ser Ala Ala Leu Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Gln
                85                  90                  95
Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ser Glu Gly Trp Trp
            100                 105                 110
Pro Met Leu Ile Asn Ile Ser Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala
        115                 120                 125
Asn Asp Met Trp Gly Arg Thr Glu Asp Pro Ser Ser Ala Trp Lys Arg
    130                 135                 140
Asn Asp Pro Met Val Asn Ile Gly Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Pro
145                 150                 155                 160
Leu
```

<210> 71
<211> 33
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 71
gagagactcg agaacgccca ggaagggcac cag 33

<210> 72
<211> 32
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 72
gagagactcg agtgactcac cactgaccga gc 32

<210> 73
<211> 20
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<221> NEJISTÉ
<222> (3)...(3)

<221> NEJISTÉ
<222> (6)...(6)

<221> NEJISTÉ
<222> (9)...(9)

<221> NEJISTÉ
<222> (15)...(15)

<400> 73
ggngcngcnc argcngarcc 20

<210> 74
<211> 825
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 74
ttggatccca ctcccgcgcc ggcggcggcc agctggtacg gccattccag cgtgctgatc 60
gaggtcgacg gctaccgcgt gctggccgac ccggtgtgga gcaacagatg ttcgccctca 120
cgggcggtcg gaccgcagcg catgcacgac gtcccggtgc cgctggaggc gcttcccgcc 180
gtggacgcgg tggtgatcag ccacgaccac tacgaccacc tcgacatcga caccatcgtc 240
gcgttggcgc acacccagcg ggccccgttc gtggtgccgt tgggcatcgg cgcacacctg 300
cgcaagtggg gcgtccccga ggcgcggatc gtcgagttgg actggcacga agcccaccgc 360
atagacgacc tgacgctggt ctgcaccccc gcccggcact tctccggacg gttgttctcc 420
cgcgactcga cgctgtgggc gtcgtgggtg gtcaccggct cgtcgcacaa ggcgttcttc 480
ggtggcgaca ccggatacac gaagagcttc gccgagatcg gcgacgagta cggtccgttc 540
gatctgaccc tgctgccgat cggggcctac catcccgcgt tcgccgacat ccacatgaac 600
cccgaggagg cggtgcgcgc ccatctggac ctgaccgagg tggacaacag cctgatggtg 660
cccatccact gggcgacatt ccgcctcgcc ccgcatccgt ggtccgagcc cgccgaacgc 720
ctgctgaccg ctgccgacgc cgagcgggta cgcctgaccg tgccgattcc cggtcagcgg 780
gtggacccgg agtcgacgtt cgacccgtgg tggcggttct gaacc 825

<210> 75
<211> 273
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 75
Leu Asp Pro Thr Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser Trp Tyr Gly His Ser
1 5 10 15
Ser Val Leu Ile Glu Val Asp Gly Tyr Arg Val Leu Ala Asp Pro Val
20 25 30
Trp Ser Asn Arg Cys Ser Pro Ser Arg Ala Val Gly Pro Gln Arg Met
35 40 45
His Asp Val Pro Val Pro Leu Glu Ala Leu Pro Ala Val Asp Ala Val
50 55 60
Val Ile Ser His Asp His Tyr Asp His Leu Asp Ile Asp Thr Ile Val
65 70 75 80
Ala Leu Ala His Thr Gln Arg Ala Pro Phe Val Val Pro Leu Gly Ile
85 90 95
Gly Ala His Leu Arg Lys Trp Gly Val Pro Glu Ala Arg Ile Val Glu
100 105 110
Leu Asp Trp His Glu Ala His Arg Ile Asp Asp Leu Thr Leu Val Cys
115 120 125
Thr Pro Ala Arg His Phe Ser Gly Arg Leu Phe Ser Arg Asp Ser Thr
130 135 140
Leu Trp Ala Ser Trp Val Val Thr Gly Ser Ser His Lys Ala Phe Phe
145 150 155 160
Gly Gly Asp Thr Gly Tyr Thr Lys Ser Phe Ala Glu Ile Gly Asp Glu
165 170 175
Tyr Gly Pro Phe Asp Leu Thr Leu Leu Pro Ile Gly Ala Tyr His Pro
180 185 190
Ala Phe Ala Asp Ile His Met Asn Pro Glu Glu Ala Val Arg Ala His
195 200 205

```
Leu Asp Leu Thr Glu Val Asp Asn Ser Leu Met Val Pro Ile His Trp
    210                 215                 220
Ala Thr Phe Arg Leu Ala Pro His Pro Trp Ser Glu Pro Ala Glu Arg
225                 230                 235                 240
Leu Leu Thr Ala Ala Asp Ala Glu Arg Val Arg Leu Thr Val Pro Ile
                245                 250                 255
Pro Gly Gln Arg Val Asp Pro Glu Ser Thr Phe Asp Pro Trp Trp Arg
            260                 265                 270
Phe
```

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 76

```
Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala
 1               5                  10
```

<210> 77
<211> 337
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 77

```
gatccctaca tcctgctggt cagctccaag gtgtcgaccg tcaaggatct gctcccgctg      60
ctggagaagg tcatccaggc cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc     120
gaggccctgt ccacgctggt ggtcaacaag atccgcggca ccttcaagtc cgtcgccgtc     180
aaggctccgg gcttcggtga ccgccgcaag gcgatgctgc aggacatggc catcctcacc     240
ggtggtcagg tcgtcagcga aagagtcggg ctgtccctgg agaccgccga cgtctcgctg     300
ctgggccagg cccgcaaggt cgtcgtcacc aaggaca                              337
```

<210> 78
<211> 112
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 78

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

<210> 79
<211> 360
<212> DNA

<213> Mycobacterium vaccae

<400> 79
ccgtacgaga agatcggcgc tgagctggtc aaagaggtcg ccaagaagac cgacgacgtc 60
gcgggcgacg gcaccaccac cgccaccgtg ctcgctcagg ctctggttcg cgaaggcctg 120
cgcaacgtcg cagccggcgc caacccgctc ggcctcaagc gtggcatcga gaaggctgtc 180
gaggctgtca cccagtcgct gctgaagtcg gccaaggagg tcgagaccaa ggagcagatt 240
tctgccaccg cggcgatctc cgccggcgac acccagatcg gcgagctcat cgccgaggcc 300
atggacaagg tcggcaacga gggtgtcatc accgtcgagg agtcgaacac cttcggcctg 360

<210> 80
<211> 120
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 80
Pro Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys
1 5 10 15
Thr Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala
20 25 30
Gln Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala Gly Ala Asn
35 40 45
Pro Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Ala Val Thr
50 55 60
Gln Ser Leu Leu Lys Ser Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys Glu Gln Ile
65 70 75 80
Ser Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Thr Gln Ile Gly Glu Leu
85 90 95
Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val Ile Thr Val
100 105 110
Glu Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu
115 120

<210> 81
<211> 43
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 81
actgacgctg aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tag 43

<210> 82
<211> 43
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 82
cgacaaggaa cttcgctacc ttaggaccgt catagttacg ggc 43

<210> 83
<211> 20

<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 83
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 20

<210> 84
<211> 31
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 84
ggaaggaagc ggccgctttt ttttttttt t 31

<210> 85
<211> 31
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 85
gagagagagc ccgggcatgc tsctsctsct s 31

<210> 86
<211> 238
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 86
ctcgatgaac cgctcggagc gctcgacctg aagctgcgcc acgtcatgca gttcgagctc 60
aagcgcatcc agcgggaggt cgggatcacg ttcatctacg tgacccacga ccaggaagag 120
gcgctcacga tgagtgaccg catcgcggtg atgaacgccg gcaacgtcga acagatcggc 180
agcccgaccg agatctacga ccgtcccgcg acggtgttcg tcgccagctt catcgaat 238

<210> 87
<211> 79
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 87
Leu Asp Glu Pro Leu Gly Ala Leu Asp Leu Lys Leu Arg His Val Met
1 5 10 15
Gln Phe Glu Leu Lys Arg Ile Gln Arg Glu Val Gly Ile Thr Phe Ile
20 25 30
Tyr Val Thr His Asp Gln Glu Glu Ala Leu Thr Met Ser Asp Arg Ile
35 40 45
Ala Val Met Asn Ala Gly Asn Val Glu Gln Ile Gly Ser Pro Thr Glu
50 55 60

Ile Tyr Asp Arg Pro Ala Thr Val Phe Val Ala Ser Phe Ile Glu
65 70 75

<210> 88
<211> 1518
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 88
cactcgccat gggtgttaca ataccccacc agttcctcga agtaaacgaa cagaaccgtg 60
acatccagct gagaaaatat tcacagcgac gaagcccggc cgatgcctga tggggtccgg 120
catcagtaca gcgcgctttc ctgcgcggat tctattgtcg agtccggggt gtgacgaagg 180
aatccattgt cgaaatgtaa attcgttgcg gaatcacttg cataggtccg tcagatccgc 240
gaaggtttac cccacagcca cgacggctgt ccccgaggag gacctgccct gaccggcaca 300
cacatcaccg ctgcagaacc tgcagaacag acggcggatt ccgcggcacc gcccaagggc 360
gcgccggtga tcgagatcga ccatgtcacg aagcgcttcg gcgactacct ggccgtcgcg 420
gacgcagact tctccatcgc gcccggggag ttcttctcca tgctcggccc gtccgggtgt 480
gggaagacga ccacgttgcg catgatcgcg ggattcgaga ccccgactga aggggcgatc 540
cgcctcgaag gcgccgacgt gtcgaggacc ccacccaaca agcgcaacgt caacacggtg 600
ttccagcact acgcgctgtt cccgcacatg acggtctggg acaacgtcgc gtacggcccg 660
cgcagcaaga aactcggcaa aggcgaggtc cgcaagcgcg tcgacgagct gctggagatc 720
gtccggctga ccgaatttgc cgagcgcagg cccgcccagc tgtccggcgg gcagcagcag 780
cgggtggcgt tggcccgggc actggtgaac taccccagcg cgctgctgct cgatgaaccg 840
ctcggagcgc tcgacctgaa gctgcgccac gtcatgcagt tcgagctcaa gcgcatccag 900
cgggaggtcg ggatcacgtt catctacgtg acccacgacc aggaagaggc gctcacgatg 960
agtgaccgca tcgcggtgat gaacgccggc aacgtcgaac agatcggcag cccgaccgag 1020
atctacgacc gtcccgcgac ggtgttcgtc gccagcttca tcggacaggc caacctctgg 1080
gcgggccggt gcaccggccg ctccaaccgc gattacgtcg agatcgacgt tctcggctcg 1140
acgctgaagg cacgcccggg cgagaccacg atcgagcccg gcgggcacgc caccctgatg 1200
gtgcgtccgg aacgcatccg ggtcaccccg ggctcccagg acgcgccgac cggtgacgtc 1260
gcctgcgtgc gtgccaccgt caccgacctg accttccaag gtccggtggt gcggctctcg 1320
ctggccgctc cggacgactc gaccgtgatc gcccacgtcg gccccgagca ggatctgccg 1380
ctgctgcgcc ccggcgacga cgtgtacgtc agctgggcac cggaagcctc cctggtgctt 1440
cccggcgacg acatccccac caccgaggac ctcgaagaga tgctcgacga ctcctgagtc 1500
acgcttcccg attgccga 1518

<210> 89
<211> 376
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 89
Val Ile Glu Ile Asp His Val Thr Lys Arg Phe Gly Asp Tyr Leu Ala
1 5 10 15
Val Ala Asp Ala Asp Phe Ser Ile Ala Pro Gly Glu Phe Phe Ser Met
20 25 30
Leu Gly Pro Ser Gly Cys Gly Lys Thr Thr Thr Leu Arg Met Ile Ala
35 40 45
Gly Phe Glu Thr Pro Thr Glu Gly Ala Ile Arg Leu Glu Gly Ala Asp
50 55 60
Val Ser Arg Thr Pro Pro Asn Lys Arg Asn Val Asn Thr Val Phe Gln
65 70 75 80
His Tyr Ala Leu Phe Pro His Met Thr Val Trp Asp Asn Val Ala Tyr
85 90 95
Gly Pro Arg Ser Lys Lys Leu Gly Lys Gly Glu Val Arg Lys Arg Val
100 105 110

```
Asp Glu Leu Leu Glu Ile Val Arg Leu Thr Glu Phe Ala Glu Arg Arg
        115                 120                 125
 Pro Ala Gln Leu Ser Gly Gly Gln Gln Arg Val Ala Leu Ala Arg
    130                 135                 140
 Ala Leu Val Asn Tyr Pro Ser Ala Leu Leu Leu Asp Glu Pro Leu Gly
145                 150                 155                 160
 Ala Leu Asp Leu Lys Leu Arg His Val Met Gln Phe Glu Leu Lys Arg
                165                 170                 175
 Ile Gln Arg Glu Val Gly Ile Thr Phe Ile Tyr Val Thr His Asp Gln
            180                 185                 190
 Glu Glu Ala Leu Thr Met Ser Asp Arg Ile Ala Val Met Asn Ala Gly
        195                 200                 205
 Asn Val Glu Gln Ile Gly Ser Pro Thr Glu Ile Tyr Asp Arg Pro Ala
    210                 215                 220
 Thr Val Phe Val Ala Ser Phe Ile Gly Gln Ala Asn Leu Trp Ala Gly
225                 230                 235                 240
 Arg Cys Thr Gly Arg Ser Asn Arg Asp Tyr Val Glu Ile Asp Val Leu
                245                 250                 255
 Gly Ser Thr Leu Lys Ala Arg Pro Gly Glu Thr Thr Ile Glu Pro Gly
            260                 265                 270
 Gly His Ala Thr Leu Met Val Arg Pro Glu Arg Ile Arg Val Thr Pro
        275                 280                 285
 Gly Ser Gln Asp Ala Pro Thr Gly Asp Val Ala Cys Val Arg Ala Thr
    290                 295                 300
 Val Thr Asp Leu Thr Phe Gln Gly Pro Val Val Arg Leu Ser Leu Ala
305                 310                 315                 320
 Ala Pro Asp Asp Ser Thr Val Ile Ala His Val Gly Pro Glu Gln Asp
                325                 330                 335
 Leu Pro Leu Leu Arg Pro Gly Asp Asp Val Tyr Val Ser Trp Ala Pro
            340                 345                 350
 Glu Ala Ser Leu Val Leu Pro Gly Asp Asp Ile Pro Thr Thr Glu Asp
        355                 360                 365
 Leu Glu Glu Met Leu Asp Asp Ser
    370                 375
```

<210> 90
<211> 33
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 90
gagagactcg aggtgatcga gatcgaccat gtc 33

<210> 91
<211> 31
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 91
agagactcga gcaatcggga agcgtgactc a 31

<210> 92
<211> 323
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 92
gtcgactaca aagaagactt caacgacaac gagcagtggt tcgccaaggt caaggagccg 60
ttgtcgcgca agcaggacat aggcgccgac ctggtgatcc ccaccgagtt catggccgcg 120
cgcgtcaagg gcctgggatg gctcaatgag atcagcgaag ccggcgtgcc caatcgcaag 180
aatctgcgtc aggacctgtt ggactcgagc atcgacgagg gccgcaagtt caccgcgccg 240
tacatgaccg gcatggtcgg tctcgcctac aacaaggcag ccaccggacg cgatatccgc 300
accatcgacg acctctggga tcc 323

<210> 93
<211> 1341
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 93
ccccaccccc ttccctggag ccgacgaaag gcacccgcac atgtcccgtg acatcgatcc 60
ccacctgctg gcccgaatga ccgcacgccg caccttgcgt cgccgcttca tcggcggtgg 120
cgccgcggcc gccgcgggcc tgaccctcgg ttcgtcgttc ctggcggcgt gcgggtccga 180
cagtgggacc tcgagcacca cgtcacagga cagcggcccc gccagcggcg ccctgcgcgt 240
ctccaactgg ccgctctata tggccgacgg tttcatcgca gcgttccaga ccgcctcggg 300
catcacggtc gactacaaag aagacttcaa cgacaacgag cagtggttcg ccaaggtcaa 360
ggagccgttg tcgcgcaagc aggacatagg cgccgacctg gtgatcccca ccgagttcat 420
ggccgcgcgc gtcaagggcc tgggatggct caatgagatc agcgaagccg gcgtgcccaa 480
tcgcaagaat ctgcgtcagg acctgttgga ctcgagcatc gacgagggcc gcaagttcac 540
cgcgccgtac atgaccggca tggtcggtct cgcctacaac aaggcagcca ccggacgcga 600
tatccgcacc atcgacgacc tctgggatcc cgcgttcaag ggccgcgtca gtctgttctc 660
cgacgtccag gacggcctcg gcatgatcat gctctcgcag ggcaactcgc cggagaatcc 720
gaccaccgag tccattcagc aggcggtcga tctggtccgc gaacagaacg acaggggtc 780
agatccgtcg cttcaccggc aacgactacg ccgacgacct ggccgcagaa acatcgccat 840
cgcgcaggcg tactccggtg acgtcgtgca gctgcaggcg gacaaccccg atctgcagtt 900
catcgttccc gaatccggcg gcgactggtt cgtcgacacg atggtgatcc cgtacaccac 960
gcagaaccag aaggccgccg aggcgtggat cgactacatc tacgaccgag ccaactacgc 1020
caagctggtc gcgttcaccc agttcgtgcc cgcactctcg gacatgaccg acgaactcgc 1080
caaggtcgat cctgcatcgg cggagaaccc gctgatcaac ccgtcggccg aggtgcaggc 1140
gaacctgaag tcgtgggcgg cactgaccga cgagcagacg caggagttca acactgcgta 1200
cgccgccgtc accggcggct gacgcggtgg tagtgccgat gcgaggggca taaatggccc 1260
tgcggacgcg aggagcataa atggccggtg tcgccaccag cagccgtcag cggacaaggt 1320
cgctccgtat ctgatggtcc t 1341

<210> 94
<211> 393
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 94
Met Ser Arg Asp Ile Asp Pro His Leu Leu Ala Arg Met Thr Ala Arg
1 5 10 15
Arg Thr Leu Arg Arg Arg Phe Ile Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala
20 25 30
Gly Leu Thr Leu Gly Ser Ser Phe Leu Ala Ala Cys Gly Ser Asp Ser
35 40 45
Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ser Gln Asp Ser Gly Pro Ala Ser Gly Ala
50 55 60

```
Leu Arg Val Ser Asn Trp Pro Leu Tyr Met Ala Asp Gly Phe Ile Ala
65                  70                  75                  80
Ala Phe Gln Thr Ala Ser Gly Ile Thr Val Asp Tyr Lys Glu Asp Phe
                85                  90                  95
Asn Asp Asn Glu Gln Trp Phe Ala Lys Val Lys Glu Pro Leu Ser Arg
            100                 105                 110
Lys Gln Asp Ile Gly Ala Asp Leu Val Ile Pro Thr Glu Phe Met Ala
        115                 120                 125
Ala Arg Val Lys Gly Leu Gly Trp Leu Asn Glu Ile Ser Glu Ala Gly
    130                 135                 140
Val Pro Asn Arg Lys Asn Leu Arg Gln Asp Leu Leu Asp Ser Ser Ile
145                 150                 155                 160
Asp Glu Gly Arg Lys Phe Thr Ala Pro Tyr Met Thr Gly Met Val Gly
                165                 170                 175
Leu Ala Tyr Asn Lys Ala Ala Thr Gly Arg Asp Ile Arg Thr Ile Asp
            180                 185                 190
Asp Leu Trp Asp Pro Ala Phe Lys Gly Arg Val Ser Leu Phe Ser Asp
        195                 200                 205
Val Gln Asp Gly Leu Gly Met Ile Met Leu Ser Gln Gly Asn Ser Pro
    210                 215                 220
Glu Asn Pro Thr Thr Glu Ser Ile Gln Gln Ala Val Asp Leu Val Arg
225                 230                 235                 240
Glu Gln Asn Asp Arg Gly Ser Asp Pro Ser Leu His Arg Gln Arg Leu
                245                 250                 255
Arg Arg Arg Pro Gly Arg Arg Asn Ile Ala Ile Ala Gln Ala Tyr Ser
            260                 265                 270
Gly Asp Val Val Gln Leu Gln Ala Asp Asn Pro Asp Leu Gln Phe Ile
        275                 280                 285
Val Pro Glu Ser Gly Gly Asp Trp Phe Val Asp Thr Met Val Ile Pro
    290                 295                 300
Tyr Thr Thr Gln Asn Gln Lys Ala Ala Glu Ala Trp Ile Asp Tyr Ile
305                 310                 315                 320
Tyr Asp Arg Ala Asn Tyr Ala Lys Leu Val Ala Phe Thr Gln Phe Val
                325                 330                 335
Pro Ala Leu Ser Asp Met Thr Asp Glu Leu Ala Lys Val Asp Pro Ala
            340                 345                 350
Ser Ala Glu Asn Pro Leu Ile Asn Pro Ser Ala Glu Val Gln Ala Asn
        355                 360                 365
Leu Lys Ser Trp Ala Ala Leu Thr Asp Glu Gln Thr Gln Glu Phe Asn
    370                 375                 380
Thr Ala Tyr Ala Ala Val Thr Gly Gly
385                 390
```

<210> 95
<211> 22
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 95
atgtcccgtg acatcgatcc cc 22

<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 96

atcggcacta ccaccgcgtc a 21

<210> 97
<211> 861
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 97
gccggcgctc gcatatctcg cgatcttctt ccgtggtgcc gttcttctcg ctggcacgca 60
cctcgttgtc ggagaccggc ggctcggtgt tcatgccgac gctgacgttc gcctgggact 120
tcggcaacta cgtcgacgcg ttcacgatgt accacgagca gatcttccgc tcgttcggct 180
acgcgttcgt cgccacggtg ctgtgcctgt tgctggcgtt cccgctggcc tacgtcatcg 240
cgttcaaggc cggccggttc aagaacctga tcctggggct ggtgatcctg ccgttcttcg 300
tcacgttcct gatccgcacc attgcgtgga agacgatcct ggccgacgaa ggctgggtgg 360
tcaccgcgct gggcgccatc gggctgctgc ctgacgaggg ccggctgctg tccaccagct 420
gggcggtcat cggcggtctg acctacaact ggatcatctt catgatcctg ccgctgtacg 480
tcagcctgga gaagatcgac ccgcgtctgc tggaggcctc ccaggacctc tactcgtcgg 540
cgccgcgcag cttcggcaag gtgatcctgc cgatggcgat gcccggggtg ctggccggga 600
gcatgctggt gttcatcccg gccgtcggcg acttcatcaa cgccgactat ctcggcagta 660
cccagaccac catgatcggc aacgtgatcc agaagcagtt cctggtcgtc aaggactatc 720
cggcggcggc cgcgctgagt ctggggctga tgttgctgat cctgatcggc gtgctcctct 780
acacacgggc gctgggttcg gaggatctgg tatgaccacc caggcaggcg ccgcactggc 840
caccgccgcc cagcaggatc c 861

<210> 98
<211> 259
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 98
Val Val Pro Phe Phe Ser Leu Ala Arg Thr Ser Leu Ser Glu Thr Gly
1 5 10 15
Gly Ser Val Phe Met Pro Thr Leu Thr Phe Ala Trp Asp Phe Gly Asn
20 25 30
Tyr Val Asp Ala Phe Thr Met Tyr His Glu Gln Ile Phe Arg Ser Phe
35 40 45
Gly Tyr Ala Phe Val Ala Thr Val Leu Cys Leu Leu Leu Ala Phe Pro
50 55 60
Leu Ala Tyr Val Ile Ala Phe Lys Ala Gly Arg Phe Lys Asn Leu Ile
65 70 75 80
Leu Gly Leu Val Ile Leu Pro Phe Phe Val Thr Phe Leu Ile Arg Thr
85 90 95
Ile Ala Trp Thr Ile Leu Ala Asp Glu Gly Trp Val Val Thr Ala Leu
100 105 110
Gly Ala Ile Gly Leu Leu Pro Asp Glu Gly Arg Leu Leu Ser Thr Ser
115 120 125
Trp Ala Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Asn Trp Ile Ile Phe Met Ile
130 135 140
Leu Pro Leu Tyr Val Ser Leu Glu Lys Ile Asp Pro Arg Leu Leu Glu
145 150 155 160
Ala Ser Gln Asp Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Arg Ser Phe Gly Lys Val
165 170 175
Ile Leu Pro Met Ala Met Pro Gly Val Leu Ala Gly Ser Met Leu Val
180 185 190
Phe Ile Pro Ala Val Gly Asp Phe Ile Asn Ala Asp Tyr Leu Gly Ser
195 200 205

Thr Gln Thr Thr Met Ile Gly Asn Val Ile Gln Lys Gln Phe Leu Val
210 215 220
Val Lys Asp Tyr Pro Ala Ala Ala Ala Leu Ser Leu Gly Leu Met Leu
225 230 235 240
Leu Ile Leu Ile Gly Val Leu Leu Tyr Thr Arg Ala Leu Gly Ser Glu
245 250 255
Asp Leu Val

<210> 99
<211> 277
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 99
gtaatctttg ctggagcccg tacgccggta ggcaaactca tgggttcgct caaggacttc 60
aagggcagcg atctcggtgc cgtggcgatc aagggcgccc tggagaaagc cttccccggc 120
gtcgacgacc ctgctcgtct cgtcgagtac gtgatcatgg gccaagtgct ctccgccggc 180
gccggccaga tgcccgcccg ccaggccgcc gtcgccgccg gcatcccgtg ggacgtcgcc 240
tcgctgacga tcaacaagat gtgcctgtcg ggcatcg 277

<210> 100
<211> 92
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 100
Val Ile Phe Ala Gly Ala Arg Thr Pro Val Gly Lys Leu Met Gly Ser
1 5 10 15
Leu Lys Asp Phe Lys Gly Ser Asp Leu Gly Ala Val Ala Ile Lys Gly
20 25 30
Ala Leu Glu Lys Ala Phe Pro Gly Val Asp Asp Pro Ala Arg Leu Val
35 40 45
Glu Tyr Val Ile Met Gly Gln Val Leu Ser Ala Gly Ala Gly Gln Met
50 55 60
Pro Ala Arg Gln Ala Ala Val Ala Ala Gly Ile Pro Trp Asp Val Ala
65 70 75 80
Ser Leu Thr Ile Asn Lys Met Cys Leu Ser Gly Ile
85 90

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (1)...(1)
<223> Zbytek může být buď Glu, nebo Pro

<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)
<223> Zbytek může být buď Pro, nebo Glu

<221> NEJISTÉ
<222> (7)...(7)

<221> NEJISTÉ
<222> (12)...(12)

<400> 101
Xaa Xaa Ala Asp Arg Gly Xaa Ser Lys Tyr Arg Xaa
1 5 10

<210> 102
<211> 24
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (1)...(1)

<400> 102
Xaa Ile Asp Glu Ser Leu Phe Asp Ala Glu Glu Lys Met Glu Lys Ala
1 5 10 15
Val Ser Val Ala Arg Asp Ser Ala
20

<210> 103
<211> 23
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (1)...(2)

<221> NEJISTÉ
<222> (15)...(15)

<221> NEJISTÉ
<222> (17)...(17)

<400> 103
Xaa Xaa Ile Ala Pro Ala Thr Ser Gly Thr Leu Ser Glu Phe Xaa Ala
1 5 10 15
Xaa Lys Gly Val Thr Met Glu
20

<210> 104
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 104
Pro Asn Val Pro Asp Ala Phe Ala Val Leu Ala Asp Arg Val Gly
1 5 10 15

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (1)...(1)

<400> 105
Xaa Ile Arg Val Gly Val Asn Gly Phe
1 5

<210> 106
<211> 485
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 106
agcggctggg acatcaacac cgccgccttc gagtggtacg tcgactcggg tctcgcggtg 60
atcatgcccg tcggcgggca gtccagcttc tacagcgact ggtacagccc ggcctgcggt 120
aaggccggct gccagaccta caagtgggag acgttcctga cccaggagct gccggcctac 180
ctcgccgcca acaaggggt cgacccgaac cgcaacgcgg ccgtcggtct gtccatggcc 240
ggttcggcgg cgctgacgct ggcgatctac cacccgcagc agttccagta cgccgggtcg 300
ctgtcgggct acctgaaccc gtccgagggg tggtggccga tgctgatcaa catctcgatg 360
ggtgacgcgg gcggctacaa ggccaacgac atgtggggtc gcaccgagga cccgagcagc 420
gcctggaagc gcaacgaccc gatggtcaac atcggcaagc tggtcgccaa caacaccccc 480
ctctc 485

<210> 107
<211> 501
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (441)...(441)

<221> NEJISTÉ
<222> (450)...(450)

<400> 107
atgccggtgc gacgtgcgcg cagtgcgctt gcgtccgtga ccttcgtcgc ggccgcgtgc 60
gtgggcgctg agggcaccgc actggcggcg acgccggact ggagcgggcg ctacacggtg 120
gtgacgttcg cctccgacaa actcggcacg agtgtggccg cccgccagcc agaacccgac 180
ttcagcggtc agtacacctt cagcacgtcc tgtgtgggca cctgcgtggc caccgcgtcc 240
gacggcccgg cgccgtcgaa cccgacgatt ccgcagcccg cgcgctacac ctgggacggc 300
aggcagtggg tgttcaacta caactggcag tgggagtgct tccgcggcgc cgacgtcccg 360
cgcgagtacg ccgccgcgcg ttcgctggtg ttctacgccc cgaccgccga cgggtcgatg 420
ttcggcacct ggcgcaccga natcctggan ggcctctgca agggcaccgt gatcatgccg 480
gtcgcggcct atccggcgta g 501

<210> 108
<211> 180
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 108
atgaaccagc cgcggcccga ggccgaggcg aacctgcggg gctacttcac cgccaacccg 60
gcggagtact acgacctgcg gggcatcctc gccccgatcg gtgacgcgca gcgcaactgc 120
aacatcaccg tgctgccggt agagctgcag acggcctacg acacgttcat ggccggctga 180

<210> 109
<211> 166
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 109
Met Pro Val Arg Arg Ala Arg Ser Ala Leu Ala Ser Val Thr Phe Val
1 5 10 15
Ala Ala Ala Cys Val Gly Ala Glu Gly Thr Ala Leu Ala Ala Thr Pro
20 25 30
Asp Trp Ser Gly Arg Tyr Thr Val Val Thr Phe Ala Ser Asp Lys Leu
35 40 45
Gly Thr Ser Val Ala Ala Arg Gln Pro Glu Pro Asp Phe Ser Gly Gln
50 55 60
Tyr Thr Phe Ser Thr Ser Cys Val Gly Thr Cys Val Ala Thr Ala Ser
65 70 75 80
Asp Gly Pro Ala Pro Ser Asn Pro Thr Ile Pro Gln Pro Ala Arg Tyr
85 90 95
Thr Trp Asp Gly Arg Gln Trp Val Phe Asn Tyr Asn Trp Gln Trp Glu
100 105 110
Cys Phe Arg Gly Ala Asp Val Pro Arg Glu Tyr Ala Ala Ala Arg Ser
115 120 125
Leu Val Phe Tyr Ala Pro Thr Ala Asp Gly Ser Met Phe Gly Thr Trp
130 135 140
Arg Thr Asp Ile Leu Asp Gly Leu Cys Lys Gly Thr Val Ile Met Pro
145 150 155 160
Val Ala Ala Tyr Pro Ala
165

<210> 110
<211> 74
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 110
Pro Arg Asp Thr His Pro Gly Ala Asn Gln Ala Val Thr Ala Ala Met
1 5 10 15
Asn Gln Pro Arg Pro Glu Ala Glu Ala Asn Leu Arg Gly Tyr Phe Thr
20 25 30
Ala Asn Pro Ala Glu Tyr Tyr Asp Leu Arg Gly Ile Leu Ala Pro Ile
35 40 45
Gly Asp Ala Gln Arg Asn Cys Asn Ile Thr Val Leu Pro Val Glu Leu
50 55 60
Gln Thr Ala Tyr Asp Thr Phe Met Ala Gly
65 70

<210> 111
<211> 503
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (358)...(358)

<400> 111
atgcaggtgc ggcgtgttct gggcagtgtc ggtgcagcag tcgcggtttc ggccgcgtta 60

```
tggcagacgg gggtttcgat accgaccgcc tcagcggatc cgtgtccgga catcgaggtg     120
atcttcgcgc gcgggaccgg tgcggaaccc ggcctcgggt gggtcggtga tgcgttcgtc     180
aacgcgctgc ggcccaaggt cggtgagcag tcggtgggca cctacgcggt gaactacccg     240
gcaggattcg gacttcgaca aatcggcgcc catgggcgcg gccgacgcat cggggcgggt     300
gcagtggatg gccgacaact gcccggacac caagcttgtc ctgggcggca tgtcgcangg     360
cgccggcgtc atcgacctga tcaccgtcga tccgcgaccg ctgggccggt tcacccccac     420
cccgatgccg ccccgcgtcg ccgaccacgt ggccgccgtt gtggtcttcg gaaatccgtt     480
gcgcgacatc cgtggtggcg gtc                                             503
```

<210> 112
<211> 167
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (119)...(119)

<400> 112

```
Met Gln Val Arg Arg Val Leu Gly Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Val
 1               5                  10                  15
Ser Ala Ala Leu Trp Gln Thr Gly Val Ser Ile Pro Thr Ala Ser Ala
            20                  25                  30
Asp Pro Cys Pro Asp Ile Glu Val Ile Phe Ala Arg Gly Thr Gly Ala
        35                  40                  45
Glu Pro Gly Leu Gly Trp Val Gly Asp Ala Phe Val Asn Ala Leu Arg
    50                  55                  60
Pro Lys Val Gly Glu Gln Ser Val Gly Thr Tyr Ala Val Asn Tyr Pro
65                  70                  75                  80
Ala Gly Phe Asp Phe Asp Lys Ser Ala Pro Met Gly Ala Ala Asp Ala
                85                  90                  95
Ser Gly Arg Val Gln Trp Met Ala Asp Asn Cys Pro Asp Thr Lys Leu
            100                 105                 110
Val Leu Gly Gly Met Ser Xaa Gly Ala Gly Val Ile Asp Leu Ile Thr
        115                 120                 125
Val Asp Pro Arg Pro Leu Gly Arg Phe Thr Pro Thr Pro Met Pro Pro
    130                 135                 140
Arg Val Ala Asp His Val Ala Ala Val Val Val Phe Gly Asn Pro Leu
145                 150                 155                 160
Arg Asp Ile Arg Gly Gly Gly
                165
```

<210> 113
<211> 1569
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 113

```
atggccaaga caattgcgta tgacgaagag gcccgccgtg gcctcgagcg gggcctcaac      60
gccctcgcag acgccgtaaa ggtgacgttg ggcccgaagg gtcgcaacgt cgtgctggag     120
aagaagtggg gcgcccccac gatcaccaac gatggtgtgt ccatcgccaa ggagatcgag     180
ctggaggacc cgtacgagaa gatcggcgct gagctggtca aagaggtcgc caagaagacc     240
gacgacgtcg cgggcgacgg caccaccacc gccaccgtgc tcgctcaggc tctggttcgc     300
gaaggcctgc gcaacgtcgc agccggcgcc aacccgctcg gcctcaagcg tggcatcgag     360
aaggctgtcg aggctgtcac ccagtcgctg ctgaagtcgg ccaaggaggt cgagaccaag     420
gagcagattt ctgccaccgc ggcgatttcc gccggcgaca cccagatcgg cgagctcatc     480
gccgaggcca tggacaaggt cggcaacgag ggtgtcatca ccgtcgagga gtcgaacacc     540
```

08.11.00

```
ttcggcctgc agctcgagct caccgagggt atgcgcttcg acaagggcta catctcgggt      600
tacttcgtga ccgacgccga gcgccaggaa gccgtcctgg aggatcccta catcctgctg      660
gtcagctcca aggtgtcgac cgtcaaggat ctgctcccgc tgctggagaa ggtcatccag      720
gccggcaagc cgctgctgat catcgccgag gacgtcgagg gcgaggccct gtccacgctg      780
gtggtcaaca agatccgcgg caccttcaag tccgtcgccg tcaaggctcc gggcttcggt      840
gaccgccgca aggcgatgct gcaggacatg gccatcctca ccggtggtca ggtcgtcagc      900
gaaagagtcg ggctgtccct ggagaccgcc gacgtctcgc tgctgggcca ggcccgcaag      960
gtcgtcgtca ccaaggacga gaccaccatc gtcgagggct cgggcgattc cgatgccatc     1020
gccggccggg tggctcagat ccgcgccgag atcgagaaca gcgactccga ctacgaccgc     1080
gagaagctgc aggagcgcct ggccaagctg gccggcggtg ttgcggtgat caaggccgga     1140
gctgccaccg aggtggagct caaggagcgc aagcaccgca tcgaggacgc cgtccgcaac     1200
gcgaaggctg ccgtcgaaga gggcatcgtc gccggtggcg gcgtggctct gctgcagtcg     1260
gctcctgcgc tggacgacct cggcctgacg ggcgacgagg ccaccggtgc caacatcgtc     1320
cgcgtggcgc tgtcggctcc gctcaagcag atcgccttca acggcggcct ggagcccggc     1380
gtcgttgccg agaaggtgtc caacctgccc gcgggtcacg gcctcaacgc cgcgaccggt     1440
gagtacgagg acctgctcaa ggccggcgtc gccgacccgg tgaaggtcac ccgctcggcg     1500
ctgcagaacg cggcgtccat cgcggctctg ttcctcacca ccgaggccgt cgtcgccgac     1560
aagccggag                                                            1569
```

<210> 114
<211> 523
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 114

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

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

<210> 115
<211> 647
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 115

```
atggccaaga caattgcgta tgacgaagag gcccgccgtg gcctcgagcg gggcctcaac      60
gccctcgcag acgccgtaaa ggtgacgttg ggcccgaagg gtcgcaacgt cgtgctggag     120
aagaagtggg gcgcccccac gatcaccaac gatggtgtgt ccatcgccaa ggagatcgag     180
ctggaggacc cgtacgagaa gatcggcgct gagctggtca aagaggtcgc caagaagacc     240
gacgacgtcg cgggcgacgg caccaccacc gccaccgtgc tcgctcaggc tctggttcgc     300
gaaggcctgc gcaacgtcgc agccggcgcc aacccgctcg gcctcaagcg tggcatcgag     360
aaggctgtcg aggctgtcac ccagtcgctg ctgaagtcgg ccaaggaggt cgagaccaag     420
gagcagattt ctgccaccgc ggcgatttcc gccggcgaca cccagatcgg cgagctcatc     480
gccgaggcca tggacaaggt cggcaacgag ggtgtcatca ccgtcgagga gtcgaacacc     540
ttcggcctgc agctcgagct caccgagggt atgcgcttcg acaagggcta catctcgggt     600
tacttcgtga ccgacgccga gcgccaggaa gccgtcctgg aggatcc                    647
```

<210> 116
<211> 927
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 116
gatccctaca tcctgctggt cagctccaag gtgtcgaccg tcaaggatct gctcccgctg 60
ctggagaagg tcatccaggc cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc 120
gaggccctgt ccacgctggt ggtcaacaag atccgcggca ccttcaagtc cgtcgccgtc 180
aaggctccgg gcttcggtga ccgccgcaag gcgatgctgc aggacatggc catcctcacc 240
ggtggtcagg tcgtcagcga aagagtcggg ctgtccctgg agaccgccga cgtctcgctg 300
ctgggccagg cccgcaaggt cgtcgtcacc aaggacgaga ccaccatcgt cgagggctcg 360
ggcgattccg atgccatcgc cggccgggtg gctcagatcc gcgccgagat cgagaacagc 420
gactccgact acgaccgcga gaagctgcag gagcgcctgg ccaagctggc cggcggtgtt 480
gcggtgatca aggccggagc tgccaccgag gtggagctca aggagcgcaa gcaccgcatc 540
gaggacgccg tccgcaacgc gaaggctgcc gtcgaagagg gcatcgtcgc cggtggcggc 600
gtggctctgc tgcagtcggc tcctgcgctg gacgacctcg gcctgacggg cgacgaggcc 660
accggtgcca acatcgtccg cgtggcgctg tcggctccgc tcaagcagat cgccttcaac 720
ggcggcctgg agcccggcgt cgttgccgag aaggtgtcca acctgcccgc gggtcacggc 780
ctcaacgccg cgaccggtga gtacgaggac ctgctcaagg ccggcgtcgc cgacccggtg 840
aaggtcaccc gctcggcgct gcagaacgcg gcgtccatcg cggctctgtt cctcaccacc 900
gaggccgtcg tcgccgacaa gccggag 927

<210> 117
<211> 215
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 117
Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu
1 5 10 15
Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val Thr Leu Gly Pro
20 25 30
Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly Ala Pro Thr Ile
35 40 45
Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu Leu Glu Asp Pro
50 55 60
Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys Thr
65 70 75 80
Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Gln
85 90 95
Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala Gly Ala Asn Pro
100 105 110
Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Ala Val Thr Gln
115 120 125
Ser Leu Leu Lys Ser Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys Glu Gln Ile Ser
130 135 140
Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Thr Gln Ile Gly Glu Leu Ile
145 150 155 160
Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val Ile Thr Val Glu
165 170 175
Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr Glu Gly Met Arg
180 185 190
Phe Asp Lys Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg
195 200 205
Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp
210 215

<210> 118
<211> 309
<212> PRT

<213> Mycobacterium vaccae

<400> 118

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

<210> 119
<211> 162
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 119

```
ctcgtacagg cgacggagat ctccgacgac gccacgtcgg tacggttggt cgccaccctg      60
ttcggcgtcg tgttgttgac gttggtgctg tccgggctca acgccaccct catccagggc     120
gcaccagaag acagctggcg caggcggatt ccgtcgatct tc                        162
```

<210> 120
<211> 1366
<212> DNA

08.11.00

<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (955)...(955)

<221> NEJISTÉ
<222> (973)...(973)

<400> 120

```
gatgagcagc gtgctgaact cgacctggtt ggcctgggcc gtcgcggtcg cggtcgggtt      60
cccggtgctg ctggtcgtgc tgaccgaggt gcacaacgcg ttgcgtcggc gcggcagcgc     120
gctggcccgc ccggtgcaac tcctgcgtac ctacatcctg ccgctgggcg cgttgctgct     180
cctgctggta caggcgatgg agatctccga cgacgccacg tcggtacggt tggtcgccac     240
cctgttcggc gtcgtgttgt tgacgttggt gctgtccggg ctcaacgcca ccctcatcca     300
gggcgcacca gaagacagct ggcgcaggcg gattccgtcg atcttcctcg acgtcgcgcg     360
cttcgcgctg atcgcggtcg gtatcaccgt gatcatggcc tatgtctggg gcgcgaacgt     420
ggggggcctg ttcaccgcac tgggcgtcac ttccatcgtt cttggcctgg ctctgcagaa     480
ttcggtcggt cagatcatct cgggtctgct gctgctgttc gagcaaccgt tccggctcgg     540
cgactggatc accgtcccca ccgcggcggg ccggccgtcc gcccacggcc gcgtggtgga     600
agtcaactgg cgtgcaacac atatcgacac cggcggcaac ctgctggtaa tgcccaacgc     660
cgaactcgcc ggcgcgtcgt tcaccaatta cagccggccc gtgggagagc accggctgac     720
cgtcgtcacc accttcaacg ccgcggacac ccccgatgat gtctgcgaga tgctgtcgtc     780
ggtcgcggcg tcgctgcccg aactgcgcac cgacggacag atcgccacgc tctatctcgg     840
tgcggccgaa tacgagaagt cgatcccgtt gcacacaccc gcggtggacg actcggtcag     900
gagcacgtac ctgcgatggg tctggtacgc cgcgcgccgg caggaacttc gcctnaacgg     960
cgtcgccgac ganttcgaca cgccggaacg gatcgcctcg gccatgcggg ctgtggcgtc    1020
cacactgcgc ttggcagacg acgaacagca ggagatcgcc gacgtggtgc gtctggtccg    1080
ttacggcaac ggggaacgcc tccagcagcc gggtcaggta ccgaccggga tgaggttcat    1140
cgtagacggc agggtgagtc tgtccgtgat cgatcaggac ggcgacgtga tcccggcgcg    1200
ggtgctcgag cgtggcgact tcctggggca gaccacgctg acgcgggaac cggtactggc    1260
gaccgcgcac gcgctggagg aagtcaccgt gctggagatg gcccgtgacg agatcgagcg    1320
cctggtgcac cgaaagccga tcctgctgca cgtgatcggg gccgtg                   1366
```

<210> 121
<211> 455
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (318)...(318)

<221> NEJISTÉ
<222> (324)...(324)

<400> 121

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

Leu Phe Gly Val Val Leu Leu Thr Leu Val Leu Ser Gly Leu Asn Ala
85 90 95
Thr Leu Ile Gln Gly Ala Pro Glu Asp Ser Trp Arg Arg Arg Ile Pro
100 105 110
Ser Ile Phe Leu Asp Val Ala Arg Phe Ala Leu Ile Ala Val Gly Ile
115 120 125
Thr Val Ile Met Ala Tyr Val Trp Gly Ala Asn Val Gly Gly Leu Phe
130 135 140
Thr Ala Leu Gly Val Thr Ser Ile Val Leu Gly Leu Ala Leu Gln Asn
145 150 155 160
Ser Val Gly Gln Ile Ile Ser Gly Leu Leu Leu Leu Phe Glu Gln Pro
165 170 175
Phe Arg Leu Gly Asp Trp Ile Thr Val Pro Thr Ala Ala Gly Arg Pro
180 185 190
Ser Ala His Gly Arg Val Val Glu Val Asn Trp Arg Ala Thr His Ile
195 200 205
Asp Thr Gly Gly Asn Leu Leu Val Met Pro Asn Ala Glu Leu Ala Gly
210 215 220
Ala Ser Phe Thr Asn Tyr Ser Arg Pro Val Gly Glu His Arg Leu Thr
225 230 235 240
Val Val Thr Thr Phe Asn Ala Ala Asp Thr Pro Asp Asp Val Cys Glu
245 250 255
Met Leu Ser Ser Val Ala Ala Ser Leu Pro Glu Leu Arg Thr Asp Gly
260 265 270
Gln Ile Ala Thr Leu Tyr Leu Gly Ala Ala Glu Tyr Glu Lys Ser Ile
275 280 285
Pro Leu His Thr Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Arg Ser Thr Tyr Leu
290 295 300
Arg Trp Val Trp Tyr Ala Ala Arg Arg Gln Glu Leu Arg Xaa Asn Gly
305 310 315 320
Val Ala Asp Xaa Phe Asp Thr Pro Glu Arg Ile Ala Ser Ala Met Arg
325 330 335
Ala Val Ala Ser Thr Leu Arg Leu Ala Asp Asp Glu Gln Gln Glu Ile
340 345 350
Ala Asp Val Val Arg Leu Val Arg Tyr Gly Asn Gly Glu Arg Leu Gln
355 360 365
Gln Pro Gly Gln Val Pro Thr Gly Met Arg Phe Ile Val Asp Gly Arg
370 375 380
Val Ser Leu Ser Val Ile Asp Gln Asp Gly Asp Val Ile Pro Ala Arg
385 390 395 400
Val Leu Glu Arg Gly Asp Phe Leu Gly Gln Thr Thr Leu Thr Arg Glu
405 410 415
Pro Val Leu Ala Thr Ala His Ala Leu Glu Glu Val Thr Val Leu Glu
420 425 430
Met Ala Arg Asp Glu Ile Glu Arg Leu Val His Arg Lys Pro Ile Leu
435 440 445
Leu His Val Ile Gly Ala Val
450 455

<210> 122
<211> 898
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 122
atgacaattc tgccctggaa tgcgcgaacg tctgaacacc cgacgcgaaa aagacgcggg 60
cgctaccacc tcctgtcgcg gatgagcatc cagtccaagt tgctgctgat gctgcttctg 120

accagcattc tctcggctgc ggtggtcggt ttcatcggct atcagtccgg acggtcctcg 180
ctgcgcgcat cggtgttcga ccgcctcacc gacatccgcg agtcgcagtc gcgcgggttg 240
gagaatcagt tcgcggacct gaagaactcg atggtgattt actcgcgcgg cagcactgcc 300
acggaggcga tcggcgcgtt cagcgacggt ttccgtcagc tcggcgatgc gacgatcaat 360
accgggcagg cggcgtcatt gcgccgttac tacgaccgga cgttcgccaa caccaccctc 420
gacgacagcg gaaaccgcgt cgacgtccgc gcgctcatcc cgaaatccaa cccccagcgc 480
tatctgcagg cgctctatac cccgccgttt cagaactggg agaaggcgat cgcgttcgac 540
gacgcgcgcg acggcagcgc ctggtcggcc gccaatgcca gattcaacga gttcttccgc 600
gagatcgtgc accgcttcaa cttcgaggat ctgatgctgc tcgacctcga gggcaacgtg 660
gtgtactccg cctacaaggg gccggatctc gggacaaaca tcgtcaacgg cccctatcgc 720
aaccgggaac tgtcggaagc ctacgagaag gcggtcgcgt cgaactcgat cgactatgtc 780
ggtgtcaccg acttcgggtg gtacctgcct gccgaggaac cgaccgcctg gttcctgtcc 840
ccggtcgggt tgaaggaccg agtcgacggt gtgatggcgg tccagttccc cggaattc 898

<210> 123
<211> 1259
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 123
cgcaattgat gacggcgcgg ggacagtggc gtgacaccgg gatgggagac accggtgaga 60
ccatcctggt cggaccggac aatctgatgc gctcggactc ccggctgttc cgcgagaacc 120
gggagaagtt cctggccgac gtcgtcgagg ggggaacccc gccggaggtc gccgacgaat 180
cggttgaccg ccgcggcacc acgctggtgc agccggtgac cacccgctcc gtcgaggagg 240
cccaacgcgg caacaccggg acgacgatcg aggacgacta tctcggccac gaggcgttac 300
aggcgtactc accggtggac ctgccgggac tgcactgggt gatcgtggcc aagatcgaca 360
ccgacgaggc gttcgccccg gtggcgcagt tcaccaggac cctggtgctg tcgacggtga 420
tcatcatctt cggcgtgtcg ctggcggcca tgctgctggc gcggttgttc gtccgtccga 480
tccggcggtt gcaggccggc gcccagcaga tcagcggcgg tgactaccgc ctcgctctgc 540
cggtgttgtc tcgtgacgaa ttcggcgatc tgacaacagc tttcaacgac atgagtcgca 600
atctgtcgat caaggacgag ctgctcggcg aggagcgcgc cgagaaccaa cggctgatgc 660
tgtccctgat gcccgaaccg gtgatgcagc gctacctcga cggggaggag acgatcgccc 720
aggaccacaa gaacgtcacg gtgatcttcg ccgacatgat gggcctcgac gagttgtcgc 780
gcatgttgac ctccgaggaa ctgatggtgg tggtcaacga cctgacccgc cagttcgacg 840
ccgccgccga gagtctcggg gtcgaccacg tgcggacgct gcacgacggg tacctggcca 900
gctgcgggtt aggcgtgccg cggctggaca acgtccggcg cacggtcaat ttcgcgatcg 960
aaatggaccg catcatcgac cggcacgccg ccgagtccgg gcacgacctg cggctccgcg 1020
cgggcatcga caccgggtcg gcggccagcg ggctggtggg gcggtccacg ttggcgtacg 1080
acatgtgggg ttcggcggtc gatgtcgcct accaggtgca gcgcggctcc ccccagcccg 1140
gcatctacgt cacctcgcgg gtgcacgagg tcatgcagga aactctcgac ttcgtcgccg 1200
ccggggaggt cgtcggcgag cgcggcgtcg agacggtctg gcggttgcag ggccacccg 1259

<210> 124
<211> 299
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 124
Met Thr Ile Leu Pro Trp Asn Ala Arg Thr Ser Glu His Pro Thr Arg
1 5 10 15
Lys Arg Arg Gly Arg Tyr His Leu Leu Ser Arg Met Ser Ile Gln Ser
20 25 30
Lys Leu Leu Leu Met Leu Leu Leu Thr Ser Ile Leu Ser Ala Ala Val
35 40 45
Val Gly Phe Ile Gly Tyr Gln Ser Gly Arg Ser Ser Leu Arg Ala Ser
50 55 60

```
Val Phe Asp Arg Leu Thr Asp Ile Arg Glu Ser Gln Ser Arg Gly Leu
65                  70                  75                  80
Glu Asn Gln Phe Ala Asp Leu Lys Asn Ser Met Val Ile Tyr Ser Arg
                85                  90                  95
Gly Ser Thr Ala Thr Glu Ala Ile Gly Ala Phe Ser Asp Gly Phe Arg
            100                 105                 110
Gln Leu Gly Asp Ala Thr Ile Asn Thr Gly Gln Ala Ala Ser Leu Arg
        115                 120                 125
Arg Tyr Tyr Asp Arg Thr Phe Ala Asn Thr Thr Leu Asp Asp Ser Gly
    130                 135                 140
Asn Arg Val Asp Val Arg Ala Leu Ile Pro Lys Ser Asn Pro Gln Arg
145                 150                 155                 160
Tyr Leu Gln Ala Leu Tyr Thr Pro Pro Phe Gln Asn Trp Glu Lys Ala
                165                 170                 175
Ile Ala Phe Asp Asp Ala Arg Asp Gly Ser Ala Trp Ser Ala Ala Asn
            180                 185                 190
Ala Arg Phe Asn Glu Phe Phe Arg Glu Ile Val His Arg Phe Asn Phe
        195                 200                 205
Glu Asp Leu Met Leu Leu Asp Leu Glu Gly Asn Val Val Tyr Ser Ala
    210                 215                 220
Tyr Lys Gly Pro Asp Leu Gly Thr Asn Ile Val Asn Gly Pro Tyr Arg
225                 230                 235                 240
Asn Arg Glu Leu Ser Glu Ala Tyr Glu Lys Ala Val Ala Ser Asn Ser
                245                 250                 255
Ile Asp Tyr Val Gly Val Thr Asp Phe Gly Trp Tyr Leu Pro Ala Glu
            260                 265                 270
Glu Pro Thr Ala Trp Phe Leu Ser Pro Val Gly Leu Lys Asp Arg Val
        275                 280                 285
Asp Gly Val Met Ala Val Gln Phe Pro Gly Ile
    290                 295
```

<210> 125
<211> 419
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 125

```
Gln Leu Met Thr Ala Arg Gly Gln Trp Arg Asp Thr Gly Met Gly Asp
 1               5                  10                  15
Thr Gly Glu Thr Ile Leu Val Gly Pro Asp Asn Leu Met Arg Ser Asp
            20                  25                  30
Ser Arg Leu Phe Arg Glu Asn Arg Glu Lys Phe Leu Ala Asp Val Val
        35                  40                  45
Glu Gly Gly Thr Pro Pro Glu Val Ala Asp Glu Ser Val Asp Arg Arg
    50                  55                  60
Gly Thr Thr Leu Val Gln Pro Val Thr Thr Arg Ser Val Glu Glu Ala
65                  70                  75                  80
Gln Arg Gly Asn Thr Gly Thr Thr Ile Glu Asp Asp Tyr Leu Gly His
                85                  90                  95
Glu Ala Leu Gln Ala Tyr Ser Pro Val Asp Leu Pro Gly Leu His Trp
            100                 105                 110
Val Ile Val Ala Lys Ile Asp Thr Asp Glu Ala Phe Ala Pro Val Ala
        115                 120                 125
Gln Phe Thr Arg Thr Leu Val Leu Ser Thr Val Ile Ile Ile Phe Gly
    130                 135                 140
Val Ser Leu Ala Ala Met Leu Leu Ala Arg Leu Phe Val Arg Pro Ile
145                 150                 155                 160
```

```
Arg Arg Leu Gln Ala Gly Ala Gln Gln Ile Ser Gly Gly Asp Tyr Arg
                165                 170                 175
Leu Ala Leu Pro Val Leu Ser Arg Asp Glu Phe Gly Asp Leu Thr Thr
            180                 185                 190
Ala Phe Asn Asp Met Ser Arg Asn Leu Ser Ile Lys Asp Glu Leu Leu
        195                 200                 205
Gly Glu Glu Arg Ala Glu Asn Gln Arg Leu Met Leu Ser Leu Met Pro
    210                 215                 220
Glu Pro Val Met Gln Arg Tyr Leu Asp Gly Glu Glu Thr Ile Ala Gln
225                 230                 235                 240
Asp His Lys Asn Val Thr Val Ile Phe Ala Asp Met Met Gly Leu Asp
                245                 250                 255
Glu Leu Ser Arg Met Leu Thr Ser Glu Glu Leu Met Val Val Val Asn
            260                 265                 270
Asp Leu Thr Arg Gln Phe Asp Ala Ala Ala Glu Ser Leu Gly Val Asp
        275                 280                 285
His Val Arg Thr Leu His Asp Gly Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Leu Gly
    290                 295                 300
Val Pro Arg Leu Asp Asn Val Arg Arg Thr Val Asn Phe Ala Ile Glu
305                 310                 315                 320
Met Asp Arg Ile Ile Asp Arg His Ala Ala Glu Ser Gly His Asp Leu
                325                 330                 335
Arg Leu Arg Ala Gly Ile Asp Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Leu Val
            340                 345                 350
Gly Arg Ser Thr Leu Ala Tyr Asp Met Trp Gly Ser Ala Val Asp Val
        355                 360                 365
Ala Tyr Gln Val Gln Arg Gly Ser Pro Gln Pro Gly Ile Tyr Val Thr
    370                 375                 380
Ser Arg Val His Glu Val Met Gln Glu Thr Leu Asp Phe Val Ala Ala
385                 390                 395                 400
Gly Glu Val Val Gly Glu Arg Gly Val Glu Thr Val Trp Arg Leu Gln
                405                 410                 415
Gly His Pro
```

<210> 126
<211> 27
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 126
ccggatccga tgagcagcgt gctgaac 27

<210> 127
<211> 26
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 127
gcggatccca cggccccgat cacgtg 26

<210> 128
<211> 33
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 128
ccggatccaa tgacatttct gccctggaat gcg 33

<210> 129
<211> 32
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 129
ccggatccat tcggtggccc tgcaaccgcc ag 32

<210> 130
<211> 27
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 130
ccggatccgg agcaaccgtt ccggctc 27

<210> 131
<211> 27
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 131
ccggatcccg gctatcagtc cggacgg 27

<210> 132
<211> 844
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 132
gagcaaccgt tccggctcgg cgactggatc accgtcccca ccgcggcggg ccggccgtcc 60
gcccacggcc gcgtggtgga agtcaactgg cgtgcaacac atatcgacac cggcggcaac 120
ctgctggtaa tgcccaacgc cgaactcgcc ggcgcgtcgt tcaccaatta cagccggccc 180
gtgggagagc accggctgac cgtcgtcacc accttcaacg ccgcggacac ccccgatgat 240
gtctgcgaga tgctgtcgtc ggtcgcggcg tcgctgcccg aactgcgcac cgacggacag 300
atcgccacgc tctatctcgg tgcggccgaa tacgagaagt cgatcccgtt gcacacaccc 360
gcggtggacg actcggtcag gagcacgtac ctgcgatggg tctggtacgc cgcgcgccgg 420

caggaacttc gcctaacggc gtcgccgacg attcgacacg ccggaacgga tcgcctcggc 480
catgcgggct gtggcgtcca cactgcgctt ggcagacgac gaacagcagg agatcgccga 540
cgtggtgcgt ctggtccgtt acggcaacgg ggaacgcctc cagcagccgg gtcaggtacc 600
gaccgggatg aggttcatcg tagacggcag ggtgagtctg tccgtgatcg atcaggacgg 660
cgacgtgatc ccggcgcggg tgctcgagcg tggcgacttc ctggggcaga ccacgctgac 720
gcgggaaccg gtactggcga ccgcgcacgc gctggaggaa gtcaccgtgc tggagatggc 780
ccgtgacgag atcgagcgcc tggtgcaccg aaagccgatc ctgctgcacg tgatcggggc 840
cgtg 844

<210> 133
<211> 742
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 133
ggctatcagt ccggacggtc ctcgctgcgc gcatcggtgt tcgaccgcct caccgacatc 60
cgcgagtcgc agtcgcgcgg gttggagaat cagttcgcgg acctgaagaa ctcgatggtg 120
atttactcgc gcggcagcac tgccacggag gcgatcggcg cgttcagcga cggtttccgt 180
cagctcggcg atgcgacgat caataccggg caggcggcgt cattgcgccg ttactacgac 240
cggacgttcg ccaacaccac cctcgacgac agcggaaacc gcgtcgacgt ccgcgcgctc 300
atcccgaaat ccaaccccca gcgctatctg caggcgctct ataccccgcc gtttcagaac 360
tgggagaagg cgatcgcgtt cgacgacgcg cgcgacggca gcgcctggtc ggccgccaat 420
gccagattca acgagttctt ccgcgagatc gtgcaccgct tcaacttcga ggatctgatg 480
ctgctcgacc tcgagggcaa cgtggtgtac tccgcctaca aggggccgga tctcgggaca 540
aacatcgtca acggccccta tcgcaaccgg gaactgtcgg aagcctacga gaaggcggtc 600
gcgtcgaact cgatcgacta tgtcggtgtc accgacttcg ggtggtacct gcctgccgag 660
gaaccgaccg cctggttcct gtccccggtc gggttgaagg accgagtcga cggtgtgatg 720
gcggtccagt tccccggaat tc 742

<210> 134
<211> 282
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (145)...(145)

<221> NEJISTÉ
<222> (151)...(151)

<400> 134
Glu Gln Pro Phe Arg Leu Gly Asp Trp Ile Thr Val Pro Thr Ala Ala
1 5 10 15
Gly Arg Pro Ser Ala His Gly Arg Val Val Glu Val Asn Trp Arg Ala
20 25 30
Thr His Ile Asp Thr Gly Gly Asn Leu Leu Val Met Pro Asn Ala Glu
35 40 45
Leu Ala Gly Ala Ser Phe Thr Asn Tyr Ser Arg Pro Val Gly Glu His
50 55 60
Arg Leu Thr Val Val Thr Thr Phe Asn Ala Ala Asp Thr Pro Asp Asp
65 70 75 80
Val Cys Glu Met Leu Ser Ser Val Ala Ala Ser Leu Pro Glu Leu Arg
85 90 95
Thr Asp Gly Gln Ile Ala Thr Leu Tyr Leu Gly Ala Ala Glu Tyr Glu
100 105 110

```
Lys Ser Ile Pro Leu His Thr Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Arg Ser
        115                 120                 125
Thr Tyr Leu Arg Trp Val Trp Tyr Ala Ala Arg Arg Gln Glu Leu Arg
    130                 135                 140
Xaa Asn Gly Val Ala Asp Xaa Phe Asp Thr Pro Glu Arg Ile Ala Ser
145                 150                 155                 160
Ala Met Arg Ala Val Ala Ser Thr Leu Arg Leu Ala Asp Asp Glu Gln
                165                 170                 175
Gln Glu Ile Ala Asp Val Val Arg Leu Val Arg Tyr Gly Asn Gly Glu
            180                 185                 190
Arg Leu Gln Gln Pro Gly Gln Val Pro Thr Gly Met Arg Phe Ile Val
        195                 200                 205
Asp Gly Arg Val Ser Leu Ser Val Ile Asp Gln Asp Gly Asp Val Ile
    210                 215                 220
Pro Ala Arg Val Leu Glu Arg Gly Asp Phe Leu Gly Gln Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240
Thr Arg Glu Pro Val Leu Ala Thr Ala His Ala Leu Glu Glu Val Thr
                245                 250                 255
Val Leu Glu Met Ala Arg Asp Glu Ile Glu Arg Leu Val His Arg Lys
            260                 265                 270
Pro Ile Leu Leu His Val Ile Gly Ala Val
        275                 280
```

<210> 135
<211> 247
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 135

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

Trp Phe Leu Ser Pro Val Gly Leu Lys Asp Arg Val Asp Gly Val Met
225 230 235 240
Ala Val Gln Phe Pro Gly Ile
245

<210> 136
<211> 45
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (18)...(18)

<400> 136
atgagcgaaa tcgcccgncc ctggcgggtt ctggcatgtg gcatc 45

<210> 137
<211> 340
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (273)...(273)

<221> NEJISTÉ
<222> (286)...(286)

<400> 137
gccaccggcg gcgccgccgc ggtgcccgcc ggggtgagcg ccccggcggt cgcgccggcc 60
cccgcgatgc ccgcccgccc ggtgtccacg atcgcgccgg cgacctcggg cacgctcagc 120
gagtttttcg ccgccaaggg cgtcacgatg gagccgcagt ccagccgcga cttccgcgcc 180
ctcaacatcg tgctgccgaa gccgcggggc tgggagcaca tcccggaccc gaacgtgccg 240
gacgcgttcg cggtgctggc cgaccgggtc agnggtaaag gtcagnagtc gacaaacgcc 300
cacgtggtgg tcgacaaaca cgtaggcgag ttcgacggca 340

<210> 138
<211> 235
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (16)...(16)

<400> 138
ggtgaccacc agcgtngaac aggtcgttgc cgaagccgcg gaggccaccg acgcgattgt 60
caacggcttc aaggtcagcg ttccgggtcc gggtccggcc gcaccgccac ctgcacccgg 120
tgcccccggt gtcccgcccg cccccggcgc cccggcgctg ccgctggccg tcgcaccacc 180
cccggctccc gctgttcccg ccgtggcgcc cgcgccacag ctgctgggac tgcag 235

<210> 139
<211> 15
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 139
Met Ser Glu Ile Ala Arg Pro Trp Arg Val Leu Ala Cys Gly Ile
1 5 10 15

<210> 140
<211> 113
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (96)...(96)

<400> 140
Ala Thr Gly Gly Ala Ala Ala Val Pro Ala Gly Val Ser Ala Pro Ala
1 5 10 15
Val Ala Pro Ala Pro Ala Met Pro Ala Arg Pro Val Ser Thr Ile Ala
20 25 30
Pro Ala Thr Ser Gly Thr Leu Ser Glu Phe Phe Ala Ala Lys Gly Val
35 40 45
Thr Met Glu Pro Gln Ser Ser Arg Asp Phe Arg Ala Leu Asn Ile Val
50 55 60
Leu Pro Lys Pro Arg Gly Trp Glu His Ile Pro Asp Pro Asn Val Pro
65 70 75 80
Asp Ala Phe Ala Val Leu Ala Asp Arg Val Gly Gly Lys Gly Gln Xaa
85 90 95
Ser Thr Asn Ala His Val Val Val Asp Lys His Val Gly Glu Phe Asp
100 105 110
Gly

<210> 141
<211> 73
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 141
Val Thr Thr Ser Val Glu Gln Val Val Ala Ala Ala Asp Ala Thr Glu
1 5 10 15
Ala Ile Val Asn Gly Phe Lys Val Ser Val Pro Gly Pro Gly Pro Ala
20 25 30
Ala Pro Pro Pro Ala Pro Gly Ala Pro Gly Val Pro Pro Ala Pro Gly
35 40 45
Ala Pro Ala Leu Pro Leu Ala Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Val
50 55 60
Pro Ala Val Ala Pro Ala Pro Gln Leu
65 70

<210> 142
<211> 273
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 142
gcgacctacg tgcaggggg tctcggccgc atcgaggccc gggtggccga cagcggatac 60
agcaacgccg cggccaaggg ctacttcccg ctgagcttca ccgtcgccgg catcgaccag 120
aacggtccga tcgtgaccgc caacgtcacc gcggcggccc cgacgggcgc cgtggccacc 180

```
cagccgctga cgttcatcgc cgggccgagc ccgaccggat ggcagctgtc caagcagtcc     240
gcactggccc tgatgtccgc ggtcatcgcc gca                                  273

      <210> 143
      <211> 91
      <212> PRT
      <213> Mycobacterium vaccae

      <400> 143
Ala Thr Tyr Val Gln Gly Gly Leu Gly Arg Ile Glu Ala Arg Val Ala
 1               5                  10                  15
Asp Ser Gly Tyr Ser Asn Ala Ala Ala Lys Gly Tyr Phe Pro Leu Ser
            20                  25                  30
Phe Thr Val Ala Gly Ile Asp Gln Asn Gly Pro Ile Val Thr Ala Asn
        35                  40                  45
Val Thr Ala Ala Ala Pro Thr Gly Ala Val Ala Thr Gln Pro Leu Thr
    50                  55                  60
Phe Ile Ala Gly Pro Ser Pro Thr Gly Trp Gln Leu Ser Lys Gln Ser
65                  70                  75                  80
Ala Leu Ala Leu Met Ser Ala Val Ile Ala Ala
                85                  90

      <210> 144
      <211> 554
      <212> DNA
      <213> Mycobacterium vaccae

      <400> 144
gatgtcacgc ccggagaatg taacgttcga ccggagaacg ccgtcggcac aacgagttac      60
gtttgagcac ttcagatctc ggttaccttg gatttcaggc gggggaagca gtaaccgatc     120
caagattcga aggacccaaa caacatgaaa ttcactggaa tgaccgtgcg cgcaagccgc     180
gcgccctggc cggcgtcggg gcggcatgtc tgttcggcgg cgtggccgcg gcaaccgtgg     240
cggcacagat ggcgggcgcc cagccggccg agtgcaacgc cagctcactc accggcaccg     300
tcagctcggt gaccggtcag gcgcgtcagt acctagacac ccacccgggc gccaaccagg     360
ccgtcaccgc ggcgatgaac cagccgcggc ccgaggccga ggcgaacctg cggggctact     420
tcaccgccaa cccggcggag tactacgacc tgcggggcat cctcgccccg atcggtgacg     480
cgcagcgcaa ctgcaacatc accgtgctgc cggtagagct gcagacggcc tacgacacgt     540
tcatggccgg ctga                                                       554

      <210> 145
      <211> 136
      <212> PRT
      <213> Mycobacterium vaccae

      <400> 145
Met Lys Phe Thr Gly Met Thr Val Arg Ala Ser Arg Arg Ala Leu Ala
 1               5                  10                  15
Gly Val Gly Ala Ala Cys Leu Phe Gly Gly Val Ala Ala Ala Thr Val
            20                  25                  30
Ala Ala Gln Met Ala Gly Ala Gln Pro Ala Glu Cys Asn Ala Ser Ser
        35                  40                  45
Leu Thr Gly Thr Val Ser Ser Val Thr Gly Gln Ala Arg Gln Tyr Leu
    50                  55                  60
Asp Thr His Pro Gly Ala Asn Gln Ala Val Thr Ala Ala Met Asn Gln
65                  70                  75                  80
Pro Arg Pro Glu Ala Glu Ala Asn Leu Arg Gly Tyr Phe Thr Ala Asn
                85                  90                  95
```

```
Pro Ala Glu Tyr Tyr Asp Leu Arg Gly Ile Leu Ala Pro Ile Gly Asp
            100                 105                 110
Ala Gln Arg Asn Cys Asn Ile Thr Val Leu Pro Val Glu Leu Gln Thr
        115                 120                 125
Ala Tyr Asp Thr Phe Met Ala Gly
    130                 135
```

<210> 146
<211> 808
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (15)...(15)

<400> 146

```
ccaagtgtga cgcgngtgtg acggtagacg ttccgaccaa tccaacgacg ccgcagctgg      60
gaatcacccg tgtgccaatt cagtgcgggc aacggtgtcc gtccacgaag ggattcagga     120
aatgatgaca actcgccgga agtcagccgc agtggcggga atcgctgcgg tggccatcct     180
cggtgcggcc gcatgttcga gtgaggacgg tgggagcacg gcctcgtcgg ccagcagcac     240
ggcctcctcc gcgatggagt ccgcgaccga cgagatgacc acgtcgtcgg cggccccttc     300
ggccgaccct gcggccaacc tgatcggctc cggctgcgcg gcctacgccg agcaggtccc     360
cgaaggtccc gggtcggtgg ccgggatggc agccgatccg gtgacggtgg cggcgtcgaa     420
caacccgatg ctgcagacgc tgtcccaggc gctgtccggc cagctcaatc cgcaggtcaa     480
tctcgtcgac accctcgacg gcggtgagtt caccgtgttc gcgccgaccg acgacgcgtt     540
cgccaagatc gatccggcca cgctggagac cctcaagacg gactccgaca tgctgaccaa     600
catcctgacc taccacgtcg tgcccggcca ggccgcgccc gatcaggtgg tcggcgagca     660
tgtgacggtg gaggggcgc cggtcacggt gtccgggatg gccgaccagc tcaaggtcaa     720
cgacgcgtcg gtggtgtgcg gtggggtgca gaccgccaac gcgacggtgt atctgatcga     780
caccgtgctg atgccgccgg cagcgtag                                       808
```

<210> 147
<211> 228
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 147

```
Met Met Thr Thr Arg Arg Lys Ser Ala Ala Val Ala Gly Ile Ala Ala
 1               5                  10                  15
Val Ala Ile Leu Gly Ala Ala Ala Cys Ser Ser Glu Asp Gly Gly Ser
            20                  25                  30
Thr Ala Ser Ser Ala Ser Ser Thr Ala Ser Ser Ala Met Glu Ser Ala
        35                  40                  45
Thr Asp Glu Met Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Ser Ala Asp Pro Ala
    50                  55                  60
Ala Asn Leu Ile Gly Ser Gly Cys Ala Ala Tyr Ala Glu Gln Val Pro
65                  70                  75                  80
Glu Gly Pro Gly Ser Val Ala Gly Met Ala Ala Asp Pro Val Thr Val
                85                  90                  95
Ala Ala Ser Asn Asn Pro Met Leu Gln Thr Leu Ser Gln Ala Leu Ser
            100                 105                 110
Gly Gln Leu Asn Pro Gln Val Asn Leu Val Asp Thr Leu Asp Gly Gly
        115                 120                 125
Glu Phe Thr Val Phe Ala Pro Thr Asp Asp Ala Phe Ala Lys Ile Asp
    130                 135                 140
```

```
Pro Ala Thr Leu Glu Thr Leu Lys Thr Asp Ser Asp Met Leu Thr Asn
145                 150                 155                 160
Ile Leu Thr Tyr His Val Val Pro Gly Gln Ala Ala Pro Asp Gln Val
                165                 170                 175
Val Gly Glu His Val Thr Val Glu Gly Ala Pro Val Thr Val Ser Gly
            180                 185                 190
Met Ala Asp Gln Leu Lys Val Asn Asp Ala Ser Val Val Cys Gly Gly
        195                 200                 205
Val Gln Thr Ala Asn Ala Thr Val Tyr Leu Ile Asp Thr Val Leu Met
    210                 215                 220
Pro Pro Ala Ala
225
```

<210> 148
<211> 22
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<221> NEJISTÉ
<222> (12)...(12)

<221> NEJISTÉ
<222> (17)...(17)

<400> 148
gcsccsgtsg gnccggntgy gc 22

<210> 149
<211> 21
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<221> NEJISTÉ
<222> (10)...(10)

<221> NEJISTÉ
<222> (13)...(13)

<221> NEJISTÉ
<222> (16)...(16)

<221> NEJISTÉ
<222> (20)...(20)

<400> 149
rtasgcsgcn gtngcnacng g 21

<210> 150
<211> 102
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 150
gcccccgtcg gccccggctg tgcggcctac gtgcaacagg tgccggacgg gccgggatcg 60
gtgcagggca tggcgagctc gcccgtagcg accgccgcgt at 102

<210> 151
<211> 683
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 151
gcccgccaac taaaaccgcc gatcatccac tgcaggaagg aatctcacga tcatgaacat 60
cagcatgaaa actcttgccg gagcgggttt cgcgatgacc gccgccgtcg gtctgtcgct 120
gggtaccgca ggcagcgccg cagccgcgcc ggtcggaccg gggtgtgcgg cctacgtgca 180
acaggtgccg gacgggccgg gatcggtgca gggcatggcg agctcgccgg tggccaccgc 240
ggcggccgac aacccgctgc tcaccacgct ctcgcaggcg atctcgggtc agctcaaccc 300
gaacgtcaat ctcgtcgaca cgttcaacgg cggccagttc accgtgttcg cgccgaccaa 360
tgacgccttc gccaagatcg atccggccac gctggagacc ctcaagaccg attccgacct 420
gctgaccaag atcctcacct accacgtcgt gcccggccag gccgcgcccg atcaggtggt 480
cggcgagcat gtgacggtgg agggggcgcc ggtcacggtg tccgggatgg ccgaccagct 540
caaggtcaac gacgcgtcgg tggtgtgcgg tggggtgcag accgccaacg cgacggtgta 600
tctgatcgac accgtgctga tgccgccggc agcgtagccg ggcggcacca cagaagaggg 660
tcccccgcac ccggcctccc ccg 683

<210> 152
<211> 231
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 152
Asp Thr Val Leu Met Pro Pro Ala Asn Asn Arg Arg Ser Ser Thr Ala
1 5 10 15
Gly Arg Asn Leu Thr Ile Met Asn Ile Ser Met Lys Thr Leu Ala Gly
20 25 30
Ala Gly Phe Ala Met Thr Ala Ala Val Gly Leu Ser Leu Gly Thr Ala
35 40 45
Gly Ser Ala Ala Ala Ala Pro Val Gly Pro Gly Cys Ala Ala Tyr Val
50 55 60
Gln Gln Val Pro Asp Gly Pro Gly Ser Val Gln Gly Met Ala Ser Ser
65 70 75 80
Pro Val Ala Thr Ala Ala Ala Asp Asn Pro Leu Leu Thr Thr Leu Ser
85 90 95
Gln Ala Ile Ser Gly Gln Leu Asn Pro Asn Val Asn Leu Val Asp Thr
100 105 110
Phe Asn Gly Gly Gln Phe Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Asp Ala Phe
115 120 125
Ala Lys Ile Asp Pro Ala Thr Leu Glu Thr Leu Lys Thr Asp Ser Asp
130 135 140
Leu Leu Thr Lys Ile Leu Thr Tyr His Val Val Pro Gly Gln Ala Ala
145 150 155 160
Pro Asp Gln Val Val Gly Glu His Val Thr Val Glu Gly Ala Pro Val
165 170 175
Thr Val Ser Gly Met Ala Asp Gln Leu Lys Val Asn Asp Ala Ser Val
180 185 190

```
Val Cys Gly Gly Val Gln Thr Ala Asn Ala Thr Val Tyr Leu Ile Asp
        195                 200                 205
Thr Val Leu Met Pro Pro Ala Ala Pro Gly Gly Thr Thr Glu Glu Gly
    210                 215                 220
Pro Pro His Pro Ala Ser Pro
225                 230
```

<210> 153
<211> 1125
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (358)...(358)

<400> 153

```
atgcaggtgc ggcgtgttct gggcagtgtc ggtgcagcag tcgcggtttc ggccgcgtta      60
tggcagacgg gggtttcgat accgaccgcc tcagcggatc cgtgtccgga catcgaggtg     120
atcttcgcgc gcgggaccgg tgcggaaccc ggcctcgggt gggtcggtga tgcgttcgtc     180
aacgcgctgc ggcccaaggt cggtgagcag tcggtgggca cctacgcggt gaactacccg     240
gcaggattcg gacttcgaca aatcggcgcc catgggcgcg gccgacgcat cggggcgggt     300
gcagtggatg gccgacaact gcccggacac caagcttgtc ctgggcggca tgtcgcangg     360
cgccggcgtc atcgacctga tcaccgtcga tccgcgaccg ctgggccggt tcacccccac     420
cccgatgccg ccccgcgtcg ccgaccacgt ggccgccgtt gtggtcttcg gaaatccgtt     480
gcgcgacatc cgtggtggcg gtccgctgcc gcagatgagc ggcacctacg ggccgaagtc     540
gatcgatctg tgtgcgctcg acgatccgtt ctgctcgccc ggcttcaacc tgccggccca     600
cttcgcctac gccgacaacg gcatggtgga ggaagccgcg aacttcgccc gcctggaacc     660
gggccagagc gtcgagctgc ccgaggcgcc ctacctgcac ctgttcgtcc cgcggggcga     720
ggtaacgctg gaggacgccg gaccgctgcg cgaaggcgac gcagtgcgtt tcaccgcatc     780
gggcggccag cgggtgaccg ccaccgcgcc cgcggagatc ctcgtctggg agatgcatgc     840
gggactcggt gcggcataag cgaataggag tcctgctggc cggcgcagca ctgctcgccg     900
gatgcacatc cgaacctgga cccgggccgt cggcggcacc ggccccgacg agcacaaccg     960
agagcgcacc cggtcccgga ctcgtcccgg tgaccgtcgc ggtcgacgaa cctctggccg    1020
acgcgccgtt cgaccagccc cgggaggccc tggtgccgca gggttggacg ctgtcggtgt    1080
gggcgcggac cgcccggccg cggctggccg cgtgggcccc ggacg                    1125
```

<210> 154
<211> 748
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (119)...(119)

<400> 154

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

```
Ala Gly Phe Asp Phe Asp Lys Ser Ala Pro Met Gly Ala Ala Asp Ala
                85                  90                  95
Ser Gly Arg Val Gln Trp Met Ala Asp Asn Cys Pro Asp Thr Lys Leu
            100                 105                 110
Val Leu Gly Gly Met Ser Xaa Gly Ala Gly Val Ile Asp Leu Ile Thr
        115                 120                 125
Val Asp Pro Arg Pro Leu Gly Arg Phe Thr Pro Thr Pro Met Pro Pro
    130                 135                 140
Arg Val Ala Asp His Val Ala Ala Val Val Val Phe Gly Asn Pro Leu
145                 150                 155                 160
Arg Asp Ile Arg Gly Gly Gly Pro Arg Leu Glu Pro Arg Gly Leu Asn
                165                 170                 175
Met Glu Thr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr His Arg Thr Tyr Arg Gly
            180                 185                 190
Leu Tyr Pro Arg Leu Tyr Ser Ser Glu Arg Ile Leu Glu Ala Ser Pro
        195                 200                 205
Leu Glu Cys Tyr Ser Ala Leu Ala Leu Glu Ala Ser Pro Ala Ser Pro
    210                 215                 220
Pro Arg Pro His Glu Cys Tyr Ser Ser Glu Arg Pro Arg Gly Leu Tyr
225                 230                 235                 240
Pro His Glu Ala Ser Asn Leu Glu Pro Arg Ala Leu Ala His Ile Ser
                245                 250                 255
Pro His Glu Ala Leu Ala Thr Tyr Arg Ala Leu Ala Ala Ser Pro Ala
            260                 265                 270
Ser Asn Gly Leu Tyr Met Glu Thr Val Ala Leu Gly Leu Gly Leu Ala
        275                 280                 285
Leu Ala Ala Leu Ala Ala Ser Asn Pro His Glu Ala Leu Ala Ala Arg
    290                 295                 300
Gly Leu Glu Gly Leu Pro Arg Gly Leu Tyr Gly Leu Asn Ser Glu Arg
305                 310                 315                 320
Val Ala Leu Gly Leu Leu Glu Pro Arg Gly Leu Ala Leu Ala Pro Arg
                325                 330                 335
Thr Tyr Arg Leu Glu His Ile Ser Leu Glu Pro His Glu Val Ala Leu
            340                 345                 350
Pro Arg Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Gly Leu Val Ala Leu Thr His Arg
        355                 360                 365
Leu Glu Gly Leu Ala Ser Pro Ala Leu Ala Gly Leu Tyr Pro Arg Leu
    370                 375                 380
Glu Ala Arg Gly Gly Leu Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Ala Leu Ala Val
385                 390                 395                 400
Ala Leu Ala Arg Gly Pro His Glu Thr His Arg Ala Leu Ala Ser Glu
                405                 410                 415
Arg Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Asn Ala Arg Gly Val Ala Leu
            420                 425                 430
Thr His Arg Ala Leu Ala Thr His Arg Ala Leu Ala Pro Arg Ala Leu
        435                 440                 445
Ala Gly Leu Ile Leu Glu Leu Glu Val Ala Leu Thr Arg Pro Gly Leu
    450                 455                 460
Met Glu Thr His Ile Ser Ala Leu Ala Gly Leu Tyr Leu Glu Gly Leu
465                 470                 475                 480
Tyr Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Ser Asn Ala Arg Gly
                485                 490                 495
Ser Glu Arg Pro Arg Ala Leu Ala Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Ala Arg
            500                 505                 510
Gly Ser Glu Arg Thr His Arg Ala Leu Ala Ala Arg Gly Ala Arg Gly
        515                 520                 525
```

```
Met Glu Thr His Ile Ser Ile Leu Glu Ala Arg Gly Thr His Arg Thr
     530                 535                 540
 Arg Pro Thr His Arg Ala Arg Gly Ala Leu Ala Val Ala Leu Gly Leu
 545                 550                 555                 560
 Tyr Gly Leu Tyr Thr His Arg Gly Leu Tyr Pro Arg Ala Ser Pro Gly
                 565                 570                 575
 Leu His Ile Ser Ala Ser Asn Ala Arg Gly Gly Leu Ala Arg Gly Thr
             580                 585                 590
 His Arg Ala Arg Gly Ser Glu Arg Ala Arg Gly Thr His Arg Ala Arg
         595                 600                 605
 Gly Pro Arg Gly Leu Tyr Ala Ser Pro Ala Arg Gly Ala Arg Gly Gly
     610                 615                 620
 Leu Tyr Ala Arg Gly Ala Arg Gly Thr His Arg Ser Glu Arg Gly Leu
 625                 630                 635                 640
 Tyr Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ala Leu Ala Val Ala Leu Ala Arg Gly
                 645                 650                 655
 Pro Arg Ala Leu Ala Pro Arg Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Pro Arg Gly
             660                 665                 670
 Leu Tyr Ala Leu Ala Ala Leu Ala Gly Leu Tyr Leu Glu Ala Ser Pro
         675                 680                 685
 Ala Leu Ala Val Ala Leu Gly Leu Tyr Val Ala Leu Gly Leu Tyr Ala
     690                 695                 700
 Leu Ala Ala Ser Pro Ala Arg Gly Pro Arg Ala Leu Ala Ala Leu Ala
 705                 710                 715                 720
 Ala Leu Ala Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Val Ala Leu Gly Leu Tyr Pro
                 725                 730                 735
 Arg Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Pro Arg Gly Leu Tyr
             740                 745
```

<210> 155
<211> 666
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 155

```
atgaaggcaa atcattcggg atgctacaaa tccgccggcc cgatatggtc gcatccatcg      60
ccgctttgtt cgcccgcact ggcaccatct catgcaggtc tggacaatga gctgagcctg     120
ggcatccacg gccagggccc ggaacgactg accattcagc agtgggacac cttcctcaac     180
ggcgtcttcc cgttggaccg caaccggttg acccgggagt ggttccactc gggcaaggcg     240
acctacgtcg tggccggtga aggtgccgac gagttcgagg gcacgctgga gctgggctac     300
caggtgggct ttccgtggtc gctgggcgtg ggcatcaact tcagctacac caccccgaac     360
atcacgtacg acggttacgg cctcaacttc gccgacccgc tgctgggctt cggtgattcc     420
atcgtgaccc cgccgctgtt cccgggtgtc tcgatcacgg cggacctggg caacggcccc     480
ggcatccagg aggtcgcgac cttctccgtg gacgtggccg gccccggtgg ttccgtggtg     540
gtgtccaacg cgcacggcac ggtcaccggt gctgccggtg gtgtgctgct gcgtccgttc     600
gcccgcctga tctcgtcgac cggcgacagc gtcaccacct acggcgcacc ctggaacatg     660
aactga                                                                666
```

<210> 156
<211> 221
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 156

```
Met Lys Ala Asn His Ser Gly Cys Tyr Lys Ser Ala Gly Pro Ile Trp
 1               5                  10                  15
```

```
Ser His Pro Ser Pro Leu Cys Ser Pro Ala Leu Ala Pro Ser His Ala
            20                  25                  30
Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Gly Val His Gly Gln Gly Pro Glu
        35                  40                  45
His Leu Thr Ile Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro
    50                  55                  60
Leu Asp Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Lys Ala
65                  70                  75                  80
Thr Tyr Val Val Ala Gly Glu Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu
                85                  90                  95
Glu Leu Gly Tyr His Val Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile
            100                 105                 110
Asn Phe Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Thr Tyr Asp Gly Tyr Gly Leu
        115                 120                 125
Asn Phe Ala Asp Pro Leu Leu Gly Phe Gly Asp Ser Ile Val Thr Pro
    130                 135                 140
Pro Leu Phe Pro Gly Val Ser Ile Thr Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro
145                 150                 155                 160
Gly Ile Gln Glu Val Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ala Gly Pro Gly
                165                 170                 175
Gly Ser Val Val Val Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala
            180                 185                 190
Gly Gly Val Leu Leu Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ser Ser Thr Gly
        195                 200                 205
Asp Ser Val Thr Thr Tyr Gly Ala Pro Trp Asn Met Asn
    210                 215                 220
```

<210> 157
<211> 480
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 157

```
aacggctggg acatcaacac ccctgcgttc gagtggttct acgagtccgg cttgtcgacg      60
atcatgccgg tcggcggaca gtccagcttc tacagcgact ggtaccagcc gtctcggggc     120
aacgggcaga actacaccta caagtgggag acgttcctga cccaggagct gccgacgtgg     180
ctggaggcca accgcggagt gtcgcgcacc ggcaacgcgt tcgtcggcct gtcgatggcg     240
ggcagcgcgg cgctgaccta cgcgatccat cacccgcagc agttcatcta cgcctcgtcg     300
ctgtcaggct tcctgaaccc gtccgagggc tggtggccga tgctgatcgg gctggcgatg     360
aacgacgcag gcggcttcaa cgccgagagc atgtggggcc cgtcctcgga cccggcgtgg     420
aagcgcaacg acccgatggt caacatcaac cagctggtgg ccaacaacac ccggatctgg     480
```

<210> 158
<211> 161
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 158

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

```
Arg Gly Val Ser Arg Thr Gly Asn Ala Phe Val Gly Leu Ser Met Ala
65                  70                  75                  80
Gly Ser Ala Ala Leu Thr Tyr Ala Ile His His Pro Gln Gln Phe Ile
                85                  90                  95
Tyr Ala Ser Ser Leu Ser Gly Phe Leu Asn Pro Ser Glu Gly Trp Trp
            100                 105                 110
Pro Met Leu Ile Gly Leu Ala Met Asn Asp Ala Gly Gly Phe Asn Ala
        115                 120                 125
Glu Ser Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Lys Arg Asn Asp
    130                 135                 140
Pro Met Val Asn Ile Asn Gln Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Ile Trp
145                 150                 155                 160
Ile
```

<210> 159
<211> 1626
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 159

```
atggccaaga caattgcgta tgacgaagag gcccgccgtg gcctcgagcg gggcctcaac      60
gccctcgcag acgccgtaaa ggtgacgttg ggcccgaagg gtcgcaacgt cgtgctggag     120
aagaagtggg gcgcccccac gatcaccaac gatggtgtgt ccatcgccaa ggagatcgag     180
ctggaggacc cgtacgagaa gatcggcgct gagctggtca aagaggtcgc caagaagacc     240
gacgacgtcg cgggcgacgg caccaccacc gccaccgtgc tcgctcaggc tctggttcgc     300
gaaggcctgc gcaacgtcgc agccggcgcc aacccgctcg gcctcaagcg tggcatcgag     360
aaggctgtcg aggctgtcac ccagtcgctg ctgaagtcgg ccaaggaggt cgagaccaag     420
gagcagattt ctgccaccgc ggcgatttcc gccggcgaca cccagatcgg cgagctcatc     480
gccgaggcca tggacaaggt cggcaacgag ggtgtcatca ccgtcgagga gtcgaacacc     540
ttcggcctgc agctcgagct caccgagggt atgcgcttcg acaagggcta catctcgggt     600
tacttcgtga ccgacgccga gcgccaggaa gccgtcctgg aggatcccta catcctgctg     660
gtcagctcca aggtgtcgac cgtcaaggat ctgctcccgc tgctggagaa ggtcatccag     720
gccggcaagc cgctgctgat catcgccgag gacgtcgagg gcgaggccct gtccacgctg     780
gtggtcaaca agatccgcgg caccttcaag tccgtcgccg tcaaggctcc gggcttcggt     840
gaccgccgca aggcgatgct gcaggacatg gccatcctca ccggtggtca ggtcgtcagc     900
gaaagagtcg ggctgtccct ggagaccgcc gacgtctcgc tgctgggcca ggcccgcaag     960
gtcgtcgtca ccaaggacga gaccaccatc gtcgagggct cgggcgattc cgatgccatc    1020
gccggccggg tggctcagat ccgcgccgag atcgagaaca gcgactccga ctacgaccgc    1080
gagaagctgc aggagcgcct ggccaagctg gccggcggtg ttgcggtgat caaggccgga    1140
gctgccaccg aggtggagct caaggagcgc aagcaccgca tcgaggacgc cgtccgcaac    1200
gcgaaggctg ccgtcgaaga gggcatcgtc gccggtggcg gcgtggctct gctgcagtcg    1260
gctcctgcgc tggacgacct cggcctgacg ggcgacgagg ccaccggtgc caacatcgtc    1320
cgcgtggcgc tgtcggctcc gctcaagcag atcgccttca acggcggcct ggagcccggc    1380
gtcgttgccg agaaggtgtc caacctgccc gcgggtcacg gcctcaacgc cgcgaccggt    1440
gagtacgagg acctgctcaa ggccggcgtc gccgacccgg tgaaggtcac ccgctcggcg    1500
ctgcagaacg cggcgtccat cgcggctctg ttcctcacca ccgaggccgt cgtcgccgac    1560
aagccggaga aggcgtccgc acccgcgggc gacccgaccg gtggcatggg cggtatggac    1620
ttctaa                                                               1626
```

<210> 160
<211> 541
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 160

```
Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu
 1               5                  10                  15
Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val Thr Leu Gly Pro
            20                  25                  30
Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly Ala Pro Thr Ile
        35                  40                  45
Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu Leu Glu Asp Pro
    50                  55                  60
Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys Thr
65                  70                  75                  80
Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Gln
                85                  90                  95
Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala Gly Ala Asn Pro
            100                 105                 110
Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Ala Val Thr Gln
        115                 120                 125
Ser Leu Leu Lys Ser Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys Glu Gln Ile Ser
    130                 135                 140
Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Thr Gln Ile Gly Glu Leu Ile
145                 150                 155                 160
Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val Ile Thr Val Glu
                165                 170                 175
Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr Glu Gly Met Arg
            180                 185                 190
Phe Asp Lys Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg
        195                 200                 205
Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Tyr Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys
    210                 215                 220
Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ile Gln
225                 230                 235                 240
Ala Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu Ala
                245                 250                 255
Leu Ser Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr Phe Lys Ser Val
            260                 265                 270
Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Met Leu Gln
        275                 280                 285
Asp Met Ala Ile Leu Thr Gly Gly Gln Val Val Ser Glu Arg Val Gly
    290                 295                 300
Leu Ser Leu Glu Thr Ala Asp Val Ser Leu Leu Gly Gln Ala Arg Lys
305                 310                 315                 320
Val Val Val Thr Lys Asp Glu Thr Thr Ile Val Glu Gly Ser Gly Asp
                325                 330                 335
Ser Asp Ala Ile Ala Gly Arg Val Ala Gln Ile Arg Ala Glu Ile Glu
            340                 345                 350
Asn Ser Asp Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln Glu Arg Leu Ala
        355                 360                 365
Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Ala Gly Ala Ala Thr Glu
    370                 375                 380
Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Asn
385                 390                 395                 400
Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly Gly Gly Val Ala
                405                 410                 415
Leu Leu Gln Ser Ala Pro Ala Leu Asp Asp Leu Gly Leu Thr Gly Asp
            420                 425                 430
Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Arg Val Ala Leu Ser Ala Pro Leu
        435                 440                 445
```

```
Lys Gln Ile Ala Phe Asn Gly Gly Leu Glu Pro Gly Val Val Ala Glu
    450                 455                 460
Lys Val Ser Asn Leu Pro Ala Gly His Gly Leu Asn Ala Ala Thr Gly
465                 470                 475                 480
Glu Tyr Glu Asp Leu Leu Lys Ala Gly Val Ala Asp Pro Val Lys Val
                485                 490                 495
Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala Ala Leu Phe Leu
            500                 505                 510
Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys Pro Glu Lys Ala Ser Ala Pro
        515                 520                 525
Ala Gly Asp Pro Thr Gly Gly Met Gly Gly Met Asp Phe
    530                 535                 540
```

<210> 161
<211> 985
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 161

```
ggatccctac atcctgctgg tcagctccaa ggtgtcgacc gtcaaggatc tgctcccgct      60
gctggagaag gtcatccagg ccggcaagcc gctgctgatc atcgccgagg acgtcgaggg     120
cgaggccctg tccacgctgg tggtcaacaa gatccgcggc accttcaagt ccgtcgccgt     180
caaggctccg ggcttcggtg accgccgcaa ggcgatgctg caggacatgg ccatcctcac     240
cggtggtcag gtcgtcagcg aaagagtcgg gctgtccctg gagaccgccg acgtctcgct     300
gctgggccag gcccgcaagg tcgtcgtcac caaggacgag accaccatcg tcgagggctc     360
gggcgattcc gatgccatcg ccggccgggt ggctcagatc cgcgccgaga tcgagaacag     420
cgactccgac tacgaccgcg agaagctgca ggagcgcctg gccaagctgg ccggcggtgt     480
tgcggtgatc aaggccggag ctgccaccga ggtggagctc aaggagcgca agcaccgcat     540
cgaggacgcc gtccgcaacg cgaaggctgc cgtcgaagag ggcatcgtcg ccggtggcgg     600
cgtggctctg ctgcagtcgg ctcctgcgct ggacgacctc ggcctgacgg gcgacgaggc     660
caccggtgcc aacatcgtcc gcgtggcgct gtcggctccg ctcaagcaga tcgccttcaa     720
cggcggcctg gagcccggcg tcgttgccga gaaggtgtcc aacctgcccg cgggtcacgg     780
cctcaacgcc gcgaccggtg agtacgagga cctgctcaag gccggcgtcg ccgacccggt     840
gaaggtcacc cgctcggcgc tgcagaacgc ggcgtccatc gcggctctgt tcctcaccac     900
cgaggccgtc gtcgccgaca agccggagaa ggcgtccgca cccgcgggcg acccgaccgg     960
tggcatgggc ggtatggact tctaa                                          985
```

<210> 162
<211> 327
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 162

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

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

<210> 163
<211> 403
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 163

```
ggatccgcgg caccggctgg tgacgaccaa gtacaacccg gcccgcacct ggacggccga      60
gaactccgtc ggcatcggcg gcgcgtacct gtgcatctac gggatggagg gccccggcgg     120
ctatcagttc gtcggccgca ccacccaggt gtggagtcgt taccgccaca cggcgccgtt     180
cgaacccgga agtccctggc tgctgcggtt tttcgaccga atttcgtggt atccggtgtc     240
ggccgaggag ctgctggaat tgcgagccga catggccgca ggccggggct cggtcgacat     300
caccgacggc gtgttctccc tcgccgagca cgaacggttc ctggccgaca acgccgacga     360
catcgccgcg ttccgttccc ggcaggcggc cgcgttctcc gcc                       403
```

<210> 164
<211> 336
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 164

```
cggaccgcgt gggcggccgc cggcgagttc gaccgcgccg agaaagccgc gtcgaaggcc      60
accgacgccg ataccgggga cctggtgctc tacgacggtg cgagcgggtc gacgctccgt     120
tcgcgtcgag cgtgtggaag gtcgacgtcg ccgtcggtga ccgggtggtg gccggacagc     180
cgttgctggc gctggaggcg atgaagatgg agaccgtgct gcgcgccccg gccgacgggg     240
tggtcaccca gatcctggtc tccgctgggc atctcgtcga tcccggcacc ccactggtcg     300
tggtcggcac cggagtgcgc gcatgagcgc cgtcga                               336
```

<210> 165

<211> 134
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 165

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

<210> 166
<211> 108
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 166

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

<210> 167
<211> 31
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 167

```
atagaattcg tccgacagtg ggacctcgag c                                  31
```

<210> 168

<211> 27
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 168
atagaattcc caccgcgtca gccgccg 27

<210> 169
<211> 1111
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 169
gtccgacagt gggacctcga gcaccacgtc acaggacagc ggccccgcca gcggcgccct 60
gcgcgtctcc aactggccgc tctatatggc cgacggtttc atcgcagcgt tccagaccgc 120
ctcgggcatc acggtcgact acaaagaaga cttcaacgac aacgagcagt ggttcgccaa 180
ggtcaaggag ccgttgtcgc gcaagcagga cataggcgcc gacctggtga tccccaccga 240
gttcatggcc gcgcgcgtca agggcctggg atggctcaat gagatcagcg aagccggcgt 300
gcccaatcgc aagaatctgc gtcaggacct gttggactcg agcatcgacg agggccgcaa 360
gttcaccgcg ccgtacatga ccggcatggt cggtctcgcc tacaacaagg cagccaccgg 420
acgcgatatc cgcaccatcg acgacctctg ggatcccgcg ttcaagggcc gcgtcagtct 480
gttctccgac gtccaggacg gcctcggcat gatcatgctc tcgcagggca actcgccgga 540
gaatccgacc accgagtcca ttcagcaggc ggtcgatctg gtccgcgaac agaacgacag 600
ggggtcagat ccgtcgcttc accggcaacg actacgccga cgacctggcc gcagaaacat 660
cgccatcgcg caggcgtact ccggtgacgt cgtgcagctg caggcggaca accccgatct 720
gcagttcatc gttcccgaat ccggcggcga ctggttcgtc gacacgatgg tgatcccgta 780
caccacgcag aaccagaagg ccgccgaggc gtggatcgac tacatctacg accgagccaa 840
ctacgccaag ctggtcgcgt tcacccagtt cgtgcccgca ctctcggaca tgaccgacga 900
actcgccaag gtcgatcctg catcggcgga gaacccgctg atcaacccgt cggccgaggt 960
gcaggcgaac ctgaagtcgt gggcggcact gaccgacgag cagacgcagg agttcaacac 1020
tgcgtacgcc gccgtcaccg gcggctgacg cggtggtagt gccgatgcga ggggcataaa 1080
tggccctgcg gacgcgagga gcataaatgg c 1111

<210> 170
<211> 348
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 170
Ser Asp Ser Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ser Gln Asp Ser Gly Pro Ala
1 5 10 15
Ser Gly Ala Leu Arg Val Ser Asn Trp Pro Leu Tyr Met Ala Asp Gly
20 25 30
Phe Ile Ala Ala Phe Gln Thr Ala Ser Gly Ile Thr Val Asp Tyr Lys
35 40 45
Glu Asp Phe Asn Asp Asn Glu Gln Trp Phe Ala Lys Val Lys Glu Pro
50 55 60
Leu Ser Arg Lys Gln Asp Ile Gly Ala Asp Leu Val Ile Pro Thr Glu
65 70 75 80
Phe Met Ala Ala Arg Val Lys Gly Leu Gly Trp Leu Asn Glu Ile Ser
85 90 95
Glu Ala Gly Val Pro Asn Arg Lys Asn Leu Arg Gln Asp Leu Leu Asp
100 105 110

```
Ser Ser Ile Asp Glu Gly Arg Lys Phe Thr Ala Pro Tyr Met Thr Gly
        115                 120                 125
Met Val Gly Leu Ala Tyr Asn Lys Ala Ala Thr Gly Arg Asp Ile Arg
    130                 135                 140
Thr Ile Asp Asp Leu Trp Asp Pro Ala Phe Lys Gly Arg Val Ser Leu
145                 150                 155                 160
Phe Ser Asp Val Gln Asp Gly Leu Gly Met Ile Met Leu Ser Gln Gly
                165                 170                 175
Asn Ser Pro Glu Asn Pro Thr Thr Glu Ser Ile Gln Gln Ala Val Asp
            180                 185                 190
Leu Val Arg Glu Gln Asn Asp Arg Gly Gln Ile Arg Arg Phe Thr Gly
        195                 200                 205
Asn Asp Tyr Ala Asp Asp Leu Ala Ala Gly Asn Ile Ala Ile Ala Gln
    210                 215                 220
Ala Tyr Ser Gly Asp Val Val Gln Leu Gln Ala Asp Asn Pro Asp Leu
225                 230                 235                 240
Gln Phe Ile Val Pro Glu Ser Gly Gly Asp Trp Phe Val Asp Thr Met
                245                 250                 255
Val Ile Pro Tyr Thr Thr Gln Asn Gln Lys Ala Ala Glu Ala Trp Ile
            260                 265                 270
Asp Tyr Ile Tyr Asp Arg Ala Asn Tyr Ala Lys Leu Val Ala Phe Thr
        275                 280                 285
Gln Phe Val Pro Ala Leu Ser Asp Met Thr Asp Glu Leu Ala Lys Val
    290                 295                 300
Asp Pro Ala Ser Ala Glu Asn Pro Leu Ile Asn Pro Ser Ala Glu Val
305                 310                 315                 320
Gln Ala Asn Leu Lys Ser Trp Ala Ala Leu Thr Asp Glu Gln Thr Gln
                325                 330                 335
Glu Phe Asn Thr Ala Tyr Ala Ala Val Thr Gly Gly
            340                 345
```

<210> 171
<211> 1420
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (955)...(955)

<221> NEJISTÉ
<222> (973)...(973)

<400> 171

```
gatgagcagc gtgctgaact cgacctggtt ggcctgggcc gtcgcggtcg cggtcgggtt      60
cccggtgctg ctggtcgtgc tgaccgaggt gcacaacgcg ttgcgtcggc gcggcagcgc     120
gctggcccgc ccggtgcaac tcctgcgtac ctacatcctg ccgctgggcg cgttgctgct     180
cctgctggta caggcgatgg agatctccga cgacgccacg tcggtacggt tggtcgccac     240
cctgttcggc gtcgtgttgt tgacgttggt gctgtccggg ctcaacgcca ccctcatcca     300
gggcgcacca gaagacagct ggcgcaggcg gattccgtcg atcttcctcg acgtcgcgcg     360
cttcgcgctg atcgcggtcg gtatcaccgt gatcatggcc tatgtctggg gcgcgaacgt     420
gggggggcctg ttcaccgcac tgggcgtcac ttccatcgtt cttggcctgg ctctgcagaa     480
ttcggtcggt cagatcatct cgggtctgct gctgctgttc gagcaaccgt tccggctcgg     540
cgactggatc accgtcccca ccgcggcggg ccggccgtcc gcccacggcc gcgtggtgga     600
agtcaactgg cgtgcaacac atatcgacac cggcggcaac ctgctggtaa tgcccaacgc     660
cgaactcgcc ggcgcgtcgt tcaccaatta cagccggccc gtgggagagc accggctgac     720
cgtcgtcacc accttcaacg ccgcggacac ccccgatgat gtctgcgaga tgctgtcgtc     780
```

ggtcgcggcg tcgctgcccg aactgcgcac cgacggacag atcgccacgc tctatctcgg 840
tgcggccgaa tacgagaagt cgatcccgtt gcacacaccc gcggtggacg actcggtcag 900
gagcacgtac ctgcgatggg tctggtacgc cgcgcgccgg caggaacttc gcctnaacgg 960
cgtcgccgac ganttcgaca cgccggaacg gatcgcctcg gccatgcggg ctgtggcgtc 1020
cacactgcgc ttggcagacg acgaacagca ggagatcgcc gacgtggtgc gtctggtccg 1080
ttacggcaac ggggaacgcc tccagcagcc gggtcaggta ccgaccggga tgaggttcat 1140
cgtagacggc agggtgagtc tgtccgtgat cgatcaggac ggcgacgtga tcccggcgcg 1200
ggtgctcgag cgtggcgact tcctggggca gaccacgctg acgcgggaac cggtactggc 1260
gaccgcgcac gcgctggagg aagtcaccgt gctggagatg gcccgtgacg agatcgagcg 1320
cctggtgcac cgaaagccga tcctgctgca cgtgatcggg gccgtgatcg ccgaccggcg 1380
cgcgcacgaa cttcggttga tggcggactc gcaggactga 1420

<210> 172
<211> 471
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (318)...(318)

<221> NEJISTÉ
<222> (324)...(324)

<400> 172

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

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

<210> 173
<211> 2172
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 173
tagatgacaa ttctgccctg gaatgcgcga acgtctgaac acccgacgcg aaaaagacgc 60
gggcgctacc acctcctgtc gcggatgagc atccagtcca agttgctgct gatgctgctt 120
ctgaccagca ttctctcggc tgcggtggtc ggtttcatcg gctatcagtc cggacggtcc 180
tcgctgcgcg catcggtgtt cgaccgcctc accgacatcc gcgagtcgca gtcgcgcggg 240
ttggagaatc agttcgcgga cctgaagaac tcgatggtga tttactcgcg cggcagcact 300
gccacggagg cgatcggcgc gttcagcgac ggtttccgtc agctcggcga tgcgacgatc 360
aataccgggc aggcggcgtc attgcgccgt tactacgacc ggacgttcgc caacaccacc 420
ctcgacgaca gcggaaaccg cgtcgacgtc cgcgcgctca tcccgaaatc caacccccag 480
cgctatctgc aggcgctcta taccccgccg tttcagaact gggagaaggc gatcgcgttc 540
gacgacgcgc gcgacggcag cgcctggtcg gccgccaatg ccagattcaa cgagttcttc 600
cgcgagatcg tgcaccgctt caacttcgag gatctgatgc tgctcgacct cgagggcaac 660
gtggtgtact ccgcctacaa ggggccggat ctcgggacaa acatcgtcaa cggcccctat 720
cgcaaccggg aactgtcgga agcctacgag aaggcggtcg cgtcgaactc gatcgactat 780
gtcggtgtca ccgacttcgg gtggtacctg cctgccgagg aaccgaccgc ctggttcctg 840
tccccggtcg ggttgaagga ccgagtcgac ggtgtgatgg cggtccagtt cccgatcgcg 900
cggatcaacg aattgatgac ggcgcgggga cagtggcgtg acaccgggat gggagacacc 960
ggtgagacca tcctggtcgg accggacaat ctgatgcgct cggactcccg gctgttccgc 1020
gagaaccggg agaagttcct ggccgacgtc gtcgaggggg gaaccccgcc ggaggtcgcc 1080
gacgaatcgg ttgaccgccg cggcaccacg ctggtgcagc cggtgaccac ccgctccgtc 1140
gaggaggccc aacgcggcaa caccgggacg acgatcgagg acgactatct cggccacgag 1200
gcgttacagg cgtactcacc ggtggacctg ccgggactgc actgggtgat cgtggccaag 1260
atcgacaccg acgaggcgtt cgccccggtg gcgcagttca ccaggaccct ggtgctgtcg 1320

```
acggtgatca tcatcttcgg cgtgtcgctg gcggccatgc tgctggcgcg gttgttcgtc    1380
cgtccgatcc ggcggttgca ggccggcgcc cagcagatca gcggcggtga ctaccgcctc    1440
gctctgccgg tgttgtctcg tgacgaattc ggcgatctga caacagcttt caacgacatg    1500
agtcgcaatc tgtcgatcaa ggacgagctg ctcggcgagg agcgcgccga gaaccaacgg    1560
ctgatgctgt ccctgatgcc cgaaccggtg atgcagcgct acctcgacgg ggaggagacg    1620
atcgcccagg accacaagaa cgtcacggtg atcttcgccg acatgatggg cctcgacgag    1680
ttgtcgcgca tgttgacctc cgaggaactg atggtggtgg tcaacgacct gacccgccag    1740
ttcgacgccg ccgccgagag tctcggggtc gaccacgtgc ggacgctgca cgacgggtac    1800
ctggccagct gcgggttagg cgtgccgcgg ctggacaacg tccggcgcac ggtcaatttc    1860
gcgatcgaaa tggaccgcat catcgaccgg cacgccgccg agtccgggca cgacctgcgg    1920
ctccgcgcgg gcatcgacac cgggtcggcg gccagcgggc tggtggggcg gtccacgttg    1980
gcgtacgaca tgtggggttc ggcggtcgat gtcgctaacc aggtgcagcg cggctccccc    2040
cagcccggca tctacgtcac ctcgcgggtg cacgaggtca tgcaggaaac tctcgacttc    2100
gtcgccgccg gggaggtcgt cggcgagcgc ggcgtcgaga cggtctggcg gttgcagggc    2160
caccggcgat ga                                                       2172
```

<210> 174
<211> 722
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 174

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

Glu Pro Thr Ala Trp Phe Leu Ser Pro Val Gly Leu Lys Asp Arg Val
275 280 285
Asp Gly Val Met Ala Val Gln Phe Pro Ile Ala Arg Ile Asn Glu Leu
290 295 300
Met Thr Ala Arg Gly Gln Trp Arg Asp Thr Gly Met Gly Asp Thr Gly
305 310 315 320
Glu Thr Ile Leu Val Gly Pro Asp Asn Leu Met Arg Ser Asp Ser Arg
325 330 335
Leu Phe Arg Glu Asn Arg Glu Lys Phe Leu Ala Asp Val Val Glu Gly
340 345 350
Gly Thr Pro Pro Glu Val Ala Asp Glu Ser Val Asp Arg Arg Gly Thr
355 360 365
Thr Leu Val Gln Pro Val Thr Thr Arg Ser Val Glu Glu Ala Gln Arg
370 375 380
Gly Asn Thr Gly Thr Thr Ile Glu Asp Asp Tyr Leu Gly His Glu Ala
385 390 395 400
Leu Gln Ala Tyr Ser Pro Val Asp Leu Pro Gly Leu His Trp Val Ile
405 410 415
Val Ala Lys Ile Asp Thr Asp Glu Ala Phe Ala Pro Val Ala Gln Phe
420 425 430
Thr Arg Thr Leu Val Leu Ser Thr Val Ile Ile Ile Phe Gly Val Ser
435 440 445
Leu Ala Ala Met Leu Leu Ala Arg Leu Phe Val Arg Pro Ile Arg Arg
450 455 460
Leu Gln Ala Gly Ala Gln Gln Ile Ser Gly Gly Asp Tyr Arg Leu Ala
465 470 475 480
Leu Pro Val Leu Ser Arg Asp Glu Phe Gly Asp Leu Thr Thr Ala Phe
485 490 495
Asn Asp Met Ser Arg Asn Leu Ser Ile Lys Asp Glu Leu Leu Gly Glu
500 505 510
Glu Arg Ala Glu Asn Gln Arg Leu Met Leu Ser Leu Met Pro Glu Pro
515 520 525
Val Met Gln Arg Tyr Leu Asp Gly Glu Glu Thr Ile Ala Gln Asp His
530 535 540
Lys Asn Val Thr Val Ile Phe Ala Asp Met Met Gly Leu Asp Glu Leu
545 550 555 560
Ser Arg Met Leu Thr Ser Glu Glu Leu Met Val Val Val Asn Asp Leu
565 570 575
Thr Arg Gln Phe Asp Ala Ala Ala Glu Ser Leu Gly Val Asp His Val
580 585 590
Arg Thr Leu His Asp Gly Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Leu Gly Val Pro
595 600 605
Arg Leu Asp Asn Val Arg Arg Thr Val Asn Phe Ala Ile Glu Met Asp
610 615 620
Arg Ile Ile Asp Arg His Ala Ala Glu Ser Gly His Asp Leu Arg Leu
625 630 635 640
Arg Ala Gly Ile Asp Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Leu Val Gly Arg
645 650 655
Ser Thr Leu Ala Tyr Asp Met Trp Gly Ser Ala Val Asp Val Ala Asn
660 665 670
Gln Val Gln Arg Gly Ser Pro Gln Pro Gly Ile Tyr Val Thr Ser Arg
675 680 685
Val His Glu Val Met Gln Glu Thr Leu Asp Phe Val Ala Ala Gly Glu
690 695 700
Val Val Gly Glu Arg Gly Val Glu Thr Val Trp Arg Leu Gln Gly His
705 710 715 720
Arg Arg

<210> 175
<211> 898
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 175
gagcaaccgt tccggctcgg cgactggatc accgtcccca ccgcggcggg ccggccgtcc 60
gcccacggcc gcgtggtgga agtcaactgg cgtgcaacac atatcgacac cggcggcaac 120
ctgctggtaa tgcccaacgc cgaactcgcc ggcgcgtcgt tcaccaatta cagccggccc 180
gtgggagagc accggctgac cgtcgtcacc accttcaacg ccgcggacac ccccgatgat 240
gtctgcgaga tgctgtcgtc ggtcgcggcg tcgctgcccg aactgcgcac cgacggacag 300
atcgccacgc tctatctcgg tgcggccgaa tacgagaagt cgatcccgtt gcacacaccc 360
gcggtggacg actcggtcag gagcacgtac ctgcgatggg tctggtacgc cgcgcgccgg 420
caggaacttc gcctaacggc gtcgccgacg attcgacacg ccggaacgga tcgcctcggc 480
catgcgggct gtggcgtcca cactgcgctt ggcagacgac gaacagcagg agatcgccga 540
cgtggtgcgt ctggtccgtt acggcaacgg ggaacgcctc cagcagccgg gtcaggtacc 600
gaccgggatg aggttcatcg tagacggcag ggtgagtctg tccgtgatcg atcaggacgg 660
cgacgtgatc ccggcgcggg tgctcgagcg tggcgacttc ctggggcaga ccacgctgac 720
gcgggaaccg gtactggcga ccgcgcacgc gctggaggaa gtcaccgtgc tggagatggc 780
ccgtgacgag atcgagcgcc tggtgcaccg aaagccgatc ctgctgcacg tgatcggggc 840
cgtgatcgcc gaccggcgcg cgcacgaact tcggttgatg gcggactcgc aggactga 898

<210> 176
<211> 2013
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 176
ggctatcagt ccggacggtc ctcgctgcgc gcatcggtgt tcgaccgcct caccgacatc 60
cgcgagtcgc agtcgcgcgg gttggagaat cagttcgcgg acctgaagaa ctcgatggtg 120
atttactcgc gcggcagcac tgccacggag gcgatcggcg cgttcagcga cggtttccgt 180
cagctcggcg atgcgacgat caataccggg caggcggcgt cattgcgccg ttactacgac 240
cggacgttcg ccaacaccac cctcgacgac agcggaaacc gcgtcgacgt ccgcgcgctc 300
atcccgaaat ccaaccccca gcgctatctg caggcgctct ataccccgcc gtttcagaac 360
tgggagaagg cgatcgcgtt cgacgacgcg cgcgacggca gcgcctggtc ggccgccaat 420
gccagattca acgagttctt ccgcgagatc gtgcaccgct tcaacttcga ggatctgatg 480
ctgctcgacc tcgagggcaa cgtggtgtac tccgcctaca aggggccgga tctcgggaca 540
aacatcgtca acggccccta tcgcaaccgg gaactgtcgg aagcctacga gaaggcggtc 600
gcgtcgaact cgatcgacta tgtcggtgtc accgacttcg ggtggtacct gcctgccgag 660
gaaccgaccg cctggttcct gtccccggtc gggttgaagg accgagtcga cggtgtgatg 720
gcggtccagt tcccgatcgc gcggatcaac gaattgatga cggcgcgggg acagtggcgt 780
gacaccggga tgggagacac cggtgagacc atcctggtcg gaccggacaa tctgatgcgc 840
tcggactccc ggctgttccg cgagaaccgg gagaagttcc tggccgacgt cgtcgagggg 900
ggaaccccgc cggaggtcgc cgacgaatcg gttgaccgcc gcggcaccac gctggtgcag 960
ccggtgacca cccgctccgt cgaggaggcc caacgcggca acaccgggac gacgatcgag 1020
gacgactatc tcggccacga ggcgttacag gcgtactcac cggtggacct gccgggactg 1080
cactgggtga tcgtggccaa gatcgacacc gacgaggcgt tcgccccggt ggcgcagttc 1140
accaggaccc tggtgctgtc gacggtgatc atcatcttcg gcgtgtcgct ggcggccatg 1200
ctgctggcgc ggttgttcgt ccgtccgatc cggcggttgc aggccggcgc ccagcagatc 1260
agcggcggtg actaccgcct cgctctgccg gtgttgtctc gtgacgaatt cggcgatctg 1320
acaacagctt tcaacgacat gagtcgcaat ctgtcgatca aggacgagct gctcggcgag 1380
gagcgcgccg agaaccaacg gctgatgctg tccctgatgc ccgaaccggt gatgcagcgc 1440
tacctcgacg gggaggagac gatcgcccag gaccacaaga acgtcacggt gatcttcgcc 1500
gacatgatgg gcctcgacga gttgtcgcgc atgttgacct ccgaggaact gatggtggtg 1560
gtcaacgacc tgacccgcca gttcgacgcc gccgccgaga gtctcggggt cgaccacgtg 1620

```
cggacgctgc acgacgggta cctggccagc tgcgggttag gcgtgccgcg gctggacaac    1680
gtccggcgca cggtcaattt cgcgatcgaa atggaccgca tcatcgaccg gcacgccgcc    1740
gagtccgggc acgacctgcg gctccgcgcg ggcatcgaca ccgggtcggc ggccagcggg    1800
ctggtggggc ggtccacgtt ggcgtacgac atgtggggtt cggcggtcga tgtcgctaac    1860
caggtgcagc gcggctcccc ccagcccggc atctacgtca cctcgcgggt gcacgaggtc    1920
atgcaggaaa ctctcgactt cgtcgccgcc ggggaggtcg tcggcgagcg cggcgtcgag    1980
acggtctggc ggttgcaggg ccaccggcga tga                                 2013
```

<210> 177
<211> 297
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (145)...(145)

<221> NEJISTÉ
<222> (151)...(151)

<400> 177

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

Glu Leu Arg Leu Met Asp Ser Gln Asp
290 295

<210> 178
<211> 670
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 178
Gly Tyr Gln Ser Gly Arg Ser Ser Leu Arg Ala Ser Val Phe Asp Arg
1 5 10 15
Leu Thr Asp Ile Arg Glu Ser Gln Ser Arg Gly Leu Glu Asn Gln Phe
20 25 30
Ala Asp Leu Lys Asn Ser Met Val Ile Tyr Ser Arg Gly Ser Thr Ala
35 40 45
Thr Glu Ala Ile Gly Ala Phe Ser Asp Gly Phe Arg Gln Leu Gly Asp
50 55 60
Ala Thr Ile Asn Thr Gly Gln Ala Ala Ser Leu Arg Arg Tyr Tyr Asp
65 70 75 80
Arg Thr Phe Ala Asn Thr Thr Leu Asp Asp Ser Gly Asn Arg Val Asp
85 90 95
Val Arg Ala Leu Ile Pro Lys Ser Asn Pro Gln Arg Tyr Leu Gln Ala
100 105 110
Leu Tyr Thr Pro Pro Phe Gln Asn Trp Glu Lys Ala Ile Ala Phe Asp
115 120 125
Asp Ala Arg Asp Gly Ser Ala Trp Ser Ala Ala Asn Ala Arg Phe Asn
130 135 140
Glu Phe Phe Arg Glu Ile Val His Arg Phe Asn Phe Glu Asp Leu Met
145 150 155 160
Leu Leu Asp Leu Glu Gly Asn Val Val Tyr Ser Ala Tyr Lys Gly Pro
165 170 175
Asp Leu Gly Thr Asn Ile Val Asn Gly Pro Tyr Arg Asn Arg Glu Leu
180 185 190
Ser Glu Ala Tyr Glu Lys Ala Val Ala Ser Asn Ser Ile Asp Tyr Val
195 200 205
Gly Val Thr Asp Phe Gly Trp Tyr Leu Pro Ala Glu Glu Pro Thr Ala
210 215 220
Trp Phe Leu Ser Pro Val Gly Leu Lys Asp Arg Val Asp Gly Val Met
225 230 235 240
Ala Val Gln Phe Pro Ile Ala Arg Ile Asn Glu Leu Met Thr Ala Arg
245 250 255
Gly Gln Trp Arg Asp Thr Gly Met Gly Asp Thr Gly Glu Thr Ile Leu
260 265 270
Val Gly Pro Asp Asn Leu Met Arg Ser Asp Ser Arg Leu Phe Arg Glu
275 280 285
Asn Arg Glu Lys Phe Leu Ala Asp Val Val Glu Gly Gly Thr Pro Pro
290 295 300
Glu Val Ala Asp Glu Ser Val Asp Arg Arg Gly Thr Thr Leu Val Gln
305 310 315 320
Pro Val Thr Thr Arg Ser Val Glu Glu Ala Gln Arg Gly Asn Thr Gly
325 330 335
Thr Thr Ile Glu Asp Asp Tyr Leu Gly His Glu Ala Leu Gln Ala Tyr
340 345 350
Ser Pro Val Asp Leu Pro Gly Leu His Trp Val Ile Val Ala Lys Ile
355 360 365
Asp Thr Asp Glu Ala Phe Ala Pro Val Ala Gln Phe Thr Arg Thr Leu
370 375 380

```
Val Leu Ser Thr Val Ile Ile Ile Phe Gly Val Ser Leu Ala Ala Met
385                 390                 395                 400
Leu Leu Ala Arg Leu Phe Val Arg Pro Ile Arg Arg Leu Gln Ala Gly
                405                 410                 415
Ala Gln Gln Ile Ser Gly Gly Asp Tyr Arg Leu Ala Leu Pro Val Leu
            420                 425                 430
Ser Arg Asp Glu Phe Gly Asp Leu Thr Thr Ala Phe Asn Asp Met Ser
        435                 440                 445
Arg Asn Leu Ser Ile Lys Asp Glu Leu Leu Gly Glu Glu Arg Ala Glu
    450                 455                 460
Asn Gln Arg Leu Met Leu Ser Leu Met Pro Glu Pro Val Met Gln Arg
465                 470                 475                 480
Tyr Leu Asp Gly Glu Glu Thr Ile Ala Gln Asp His Lys Asn Val Thr
                485                 490                 495
Val Ile Phe Ala Asp Met Met Gly Leu Asp Glu Leu Ser Arg Met Leu
            500                 505                 510
Thr Ser Glu Glu Leu Met Val Val Val Asn Asp Leu Thr Arg Gln Phe
        515                 520                 525
Asp Ala Ala Ala Glu Ser Leu Gly Val Asp His Val Arg Thr Leu His
    530                 535                 540
Asp Gly Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Leu Gly Val Pro Arg Leu Asp Asn
545                 550                 555                 560
Val Arg Arg Thr Val Asn Phe Ala Ile Glu Met Asp Arg Ile Ile Asp
                565                 570                 575
Arg His Ala Ala Glu Ser Gly His Asp Leu Arg Leu Arg Ala Gly Ile
            580                 585                 590
Asp Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Leu Val Gly Arg Ser Thr Leu Ala
        595                 600                 605
Tyr Asp Met Trp Gly Ser Ala Val Asp Val Ala Asn Gln Val Gln Arg
    610                 615                 620
Gly Ser Pro Gln Pro Gly Ile Tyr Val Thr Ser Arg Val His Glu Val
625                 630                 635                 640
Met Gln Glu Thr Leu Asp Phe Val Ala Ala Gly Glu Val Val Gly Glu
                645                 650                 655
Arg Gly Val Glu Thr Val Trp Arg Leu Gln Gly His Arg Arg
            660                 665                 670
```

<210> 179
<211> 520
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 179

```
gtgatcgacg aaaccctctt ccatgccgag gagaagatgg agaaggccgt ctcggtggca      60
cccgacgacc tggcgtcgat tcgtaccggc cgcgcgaacc ccggcatgtt caaccggatc     120
aacatcgact actacggcgc ctccaccccg atcacgcagc tgtccagcat caacgtgccc     180
gaggcgcgca tggtggtgat caagccctac gaggcgagcc agctgcgcct catcgaggat     240
gcgatccgca actccgacct cggcgtcaat ccgaccaacg acggcaacat catccgggtg     300
tcgatcccgc agctcaccga ggagcgccgc cgcgacctgg tcaagcaggc caaggccaag     360
ggcgaggacg ccaaggtgtc ggtgcgcaac atccgtcgca acgatatgaa cacctttcgc     420
atcgcaccgg tacggctgcc gacgccaccg ccgtcgtaga agcgacagag gatcgcaggt     480
aacggtattg gccacgcctt ctgtggcggg ccgacaccac                           520
```

<210> 180
<211> 1071
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 180
cgtggggaag gattgcactc tatgagcgaa atcgcccgtc cctggcgggt tctggcaggt 60
ggcatcggtg cctgcgccgc gggtatcgcc ggggtgctga gcatcgcggt caccacggcg 120
tcggcccagc cgggcctccc gcagcccccg ctgcccgccc ctgccacagt gacgcaaacc 180
gtcacggttg cgcccaacgc cgcgccacaa ctcatcccgc gccccggtgt gacgcctgcc 240
accggcggcg ccgccgcggt gcccgccggg gtgagcgccc cggcggtcgc gccggccccc 300
gcgctgcccg cccgcccggt gtccacgatc gccccggcca cctcgggcac gctcagcgag 360
ttcttcgccg ccaagggcgt cacgatggag ccgcagtcca gccgcgactt ccgcgccctc 420
aacatcgtgc tgccgaagcc gcggggctgg gagcacatcc cggacccgaa cgtgccggac 480
gcgttcgcgg tgctggccga ccgggtcggc ggcaacggcc tgtactcgtc gaacgcccag 540
gtggtggtct acaaactcgt cggcgagttc gaccccaagg aagcgatcag ccacggcttc 600
gtcgacagcc agaagctgcc ggcgtggcgt tccaccgacg cgtcgctggc cgacttcggc 660
ggaatgccgt cctcgctgat cgagggcacc taccgcgaga acaacatgaa gctgaacacg 720
tcccggcgcc acgtcattgc caccgcgggg cccgaccact acctggtgtc gctgtcggtg 780
accaccagcg tcgaacaggc cgtggccgaa gccgcggagg ccaccgacgc gattgtcaac 840
ggcttcaagg tcagcgttcc gggtccgggt ccggccgcac cgccacctgc acccggtgcc 900
cccggtgtcc cgcccgcccc cggcgccccg gcgctgccgc tggccgtcgc accacccccg 960
gctcccgctg ttcccgccgt ggcgcccgcg ccacagctgc tgggactgca gggatagacg 1020
tcgtcgtccc ccgggcgaag cctggcgccc gggggacgac ggccctttc t 1071

<210> 181
<211> 152
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 181
Val Ile Asp Glu Thr Leu Phe His Ala Glu Glu Lys Met Glu Lys Ala
1 5 10 15
Val Ser Val Ala Pro Asp Asp Leu Ala Ser Ile Arg Thr Gly Arg Ala
20 25 30
Asn Pro Gly Met Phe Asn Arg Ile Asn Ile Asp Tyr Tyr Gly Ala Ser
35 40 45
Thr Pro Ile Thr Gln Leu Ser Ser Ile Asn Val Pro Glu Ala Arg Met
50 55 60
Val Val Ile Lys Pro Tyr Glu Ala Ser Gln Leu Arg Leu Ile Glu Asp
65 70 75 80
Ala Ile Arg Asn Ser Asp Leu Gly Val Asn Pro Thr Asn Asp Gly Asn
85 90 95
Ile Ile Arg Val Ser Ile Pro Gln Leu Thr Glu Glu Arg Arg Arg Asp
100 105 110
Leu Val Lys Gln Ala Lys Ala Lys Gly Glu Asp Ala Lys Val Ser Val
115 120 125
Arg Asn Ile Arg Arg Asn Asp Met Asn Thr Phe Arg Ile Ala Pro Val
130 135 140
Arg Leu Pro Thr Pro Pro Pro Ser
145 150

<210> 182
<211> 331
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 182
Met Ser Glu Ile Ala Arg Pro Trp Arg Val Leu Ala Gly Gly Ile Gly
1 5 10 15

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

<210> 183
<211> 207
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 183

```
acctacgagt tcgagaacaa ggtcacgggc ggccgcatcc cgcgcgagta catcccgtcg      60
gtggatgccg gcgcgcagga cgccatgcag tacggcgtgc tggccggcta cccgctggtt     120
aacgtcaagc tgacgctgct cgacggtgcc taccacgaag tcgactcgtc ggaaatggca     180
ttcaaggttg ccggctccca ggtcata                                         207
```

<210> 184
<211> 69
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 184
Thr Tyr Glu Phe Glu Asn Lys Val Thr Gly Gly Arg Ile Pro Arg Glu
1 5 10 15
Tyr Ile Pro Ser Val Asp Ala Gly Ala Gln Asp Ala Met Gln Tyr Gly
20 25 30
Val Leu Ala Gly Tyr Pro Leu Val Asn Val Lys Leu Thr Leu Leu Asp
35 40 45
Gly Ala Tyr His Glu Val Asp Ser Ser Glu Met Ala Phe Lys Val Ala
50 55 60
Gly Ser Gln Val Ile
65

<210> 185
<211> 898
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (637)...(637)

<221> NEJISTÉ
<222> (662)...(662)

<400> 185
cgacctccac ccgggcgtga ggccaaccac taggctggtc accagtagtc gacggcacac 60
ttcaccgaaa aaatgaggac agaggagaca cccgtgacga tccgtgttgg tgtgaacggc 120
ttcggccgta tcggacgcaa cttcttccgc gcgctggacg cgcagaaggc cgaaggcaag 180
aacaaggaca tcgagatcgt cgcggtcaac gacctcaccg acaacgccac gctggcgcac 240
ctgctgaagt tcgactcgat cctgggccgg ctgccctacg acgtgagcct cgaaggcgag 300
gacaccatcg tcgtcggcag caccaagatc aaggcgctcg aggtcaagga aggcccggcg 360
gcgctgccct ggggcgacct gggcgtcgac gtcgtcgtcg agtccaccgg catcttcacc 420
aagcgcgaca aggcccaggg ccacctcgac gcgggcgcca agaaggtcat catctccgcg 480
ccggccaccg atgaggacat caccatcgtg ctcggcgtca acgacgacaa gtacgacggc 540
agccagaaca tcatctccaa cgcgtcgtgc accacgaact gcctcggccc gctggcgaag 600
gtcatcaacg acgagttcgg catcgtcaag ggcctgntga ccaccatcca cgcctacacc 660
cnggtccaga acctgcagga cggcccgcac aaggatctgc gccgggcccg cgccgccgcg 720
ctgaacatcg tgccgacctc caccggtgcc gccaaggcca tcggactggt gctgcccgag 780
ctgaagggca agctcgacgg ctacgcgctg cgggtgccga tccccaccgg ctcggtcacc 840
gacctgaccg ccgagctggg caagtcggcc accgtggacg agatcaacgc cgcgatga 898

<210> 186
<211> 268
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (182)...(182)

<221> NEJISTÉ
<222> (190)...(190)

<400> 186
Val Thr Ile Arg Val Gly Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Asn
1 5 10 15

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

<210> 187
<211> 41
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (39)...(39)

<400> 187

```
Met Asn Lys Ala Glu Leu Ile Asp Val Leu Thr Glu Lys Leu Gly Ser
 1               5                  10                  15
Asp Arg Arg Gln Ala Thr Ala Ala Val Glu Asn Val Val Asp Thr Ile
            20                  25                  30
Val Ala Ala Val Pro Lys Xaa Val Val
        35                  40
```

<210> 188
<211> 26
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<221> NEJISTÉ
<222> (12)...(12)

<400> 188
atgaayaarg cngarctsat ygaygt 26

<210> 189
<211> 20
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<400> 189
atsgtrtgva cvacgttytc 20

<210> 190
<211> 84
<212> DNA
<213> Syntetizovaná sekvence

<220>
<223> Vyrobeno v laboratoři

<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)

<400> 190
gnactcattg acgtactcac tgagaagctg ggctcggatt gtcggcaagc gactgcggca 60
atggagaacg tggtccacac cata 84

<210> 191
<211> 337
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (2)...(2)

<400> 191
gnactcattg acgtactcac tgagaagctg ggctcggatt gtcggcaagc gactgcggcg 60
gtggagaatg ttgtcgacac catcgtgcgc gccgtgcaca agggtgagag cgtcaccatc 120
acgggcttcg gtgttttcga gcagcgtcgt cgcgcagcac gcgtggcacg caatccgcgc 180
accggcgaga ccgtgaaggt caagcccacc tcagtcccgg cattccgtcc cggcgctcag 240
ttcaaggctg ttgtctctgg cgcacagaag cttccggccg agggtccggc ggtcaagcgc 300
ggtgtgaccg cgacgagcac cgcccgcaag gcagcca 337

<210> 192
<211> 111
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ

<222> (1)...(1)

<400> 192

```
Xaa Leu Ile Asp Val Leu Thr Glu Lys Leu Gly Ser Asp Arg Gln Ala
 1               5                  10                  15
Thr Ala Ala Val Glu Asn Val Val Asp Thr Ile Val Arg Ala Val His
            20                  25                  30
Lys Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Gly Phe Gly Val Phe Glu Gln Arg
        35                  40                  45
Arg Arg Ala Ala Arg Val Ala Arg Asn Pro Arg Thr Gly Glu Thr Val
    50                  55                  60
Lys Val Lys Pro Thr Ser Val Pro Ala Phe Arg Pro Gly Ala Gln Phe
65                  70                  75                  80
Lys Ala Val Val Ser Gly Ala Gln Lys Leu Pro Ala Glu Gly Pro Ala
                85                  90                  95
Val Lys Arg Gly Val Thr Ala Thr Ser Thr Ala Arg Lys Ala Ala
            100                 105                 110
```

<210> 193
<211> 1164
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 193

```
ggtggcgcgc atcgagaagc gcccgccccg gttcacgggc gcctgatcat ggtgcgggcg      60
gcgctgcgct acggcttcgg gacggcctca ctgctggccg gcgggttcgt gctgcgcgcc     120
ctgcagggca cgcctgccgc cctcggcgcg actccgggcg aggtcgcgcc ggtggcgcgc     180
cgctcgccga actaccgcga cggcaagttc gtcaacctgg agccccccgtc gggcatcacg     240
atggatcgcg acctgcagcg gatgctgttg cgcgatctgg ccaacgccgc atcccagggc     300
aagccgcccg gaccgatccc gctggccgag ccgccgaagg gggatcccac tcccgcgccg     360
gcggcggcca gctggtacgg ccattccagc gtgctgatcg aggtcgacgg ctaccgcgtg     420
ctggccgacc cggtgtggag caacagatgt tcgccctcac gggcggtcgg accgcagcgc     480
atgcacgacg tcccggtgcc gctggaggcg cttcccgccg tggacgcggt ggtgatcagc     540
cacgaccact acgaccacct cgacatcgac accatcgtcg cgttggcgca cacccagcgg     600
gccccgttcg tggtgccgtt gggcatcggc gcacacctgc gcaagtgggg cgtccccgag     660
gcgcggatcg tcgagttgga ctggcacgaa gcccaccgca tagacgacct gacgctggtc     720
tgcacccccg cccggcactt ctccggacgg ttgttctccc gcgactcgac gctgtgggcg     780
tcgtgggtgg tcaccggctc gtcgcacaag gcgttcttcg gtggcgacac cggatacacg     840
aagagcttcg ccgagatcgg cgacgagtac ggtccgttcg atctgaccct gctgccgatc     900
ggggcctacc atcccgcgtt cgccgacatc cacatgaacc ccgaggaggc ggtgcgcgcc     960
catctggacc tgaccgaggt ggacaacagc ctgatggtgc ccatccactg ggcgacattc    1020
cgcctcgccc cgcatccgtg gtccgagccc gccgaacgcc tgctgaccgc tgccgacgcc    1080
gagcgggtac gcctgaccgt gccgattccc ggtcagcggg tggacccgga gtcgacgttc    1140
gacccgtggt ggcggttctg aacc                                           1164
```

<210> 194
<211> 370
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 194

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

06.11.00

```
Tyr Arg Asp Gly Lys Phe Val Asn Leu Glu Pro Pro Ser Gly Ile Thr
    50                  55                  60
Met Asp Arg Asp Leu Gln Arg Met Leu Leu Arg Asp Leu Ala Asn Ala
65                  70                  75                  80
Ala Ser Gln Gly Lys Pro Pro Gly Pro Ile Pro Leu Ala Glu Pro Pro
                85                  90                  95
Lys Gly Asp Pro Thr Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser Trp Tyr Gly His
            100                 105                 110
Ser Ser Val Leu Ile Glu Val Asp Gly Tyr Arg Val Leu Ala Asp Pro
        115                 120                 125
Val Trp Ser Asn Arg Cys Ser Pro Ser Arg Ala Val Gly Pro Gln Arg
    130                 135                 140
Met His Asp Val Pro Val Pro Leu Glu Ala Leu Pro Ala Val Asp Ala
145                 150                 155                 160
Val Val Ile Ser His Asp His Tyr Asp His Leu Asp Ile Asp Thr Ile
                165                 170                 175
Val Ala Leu Ala His Thr Gln Arg Ala Pro Phe Val Val Pro Leu Gly
            180                 185                 190
Ile Gly Ala His Leu Arg Lys Trp Gly Val Pro Glu Ala Arg Ile Val
        195                 200                 205
Glu Leu Asp Trp His Glu Ala His Arg Ile Asp Asp Leu Thr Leu Val
    210                 215                 220
Cys Thr Pro Ala Arg His Phe Ser Gly Arg Leu Phe Ser Arg Asp Ser
225                 230                 235                 240
Thr Leu Trp Ala Ser Trp Val Val Thr Gly Ser Ser His Lys Ala Phe
                245                 250                 255
Phe Gly Gly Asp Thr Gly Tyr Thr Lys Ser Phe Ala Glu Ile Gly Asp
            260                 265                 270
Glu Tyr Gly Pro Phe Asp Leu Thr Leu Leu Pro Ile Gly Ala Tyr His
        275                 280                 285
Pro Ala Phe Ala Asp Ile His Met Asn Pro Glu Glu Ala Val Arg Ala
    290                 295                 300
His Leu Asp Leu Thr Glu Val Asp Asn Ser Leu Met Val Pro Ile His
305                 310                 315                 320
Trp Ala Thr Phe Arg Leu Ala Pro His Pro Trp Ser Glu Pro Ala Glu
                325                 330                 335
Arg Leu Leu Thr Ala Ala Asp Ala Glu Arg Val Arg Leu Thr Val Pro
            340                 345                 350
Ile Pro Gly Gln Arg Val Asp Pro Glu Ser Thr Phe Asp Pro Trp Trp
        355                 360                 365
Arg Phe
    370
```

<210> 195
<211> 650
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 195

```
gacacaccag caccactgtt aacctcgcta gatcagtcgg ccgaacggaa ggacagccgt      60
gaccctgaaa accctagtca ccagcatgac cgctggggca gcagcagccg caacactcgg     120
cgctgccgcc gtgggtgtga cctcgattgc cgtcggtgcg ggtgtcgccg gcgcgtcgcc     180
cgcggtgctg aacgcaccgc tgctttccgc ccctgccccc gatctgcagg gaccgctggt     240
ctccaccttg agcgcgctgt cgggcccggg ctccttcgcc ggcgccaagg ccacctacgt     300
ccagggcggt ctcggccgca tcgaggcccg ggtggccgac agcggataca gcaacgccgc     360
ggccaagggc tacttcccgc tgagcttcac cgtcgccggc atcgaccaga acggtccgat     420
cgtgaccgcc aacgtcaccg cggcggcccc gacgggcgcc gtggccaccc agccgctgac     480
```

gttcatcgcc gggccgagcc cgaccggatg gcagctgtcc aagcagtccg cactggccct 540
gatgtccgcg gtgggtgatc tcccgcacga ttctggtccg cagcgccgtc acatgtgtgg 600
cggcgctcgg gctgggtggg tgcctgggcg gctgcgcgca agatgaacat 650

<210> 196
<211> 159
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 196
Met Thr Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Gly Ala Ala Ala Val
1 5 10 15
Gly Val Thr Ser Ile Ala Val Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Ser Pro
20 25 30
Ala Val Leu Asn Ala Pro Leu Leu Ser Ala Pro Ala Pro Asp Leu Gln
35 40 45
Gly Pro Leu Val Ser Thr Leu Ser Ala Leu Ser Gly Pro Gly Ser Phe
50 55 60
Ala Gly Ala Lys Ala Thr Tyr Val Gln Gly Gly Leu Gly Arg Ile Glu
65 70 75 80
Ala Arg Val Ala Asp Ser Gly Tyr Ser Asn Ala Ala Ala Lys Gly Tyr
85 90 95
Phe Pro Leu Ser Phe Thr Val Ala Gly Ile Asp Gln Asn Gly Pro Ile
100 105 110
Val Thr Ala Asn Val Thr Ala Ala Ala Pro Thr Gly Ala Val Ala Thr
115 120 125
Gln Pro Leu Thr Phe Ile Ala Gly Pro Ser Pro Thr Gly Trp Gln Leu
130 135 140
Ser Lys Gln Ser Ala Leu Ala Leu Met Ser Ala Val Ile Ala Ala
145 150 155

<210> 197
<211> 285
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 197
Met Gln Val Arg Arg Val Leu Gly Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Val
1 5 10 15
Ser Ala Ala Leu Trp Gln Thr Gly Val Ser Ile Pro Thr Ala Ser Ala
20 25 30
Asp Pro Cys Pro Asp Ile Glu Val Ile Phe Ala Arg Gly Thr Gly Ala
35 40 45
Glu Pro Gly Leu Gly Trp Val Gly Asp Ala Phe Val Asn Ala Leu Arg
50 55 60
Pro Lys Val Gly Glu Gln Ser Val Gly Thr Tyr Ala Val Asn Tyr Pro
65 70 75 80
Ala Gly Phe Asp Phe Asp Lys Ser Ala Pro Met Gly Ala Ala Asp Ala
85 90 95
Ser Gly Arg Val Gln Trp Met Ala Asp Asn Cys Pro Asp Thr Lys Leu
100 105 110
Val Leu Gly Gly Met Ser Gln Gly Ala Gly Val Ile Asp Leu Ile Thr
115 120 125
Val Asp Pro Arg Pro Leu Gly Arg Phe Thr Pro Thr Pro Met Pro Pro
130 135 140
Arg Val Ala Asp His Val Ala Ala Val Val Val Phe Gly Asn Pro Leu
145 150 155 160

08.11.00

```
Arg Asp Ile Arg Gly Gly Gly Pro Leu Pro Gln Met Ser Gly Thr Tyr
                165                 170                 175
Gly Pro Lys Ser Ile Asp Leu Cys Ala Leu Asp Asp Pro Phe Cys Ser
            180                 185                 190
Pro Gly Phe Asn Leu Pro Ala His Phe Ala Tyr Ala Asp Asn Gly Met
        195                 200                 205
Val Glu Glu Ala Ala Asn Phe Ala Arg Leu Glu Pro Gly Gln Ser Val
    210                 215                 220
Glu Leu Pro Glu Ala Pro Tyr Leu His Leu Phe Val Pro Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240
Val Thr Leu Glu Asp Ala Gly Pro Leu Arg Glu Gly Asp Ala Val Arg
                245                 250                 255
Phe Thr Ala Ser Gly Gly Gln Arg Val Thr Ala Thr Ala Pro Ala Glu
            260                 265                 270
Ile Leu Val Trp Glu Met His Ala Gly Leu Gly Ala Ala
        275                 280                 285
```

<210> 198
<211> 743
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 198

```
ggatccgcgg caccggctgg tgacgaccaa gtacaacccg gcccgcacct ggacggccga      60
gaactccgtc ggcatcggcg gcgcgtacct gtgcatctac gggatggagg gccccggcgg     120
ctatcagttc gtcggccgca ccacccaggt gtggagtcgt taccgccaca cggcgccgtt     180
cgaacccgga agtccctggc tgctgcggtt tttcgaccga atttcgtggt atccggtgtc     240
ggccgaggag ctgctggaat tgcgagccga catggccgca ggccggggct cggtcgacat     300
caccgacggc gtgttctccc tcgccgagca cgaacggttc ctggccgaca acgccgacga     360
catcgccgcg ttccgttccc ggcaggcggc cgcgttctcc gccgagcgga ccgcgtgggc     420
ggccgccggc gagttcgacc gcgccgagaa agccgcgtcg aaggccaccg acgccgatac     480
cggggacctg gtgctctacg acggtgacga gcgggtcgac gctccgttcg cgtcgagcgt     540
gtggaaggtc gacgtcgccg tcggtgaccg ggtggtggcc ggacagccgt tgctggcgct     600
ggaggcgatg aagatggaga ccgtgctgcg cgccccggcc gacggggtgg tcacccagat     660
cctggtctcc gctgggcatc tcgtcgatcc cggcacccca ctggtcgtgg tcggcaccgg     720
agtgcgcgca tgagcgccgt cga                                             743
```

<210> 199
<211> 243
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 199

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

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

<210> 200
<211> 858
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 200

```
gaaatcccgc gtctgaaacc ctcttttcgc ggcgcccctc aggacggtaa gggggccaag      60
cggattgaaa aatgttcgct gaatgagcct gaaattgcgc gtggctcttg gaaatcagca     120
gcgatgggtt taccgtgtcc actagtcggt ccaaagagga ccactggttt tcggaggttt     180
tgcatgaaca aagcagagct catcgacgta ctcactgaga agctgggctc ggatcgtcgg     240
caagcgactg cggcggtgga gaacgttgtc gacaccatcg tgcgcgccgt gcacaagggt     300
gagagcgtca ccatcacggg cttcggtgtt ttcgagcagc gtcgtcgcgc agcacgcgtg     360
gcacgcaatc cgcgcaccgg cgagaccgtg aaggtcaagc ccacctcagt cccggcattc     420
cgtcccggcg ctcagttcaa ggctgttgtc tctggcgcac agaagcttcc ggccgagggt     480
ccggcggtca agcgcggtgt gaccgcgacg agcaccgccc gcaaggcagc caagaaggct     540
ccggccaaga aggctgccgc gaagaaggcc gcgccggcca agaaggctcc ggcgaagaag     600
gctgcgacca aggctgcacc ggccaagaag gccactgccg ccaagaaggc cgcgccggcc     660
aagaaggcca ctgccgccaa gaaggctgca ccggccaaga aggctccggc caagaaggct     720
gcgaccaagg ctgcaccggc caagaaggct ccggccaaga aggccgcgac caaggctgca     780
ccggccaaga aggctccggc cgccaagaag gcgcccgcca agaaggctcc ggccaagcgc     840
ggcggacgca agtaagtc                                                   858
```

<210> 201
<211> 223
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 201

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

```
                85                  90                  95
Ala Glu Gly Pro Ala Val Lys Arg Gly Val Thr Ala Thr Ser Thr Ala
            100                 105                 110
Arg Lys Ala Ala Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Lys Lys
        115                 120                 125
Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Thr Lys Ala
    130                 135                 140
Ala Pro Ala Lys Lys Ala Thr Ala Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys
145                 150                 155                 160
Lys Ala Thr Ala Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Pro Ala
                165                 170                 175
Lys Lys Ala Ala Thr Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Pro Ala Lys
            180                 185                 190
Lys Ala Ala Thr Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Pro Ala Ala Lys
        195                 200                 205
Lys Ala Pro Ala Lys Lys Ala Pro Ala Lys Arg Gly Gly Arg Lys
    210                 215                 220
```

<210> 202
<211> 570
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 202

```
agacagacag tgatcgacga aaccctcttc catgccgagg agaagatgga gaaggccgtc      60
tcggtggcac ccgacgacct ggcgtcgatt cgtaccggcc gcgcgaaccc cggcatgttc     120
aaccggatca acatcgacta ctacggcgcc tccaccccga tcacgcagct gtccagcatc     180
aacgtgcccg aggcgcgcat ggtggtgatc aagccctacg aggcgagcca gctgcgcctc     240
atcgaggatg cgatccgcaa ctccgacctc ggcgtcaatc cgaccaacga cggcaacatc     300
atccgggtgt cgatcccgca gctcaccgag gagcgccgcc gcgacctggt caagcaggcc     360
aaggccaagg gcgaggacgc caaggtgtcg gtgcgcaaca tccgtcgcaa ggcgatggag     420
gaactctccc ggatcaagaa ggacggcgac gccggcgaag accaagtgac ccgcgccgag     480
aaggatctcg acaagagcac ccaccagtac acgaatcaga tcgacgaact ggtcaagcac     540
aaggaaggcg agttgctgga ggtctgacca                                      570
```

<210> 203
<211> 187
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<220>
<221> NEJISTÉ
<222> (186)...(186)

<400> 203

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

```
Ile Ile Arg Val Ser Ile Pro Gln Leu Thr Glu Glu Arg Arg Arg Asp
            100                 105                 110
Leu Val Lys Gln Ala Lys Ala Lys Gly Glu Asp Ala Lys Val Ser Val
        115                 120                 125
Arg Asn Ile Arg Arg Lys Ala Met Glu Glu Leu Ser Arg Ile Lys Lys
    130                 135                 140
Asp Gly Asp Ala Gly Glu Asp Glu Val Thr Arg Ala Glu Lys Asp Leu
145                 150                 155                 160
Asp Lys Ser Thr His Gln Tyr Thr Asn Gln Ile Asp Glu Leu Val Lys
                165                 170                 175
His Lys Glu Gly Glu Leu Leu Glu Val Xaa Pro
            180                 185
```

<210> 204
<211> 1364
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 204

```
cgacctccac ccgggcgtga ggccaaccac taggctggtc accagtagtc gacggcacac      60
ttcaccgaaa aaatgaggac agaggagaca cccgtgacga tccgtgttgg tgtgaacggc     120
ttcggccgta tcggacgcaa cttcttccgc gcgctggacg cgcagaaggc cgaaggcaag     180
aacaaggaca tcgagatcgt cgcggtcaac gacctcaccg acaacgccac gctggcgcac     240
ctgctgaagt tcgactcgat cctgggccgg ctgccctacg acgtgagcct cgaaggcgag     300
gacaccatcg tcgtcggcag caccaagatc aaggcgctcg aggtcaagga aggcccggcg     360
gcgctgccct ggggcgacct gggcgtcgac gtcgtcgtcg agtccaccgg catcttcacc     420
aagcgcgaca aggcccaggg ccacctcgac gcgggcgcca agaaggtcat catctccgcg     480
ccggccaccg atgaggacat caccatcgtg ctcggcgtca acgacgacaa gtacgacggc     540
agccagaaca tcatctccaa cgcgtcgtgc accacgaact gcctcggccc gctggcgaag     600
gtcatcaacg acgagttcgg catcgtcaag ggcctgatga ccaccatcca cgcctacacc     660
caggtccaga acctgcagga cggcccgcac aaggatctgc gccgggcccg cgccgccgcg     720
ctgaacatcg tgccgacctc caccggtgcc gccaaggcca tcggactggt gctgcccgag     780
ctgaagggca agctcgacgg ctacgcgctg cgggtgccga tccccaccgg ctcggtcacc     840
gacctgaccg ccgagctggg caagtcggcc accgtggacg agatcaacgc cgcgatgaag     900
gctgcggccg agggcccgct caagggcatc ctcaagtact acgacgcccc gatcgtgtcc     960
agcgacatcg tcaccgatcc gcacagctcg atcttcgact cgggtctgac caaggtcatc    1020
gacaaccagg ccaaggtcgt gtcctggtac gacaacgagt ggggctactc caaccgcctc    1080
gtcgacctgg tcgccctggt cggcaagtcg ctgtaggggc gagcgaagcg acgggagaac    1140
agaggcgcca tggcgatcaa gtcactcgac gaccttctgt ccgaaggggt gacggggcgg    1200
ggcgtactcg tgcgctccga cctgaacgtc cccctcgacg gcgacacgat caccgacccg    1260
gggcgcatca tcgcctcggt gccgacgttg aaggcgttga gtgacgccgg cgccaaggtg    1320
gtcgtcaccg cgcatctggg caggcccaag ggtgagccgg atcc                     1364
```

<210> 205
<211> 340
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 205

```
Val Thr Ile Arg Val Gly Val Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Asn
 1               5                  10                  15
Phe Phe Arg Ala Leu Asp Ala Gln Lys Ala Glu Gly Lys Asn Lys Asp
            20                  25                  30
Ile Glu Ile Val Ala Val Asn Asp Leu Thr Asp Asn Ala Thr Leu Ala
        35                  40                  45
His Leu Leu Lys Phe Asp Ser Ile Leu Gly Arg Leu Pro Tyr Asp Val
    50                  55                  60
```

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

<210> 206
<211> 522
<212> DNA
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 206

```
acctacgagt tcgagaacaa ggtcacgggc ggccgcatcc cgcgcgagta catcccgtcg      60
gtggatgccg gcgcgcagga cgccatgcag tacggcgtgc tggccggcta cccgctggtt     120
aacgtcaagc tgacgctgct cgacggtgcc taccacgaag tcgactcgtc ggaaatggca     180
ttcaaggttg ccggctccca ggtcatgaag aaggctgccg cccaggcgca gccggtgatc     240
ctggagccag tgatggcggt cgaggtcacg acgcccgagg attacatggg tgaagtgagc     300
ggcgacctga actcccgccg tggtcagatc caggccatgg aggagcggag cggtgctcgt     360
gtcgtgaagg cgcaggttcc gctgtcggag atgttcggct acgtcggaga ccttcggtcg     420
aagacccagg gccgggccaa ctactccatg gtgttcgact cgtacgccga agttccggcg     480
aacgtgtcga aggagatcat cgcgaaggcg acgggccagt aa                        522
```

<210> 207
<211> 173
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 207

```
Thr Tyr Glu Phe Glu Asn Lys Val Thr Gly Gly Arg Ile Pro Arg Glu
 1               5                  10                  15
Tyr Ile Pro Ser Val Asp Ala Gly Ala Gln Asp Ala Met Gln Tyr Gly
            20                  25                  30
Val Leu Ala Gly Tyr Pro Leu Val Asn Val Lys Leu Thr Leu Leu Asp
        35                  40                  45
Gly Ala Tyr His Glu Val Asp Ser Ser Glu Met Ala Phe Lys Val Ala
    50                  55                  60
Gly Ser Gln Val Met Lys Lys Ala Ala Ala Gln Ala Gln Pro Val Ile
65                  70                  75                  80
Leu Glu Pro Val Met Ala Val Glu Val Thr Thr Pro Glu Asp Tyr Met
                85                  90                  95
Gly Glu Val Ile Gly Asp Leu Asn Ser Arg Arg Gly Gln Ile Gln Ala
            100                 105                 110
Met Glu Glu Arg Ser Gly Ala Arg Val Val Lys Ala Gln Val Pro Leu
        115                 120                 125
Ser Glu Met Phe Gly Tyr Val Gly Asp Leu Arg Ser Lys Thr Gln Gly
    130                 135                 140
Arg Ala Asn Tyr Ser Met Val Phe Asp Ser Tyr Ala Glu Val Pro Ala
145                 150                 155                 160
Asn Val Ser Lys Glu Ile Ile Ala Lys Ala Thr Gly Gln
                165                 170
```

<210> 208
<211> 12
<212> PRT
<213> Mycobacterium vaccae

<400> 208

```
Ala Leu Pro Gln Leu Thr Asp Glu Gln Arg Ala Ala
 1               5                  10
```