



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0013262
(43) 공개일자 2016년02월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/35 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/04 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/35 (2013.01)
A61K 38/164 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7001375(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년07월24일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2011-7004475
원출원일자(국제) 2009년07월24일
심사청구일자 2014년07월24일
- (85) 번역문제출일자 2016년01월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2009/059586
- (87) 국제공개번호 WO 2010/010180
국제공개일자 2010년01월28일
- (30) 우선권주장
61/083,692 2008년07월25일 미국(US)

- (71) 출원인
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89
글락소 그룹 리미티드
영국 티더블유8 9지에스 미들섹스 브렌트포드 그
레이트 웨스트 로드 980
- (72) 발명자
브라운, 제임스
미국 19426 펜실베니아 칼리지빌 피.오. 박스
5089 에스. 칼리지빌 로드 1250 글락소스미스클
라인
메텐스, 파스칼
벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
머피, 데니스
미국 19426 펜실베니아 칼리지빌 피.오. 박스
5089 에스. 칼리지빌 로드 1250 글락소스미스클
라인 (내)
- (74) 대리인
특허법인 남앤드남

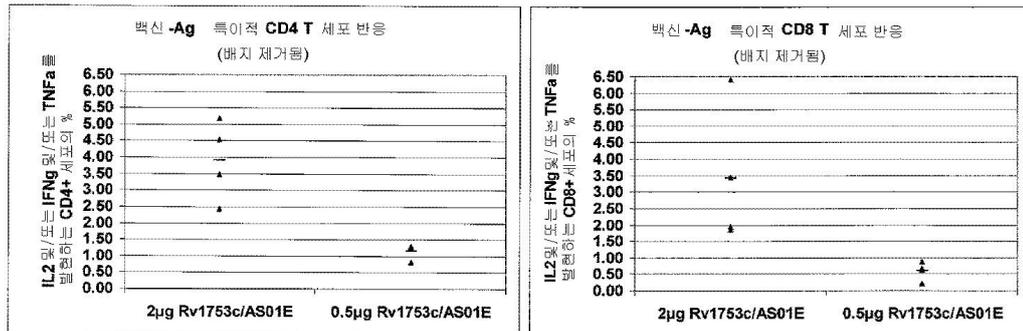
전체 청구항 수 : 총 103 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 관련 폴리뉴클레오티드, 융합 단백질 및 결합을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/04 (2013.01)

C07H 21/04 (2013.01)

G01N 33/569 (2013.01)

A61K 2039/53 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

A61K 2039/55572 (2013.01)

A61K 2039/55577 (2013.01)

G01N 2333/35 (2013.01)

G01N 2800/12 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 약제로 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 4

제 3항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열로 구성된 폴리펩티드.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열의 변이체를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 6

제 5항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열에 대해 70% 이상의 동일성을 갖는 Rv1753c 단백질 서열의 변이체를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 7

제 6항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열에 대해 90% 이상의 동일성을 갖는 Rv1753c 단백질 서열의 변이체를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 8

제 7항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열에 대해 95% 이상의 동일성을 갖는 Rv1753c 단백질 서열의 변이체를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 9

제 5항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열의 변이체로 구성된 폴리펩티드.

청구항 10

제 9항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열에 대해 70% 이상의 동일성을 갖는 Rv1753c 단백질 서열의 변이체로 구성된 폴리펩티드.

청구항 11

제 10항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열에 대해 90% 이상의 동일성을 갖는 Rv1753c 단백질 서열의 변이체로 구성된 폴리펩티드.

청구항 12

제 11항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열에 대해 95% 이상의 동일성을 갖는 Rv1753c 단백질 서열의 변이체로 구성된 폴리펩티드.

청구항 13

제 1항 또는 제 2항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 14

제 13항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열로부터의 10개 이상의 아미노산 잔기의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 15

제 14항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열로부터의 20개 이상의 아미노산 잔기의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 16

제 15항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열로부터의 50개 이상의 아미노산 잔기의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 17

제 13항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편으로 구성된 폴리펩티드.

청구항 18

제 17항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열로부터의 10개 이상의 아미노산 잔기의 면역원성 단편으로 구성된 폴리펩티드.

청구항 19

제 18항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열로부터의 20개 이상의 아미노산 잔기의 면역원성 단편으로 구성된 폴리펩티드.

청구항 20

제 19항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열로부터의 50개 이상의 아미노산 잔기의 면역원성 단편으로 구성된 폴리펩티드.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열이 *미코박테리움 투베르쿨로시스* (*Mycobacterium tuberculosis*)로부터의 서열인 폴리펩티드.

청구항 22

제 21항에 있어서, Rv1753c 단백질이 서열 목록 번호:1의 서열을 갖는 폴리펩티드.

청구항 23

제 1항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 있어서, 결핵의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 24

제 23항에 있어서, 결핵의 치료에 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 25

제 23항에 있어서, 결핵의 예방에 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 26

제 23항에 있어서, 잠복성 결핵의 치료에 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 27

제 23항에 있어서, 잠복성 결핵의 예방에 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 28

제 23항에 있어서, 결핵의 재활성화를 예방하는데 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 29

제 23항에 있어서, 결핵의 재활성화를 지연시키는데 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 30

제 23항 내지 제 29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵이 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 감염과 연관된 폴리펩티드.

청구항 31

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 32

제 31항에 있어서, 약제로 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드.

청구항 33

제 31항 또는 제 32항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 34

제 31항 또는 제 32항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열의 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 35

제 34항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열에 대해 70% 이상의 동일성을 갖는 Rv1753c 단백질 서열의 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 36

제 31항 또는 제 32항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 37

제 36항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열로부터의 10개 이상의 아미노산 잔기의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 38

제 31항 내지 제 37항 중 어느 한 항에 있어서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편으로 구성된 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 39

제 38항에 있어서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편으로 구성된 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열로 구성된 폴리뉴클레오티드.

청구항 40

제 31항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, Rv1753c 단백질 서열이 미코박테리움 투베르쿨로시스로부터의 서열인 폴리뉴클레오티드.

청구항 41

제 40항에 있어서, 상기 Rv1753c 단백질이 서열 목록 번호:1의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드.

청구항 42

제 41항에 있어서, 서열 목록 번호:2의 서열 또는 이의 단편을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 43

제 31항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서, 결핵의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드.

청구항 44

제 43항에 있어서, 결핵의 치료에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드.

청구항 45

제 43항에 있어서, 결핵의 예방에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드.

청구항 46

제 43항에 있어서, 잠복성 결핵의 치료에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드.

청구항 47

제 43항에 있어서, 잠복성 결핵의 예방에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드.

청구항 48

제 43항에 있어서, 결핵의 재활성화의 예방에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드.

청구항 49

제 43항에 있어서, 결핵의 재활성화의 지연에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드.

청구항 50

제 43항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵이 미코박테리움 투베르쿨로시스 감염과 연관된 폴리뉴클레오티드.

청구항 51

(a) (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편; 또는 상기 (a)의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 (c) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 52

(a) (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편; 또는 상기 (a)의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 (c) 비특이적 면역 반응 증강제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 53

제 52항에 있어서, 상기 비특이적 면역 반응 증강제가 애쥬번트인 면역원성 조성물.

청구항 54

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단

편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 55

제 54항에 따른 발현 벡터로 형질전환된 분리된 숙주 세포.

청구항 56

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 재조합적으로 발현하는 분리된 숙주 세포.

청구항 57

제 56항에 있어서, *E. 콜리*(*E. coli*), 효모 및 포유동물 세포로부터 선택된 분리된 숙주 세포.

청구항 58

제 56항에 있어서, *바실러스 칼메트-구에린*(*Bacillus Calmette-Guerin*)인 분리된 숙주 세포.

청구항 59

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드의 생성을 위한 방법으로서, 상기 방법이 숙주 세포 내에서 상기 폴리펩티드를 재조합적으로 발현시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 60

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 안전하고 유효한 양의 폴리펩티드를 결핵을 치료하거나 예방할 필요가 있는 피검체에 투여하는 것을 포함하여 결핵을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 폴리펩티드가 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 61

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 안전하고 유효한 양의 폴리뉴클레오티드를 결핵을 치료하거나 예방할 필요가 있는 피검체에 투여하는 것을 포함하여 결핵을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 폴리뉴클레오티드가 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 62

제 60항 또는 제 61항에 있어서, 상기 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 약학적 조성물로 투여되는 방법.

청구항 63

제 60항 또는 제 61항에 있어서, 상기 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 면역원성 조성물로 투여되는 방법.

청구항 64

제 60항 내지 제 63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피검체가 포유동물인 방법.

청구항 65

제 64항에 있어서, 상기 피검체가 인간인 방법.

청구항 66

제 60항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피검체가 활동성 결핵을 갖는 방법.

청구항 67

제 60항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피검체가 잠복성 결핵을 갖는 방법.

청구항 68

제 60항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피검체가 결핵을 갖지 않는 방법.

청구항 69

제 60항 내지 제 68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피검체가 *바실러스 칼메트-구에린*(BCG)으로 이전에 면역화된 방법.

청구항 70

제 60항 내지 제 69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rv1753c 단백질 서열이 *미코박테리움 투베르쿨로시스*로부터의 서열인 방법.

청구항 71

제 70항에 있어서, 상기 Rv1753c 단백질이 서열 목록 번호:1의 서열을 갖는 방법.

청구항 72

제 60항 내지 제 71항 중 어느 한 항에 있어서, 결핵을 치료하는데 효과적인 하나 이상의 화학요법제의 투여를 추가로 포함하는 방법.

청구항 73

제 72항에 있어서, 상기 하나 이상의 화학요법제가 이소니아지드(isoniazid) 및 리팜핀(rifampin)으로부터 선택되는 방법.

청구항 74

제 60항 내지 제 73항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 항원의 투여를 추가로 포함하는 방법.

청구항 75

제 74항에 있어서, 상기 추가 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 항원이 폴리펩티드의 형태로 제공되는 방법.

청구항 76

제 75항에 있어서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 상기 폴리펩티드, 및 추가의 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 항원이 융합 단백질의 형태로 제공되는 방법.

청구항 77

제 74항에 있어서, 상기 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 항원이 폴리뉴클레오티드의 형태로 제공되는 방법.

청구항 78

제 77항에 있어서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 상기 폴리뉴클레오티드, 및 추가의 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 항원이 단일한 폴리뉴클레오티드 서열의 형태로 제공되는 방법.

청구항 79

제 78항에 있어서, 상기 단일한 폴리뉴클레오티드 서열이 Rv1753c 항원 및 추가의 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 항원을 함유하는 융합 단백질을 엔코딩하는 방법.

청구항 80

제 74항에 있어서, 상기 추가의 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 항원이 *바실러스 칼메트-구에린*(BCG)의 형태로 제

공되는 방법.

청구항 81

제 60항 내지 제 80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵의 치료 또는 예방이 결핵의 치료를 의미하는 방법.

청구항 82

제 60항 내지 제 80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵의 치료 또는 예방이 결핵의 예방을 의미하는 방법.

청구항 83

제 60항 내지 제 80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵의 치료 또는 예방이 잠복성 결핵의 치료를 의미하는 방법.

청구항 84

제 60항 내지 제 80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵의 치료 또는 예방이 잠복성 결핵의 예방을 의미하는 방법.

청구항 85

제 60항 내지 제 80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵의 치료 또는 예방이 결핵의 재활성화의 예방을 의미하는 방법.

청구항 86

제 60항 내지 제 80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵의 치료 또는 예방이 결핵의 재활성화의 지연을 의미하는 방법.

청구항 87

제 60항 내지 제 86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결핵이 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 감염과 관련된 방법.

청구항 88

제 87항에 있어서, 상기 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 감염이 *미코박테리움 투베르쿨로시스*의 다약 내성 균주와 관련된 방법.

청구항 89

제 60항 내지 제 88항 중 어느 한 항에 있어서, *M. 투베르쿨로시스* 감염에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 90

결핵을 치료하거나 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드의 용도.

청구항 91

결핵을 치료하거나 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 용도.

청구항 92

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질.

청구항 93

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단

편을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 94

중간 정도로 엄격한 조건하에서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 제 2 뉴클레오티드 서열의 상보체에 특이적으로 하이브리드화되는 제 1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 95

제 94항에 있어서, 매우 엄격한 조건하에서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 제 2 뉴클레오티드 서열의 상보체에 선택적으로 하이브리드화되는 제 1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 96

제 94항 또는 제 95항에 있어서, 서열 목록 번호:2의 상보체에 선택적으로 하이브리드화되는 제 1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 97

(i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 서열의 번역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편.

청구항 98

(a) 제 1항에 따른 폴리펩티드; (b) 상기 폴리펩티드와 개체로부터의 샘플(예를 들어, 전체 혈액 또는 더욱 적합하게는 PBMC)을 접촉시키기에 충분한 장치; 및 (c) 샘플의 T 세포 반응을 정량하는 수단을 포함하는 진단 키트.

청구항 99

제 98항에 있어서, (a) 제 1항에 따른 폴리펩티드; (b) 상기 폴리펩티드와 개체로부터의 샘플(예를 들어, 전체 혈액 또는 더욱 적합하게는 PBMC)을 접촉시키기에 충분한 장치; 및 (c) 샘플의 T 세포 반응을 정량하고, 특성구명하는 수단을 포함하는 진단 키트.

청구항 100

(a) 제 1항에 따른 폴리펩티드; (b) 상기 폴리펩티드와 개체로부터의 샘플(예를 들어, 전체 혈액 또는 더욱 적합하게는 PBMC)을 접촉시키기에 충분한 장치; 및 (c) 샘플의 B 세포 반응을 정량하는 수단을 포함하는 진단 키트.

청구항 101

(a) 제 1항에 따른 폴리펩티드; 및 (b) 상기 폴리펩티드와 환자의 피부 세포를 접촉시키기에 충분한 장치를 포함하는 진단 키트.

청구항 102

(a) 제 1항에 따른 폴리펩티드; 및 (c) 개체로부터의 샘플(예를 들어, 전체 혈액 또는 더욱 적합하게는 PBMC)에서 T 세포 반응을 정량하는 수단을 포함하는 진단 키트.

청구항 103

(a) 제 1항에 따른 폴리펩티드; 및 (c) 개체로부터의 샘플(예를 들어, 전체 혈액 또는 더욱 적합하게는 PBMC)에서 B 세포 반응을 정량하는 수단을 포함하는 진단 키트.

발명의 설명

기술분야

발명의 분야

본 발명은 결핵의 치료 또는 예방, 특히 잠복 결핵의 치료 또는 예방 및 결핵의 재활성화의 예방 또는 지연에 사용하기 위한 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드(및 또한 관련 방법)에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 상기 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학적 및 면역원성 조성물, 및 결핵(특히, 잠복 결핵)의 진단을 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

발명의 배경

결핵(TB)은 *미코박테리움 투베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)* 및 다른 *미코박테리움* 종의 감염에 의해 야기되는 만성 감염 질병이다. 이는 개발 도상국에서 주요 질병이며, 또한 전세계의 개발 지역에서도 증가하고 있는 문제이다. 20억명 이상의 사람이 TB 바실러스에 감염되어 있는 것으로 생각되고, 약 920만명의 신규한 TB 환자 및 170만명의 사망자가 매년 발생하고 있다. TB 바실러스에 감염된 환자 중 10%가 활성 TB로 발달할 것이며, 활성 TB 감염을 가진 각각의 환자는 해마다 평균적으로 10 내지 15명의 다른 사람을 감염시킨다. 1년 발병률은 세계적으로 최고도에 이르고 있으며, 인구 성장으로 인해 사망자 및 환자의 수도 여전히 증가하고 있다 (World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2008).

*미코박테리움 투베르쿨로시스*는 호흡기 경로를 통해 개체를 감염시킨다. 폐포 대식세포는 박테리아를 삼켜버리거나, 산성 리소좀과의 포식소체 융합을 억제함으로써 생존하고 증식할 수 있다. CD4+ 및 CD8+ T 세포를 수반하는 복합 면역 반응이 계속하여 발생하고, 궁극적으로 육아종을 형성시킨다. 병원체로서의 *미코박테리움 투베르쿨로시스*의 성공의 중심은 분리되었으나 근절되지 않은 박테리아가 장기간 동안 지속하여, 개체가 활성 TB가 이후에 발달하기 쉽도록 하는 여지를 남겨 놓는다는 사실이다.

감염된 개체의 5% 미만이 감염 후 첫번째 해에 활성 TB로 발달한다. 육아종은 수십년간 지속될 수 있고, 산소 및 영양소의 결핍 시에 휴면 상태의 생(生) *미코박테리움 투베르쿨로시스*를 함유하는 것으로 생각된다. 그러나, 최근에 휴면 상태의 박테리아 대부분이 신체 전체에 걸쳐 분포하는 비-대식세포 유형에 위치하는 것이 암시되었다(Locht et al, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007 7(11): 1665-1677). 활성 TB의 발달은, 예를 들어, 면역억제 사건의 결과로서 숙주의 자연면역과 병원체 사이의 균형이 변화하는 경우에 발생한다(Anderson P *Trends in Microbiology* 2007 15(1):7-13; Ehlers S *Infection* 2009 37(2):87-95).

잠복 TB와 활성 TB 사이의 균형을 기재하는 동태적 가설이 또한 제안되었다(Cardana P-J *Inflammation & Allergy- Drug Targets* 2006 6:27-39; Cardana P-J *Infection* 2009 37(2):80-86).

감염은 상당한 기간 동안 무증상일 수 있으나, 활성 질병은 가장 흔하게는 폐의 급성 염증으로 나타나며, 이는 피로, 체중 감소, 열 및 지속적인 기침을 발생시킨다. 치료되지 않는 경우, 심각한 합병증 및 사망이 통상적으로 발생한다.

결핵은 일반적으로 연장된 항생제 요법을 이용하여 조절될 수 있으나, 이러한 치료는 질병의 확산을 방지하기에는 충분하지 않다. 감염된 개체는 무증상일 수 있으나, 일부 기간 동안 전염성이다. 또한, 치료 요법과의 순응이 중요하나, 환자의 거동을 모니터링하기는 어렵다. 일부 환자는 치료 과정을 완료하지 않으며, 이는 비효과적인 치료 및 약물 내성의 발달을 야기할 수 있다.

다약 내성 TB(MDR-TB)는 일차 약물치료에 반응하는데 실패한 형태이다. 모든 TB 환자의 5%는 MDR-TB이고, 490,000명의 새로운 추정 MDR-TB 환자가 매년 발생한다. 이차 약물치료에 대한 내성이 MDR-TB의 최고점에서 발달하는 경우에 광범위 약물 내성 TB(XDR-TB)이 발생한다. 실제로 치료불가능한 XDR-TB의 40,000명의 새로운 환자가 해마다 발생하는 것으로 추정된다(World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2008).

항생제 치료의 모든 과정이 완료되는 경우에도, M. 투베르쿨로시스 감염이 감염된 개체로부터 근절되지 않을 수 있고, 재활성화될 수 있는 잠복 감염으로 남아 있을 수 있다.

결핵의 확산을 제어하기 위해, 효과적인 백신접종 및 질병의 정확한 초기 진단이 가장 중요하다.

잠복 TB 감염의 진단은 통상적으로 투베르쿨린 단백질 정제 유도체(PPD)에 대한 피내 노출을 포함하는 투베르쿨린 피부 시험을 이용하여 달성된다. 항원 특이적 T 세포 반응은 주사 후 48-72시간까지 주사 부위에서 측정가

능한 경화를 발생시키고, 이는 미코박테리아 항원에 대한 노출을 나타낸다. 그러나, 상기 시험에서 민감성 및 특이성 문제가 있고, BCG로 백신접종된 개체는 항상 감염된 개체와 용이하게 구별할 수는 없다(이는 BCG가 잠복 감염에 대해 보호하지 않는다는 사실에 비추어 특히 중요하다). 일반적으로, BCG를 투여받았으나 *M. 투베르쿨로시스*에 의해 감염되지 않은 개체는 10 mm 미만의 직경의 PPD 반응을 나타내는 반면, 10 mm 직경을 초과하는 PPD 반응을 갖는 사람은 *M. 투베르쿨로시스*에 의해 감염된 것으로 간주된다. 그러나, 이러한 규정은 10 mm 미만의 직경의 PPD 반응을 일으킬 수 있는 HIV 감염으로 인한 면역억제를 갖는 개체에 적용가능하지 않거나, 풍토적인 지역에서, 비-결핵 미코박테리아에 감염된 환자는 10 mm를 초과하는 직경의 PPD 반응을 나타낼 수 있다.

[0014]

최근 수년 동안의 진보로 인터페론-감마 방출을 기초로 하고, PPD 보다 *M. 투베르쿨로시스*에 더욱 특이적인 항원, 즉 ESAT-6 및 CFP-10을 이용하는 시험관내 T 세포 기반 검정이 개발되었다. 이러한 높은 특이성의 시험은 적어도 투베르쿨린 피부 시험 만큼 민감한 것으로 보이고, BCG 백신접종으로 인해 교차반응성이 덜한 것으로 입증되었다. 잠복 TB 진단의 최근의 개관을 위해 문헌[Pai M et al *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006 6(3):413-422]를 참조하라. 그러나, ESAT-6/CFP-10은 초기 단계 항원이므로, ESAT-6/CFP-10을 기반으로 하는 검정은 최근에 감염된 사람에서만 최적으로 수행될 수 있다. 결과적으로, 잠복 결핵과 특이적으로 관련된 신규한 항원의 확인이 장기간의 잠복 감염을 검출할 수 있는 보다 민감한 검정의 개발을 도울 수 있다.

[0015]

결핵의 치료 및 예방, 특히 잠복 TB의 치료 및 예방 및 TB의 재활성화의 예방을 위한 효과적인 방법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0016]

발명의 개요

[0017]

본 발명은 일반적으로 TB 항원(특히, 잠복 TB와 관련된 항원)으로서 Rv1753c의 확인, 및 TB의 예방 및 치료, 특히 잠복 TB의 예방 및 치료 및 TB 재활성화의 예방 또는 지연에서의 관련 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0018]

본 발명은, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0019]

본 발명은 또한 약제로서 사용하기 위한, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0020]

본 발명의 추가 양태는, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 안전하고 유효한 양의 폴리펩티드를 TB를 치료하거나 예방하는 것을 필요로 하는 피검체에 투여하는 것을 포함하여 TB를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 면역 반응, 특히 *미코박테리움 투베르쿨로시스*에 대한 면역 반응을 유도한다.

[0021]

TB를 치료하거나 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드의 용도가 본 발명의 또 다른 양태이다.

[0022]

본 발명은, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0023]

약제로서 사용하기 위한, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 또한 제공된다.

[0024]

본 발명의 한 추가 양태는, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 안전하고 효과적인 양의 폴리뉴클레오티드를 TB를 치료하거나 예방하는 것을 필요로 하는 피검체에 투여하는 것을 포함하여 TB를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 면역 반응, 특히 *미코박테리움 투베르쿨로시스*에 대한 면역 반응을 유도한다.

[0025]

TB를 치료하거나 예방하기 위한 약제의 제조에 있어서, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의

변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 용도가 본 발명의 또 다른 양태이다.

[0026] 추가로, (a) (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편; 또는 상기 (a)의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 (c) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0027] 또한, (a) (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편; 또는 상기 (a)의 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 (c) 비특이적 면역 반응 향상제를 포함하는 면역원성 조성물이 제공된다.

[0028] (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터가 또한 제공된다.

[0029] 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 본 발명의 추가 양태를 형성한다. (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드를 재조합적으로 발현하는 숙주 세포가 추가로 제공된다.

[0030] 또한, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드의 생성을 위한 방법이 제공되며; 상기 방법은 숙주 세포 내에서 상기 폴리펩티드를 재조합적으로 발현시키는 단계를 포함한다.

[0031] (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원성 단편을 포함하는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이 추가로 제공된다.

[0032] 진단에서의 상기 항체의 용도가 또한 제공된다(예를 들어, 시험 피검체로부터의 생물학적 샘플에서 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편의 존재를 결정하는 것을 포함하는 결핵 진단 방법).

[0033] (a) 본 발명의 폴리펩티드; (b) 상기 폴리펩티드와 개체로부터의 샘플(예를 들어, 전체 혈액 또는 더욱 적합하게는 PBMC)을 접촉시키기에 충분한 장치; 및 (c) 샘플의 T 세포 반응을 정량하는 수단을 포함하는 진단 키트가 또한 제공된다.

[0034] 본 발명의 또 다른 양태는, (a) 본 발명의 폴리펩티드; 및 (b) 상기 폴리펩티드와 환자의 피부 세포를 접촉시키기에 충분한 장치를 포함하는 진단 키트에 관한 것이다.

[0035] 한 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 조성물을 투여받는 피검체는 활성 결핵(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 활성 감염)을 가질 수 있다. 두번째 구체예에서, 피검체는 잠복 결핵(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 휴면 감염)을 가질 수 있다. 세번째 구체예에서, 피검체는 결핵에 걸려 있지 않을 수 있다(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의해 감염되지 않음).

[0036] 본 발명의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 조성물을 투여받는 피검체는 바실러스 칼메트-구에린(*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG) 백신접종과 같이 결핵에 대해 이전에 백신접종(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스* 감염에 대해 백신접종됨)된 피검체일 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 조성물을 투여받는 피검체는 바실러스 칼메트-구에린(BCG) 백신접종을 받지 않은 것과 같이 결핵에 대해 이전에 백신접종되지 않은(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스* 감염에 대해 백신접종되지 않음) 피검체일 수 있다.

[0037] **나열된 서열의 설명**

[0038] 서열 목록 번호 1: *M. 투베르쿨로시스* H37Rv 균주로부터의 Rv1753c의 폴리펩티드 서열.

[0039] 서열 목록 번호 2: *M. 투베르쿨로시스* H37Rv 균주로부터의 Rv1753c의 폴리뉴클레오티드 서열.

[0040] 서열 목록 번호 3: *M. 투베르쿨로시스* CDC1551 균주로부터의 Rv1753c의 폴리펩티드 서열.

[0041] 서열 목록 번호 4: *M. 투베르쿨로시스* F11 균주로부터의 Rv1753c의 폴리펩티드 서열.

[0042] 서열 목록 번호 5: *M. 투베르쿨로시스* 할렘 A(Haarlem A) 균주로부터의 Rv1753c의 폴리펩티드 서열.

[0043] 서열 목록 번호 6: *M. 투베르쿨로시스* C 균주로부터의 Rv1753c의 폴리펩티드 서열.

[0044] 서열 목록 번호 7: BCG로부터의 Rv1753c의 폴리펩티드 서열.

- [0045] 서열 목록 번호 8: Mtb8.4의 폴리펩티드 서열.
- [0046] 서열 목록 번호 9: Mtb9.8의 폴리펩티드 서열.
- [0047] 서열 목록 번호 10: Mtb9.9의 폴리펩티드 서열.
- [0048] 서열 목록 번호 11: Ra12의 폴리펩티드 서열.
- [0049] 서열 목록 번호 12: Ra35의 폴리펩티드 서열.
- [0050] 서열 목록 번호 13: TbH9의 폴리펩티드 서열.
- [0051] 서열 목록 번호 14: Mtb40의 폴리펩티드 서열.
- [0052] 서열 목록 번호 15: Mtb41의 폴리펩티드 서열.
- [0053] 서열 목록 번호 16: ESAT-6의 폴리펩티드 서열.
- [0054] 서열 목록 번호 17: Ag85A의 폴리펩티드 서열.
- [0055] 서열 목록 번호 18: Ag85B의 폴리펩티드 서열.
- [0056] 서열 목록 번호 19: 알파-크리스탈린의 폴리펩티드 서열.
- [0057] 서열 목록 번호 20: MPT64의 폴리펩티드 서열.
- [0058] 서열 목록 번호 21: Mtb32A의 폴리펩티드 서열.
- [0059] 서열 목록 번호 22: Ser/Ala 돌연변이 성숙 Mtb32A의 폴리펩티드 서열.
- [0060] 서열 목록 번호 23: TB10.4의 폴리펩티드 서열.
- [0061] 서열 목록 번호 24: Mtb72f의 폴리펩티드 서열.
- [0062] 서열 목록 번호 25: M72의 폴리펩티드 서열.
- [0063] 서열 목록 번호 26: Mtb71f의 폴리펩티드 서열.
- [0064] 서열 목록 번호 27: M92 융합체의 폴리펩티드 서열.
- [0065] 서열 목록 번호 28: M103 융합체의 폴리펩티드 서열.
- [0066] 서열 목록 번호 29: M114 융합체의 폴리펩티드 서열.
- [0067] 서열 목록 번호 30: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 1.
- [0068] 서열 목록 번호 31: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 2.
- [0069] 서열 목록 번호 32: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 3.
- [0070] 서열 목록 번호 33: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 4.
- [0071] 서열 목록 번호 34: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 5.
- [0072] 서열 목록 번호 35: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 6.
- [0073] 서열 목록 번호 36: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 7.
- [0074] 서열 목록 번호 37: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 8.
- [0075] 서열 목록 번호 38: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 9.
- [0076] 서열 목록 번호 39: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 10.
- [0077] 서열 목록 번호 40: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 11.
- [0078] 서열 목록 번호 41: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 12.
- [0079] 서열 목록 번호 42: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 13.
- [0080] 서열 목록 번호 43: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 14.

- [0081] 서열 목록 번호 44: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 15.
- [0082] 서열 목록 번호 45: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 16.
- [0083] 서열 목록 번호 46: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 17.
- [0084] 서열 목록 번호 47: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 18.
- [0085] 서열 목록 번호 48: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 19.
- [0086] 서열 목록 번호 49: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 20.
- [0087] 서열 목록 번호 50: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 21.
- [0088] 서열 목록 번호 51: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 22.
- [0089] 서열 목록 번호 52: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 23.
- [0090] 서열 목록 번호 53: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 24.
- [0091] 서열 목록 번호 54: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 25.
- [0092] 서열 목록 번호 55: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 26.
- [0093] 서열 목록 번호 56: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 27.
- [0094] 서열 목록 번호 57: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 28.
- [0095] 서열 목록 번호 58: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 29.
- [0096] 서열 목록 번호 59: 추정 인간 CD4 세포 에피토프 30.
- [0097] 서열 목록 번호 60: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 1.
- [0098] 서열 목록 번호 61: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 2.
- [0099] 서열 목록 번호 62: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 3.
- [0100] 서열 목록 번호 63: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 4.
- [0101] 서열 목록 번호 64: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 5.
- [0102] 서열 목록 번호 65: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 6.
- [0103] 서열 목록 번호 66: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 7.
- [0104] 서열 목록 번호 67: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 8.
- [0105] 서열 목록 번호 68: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 9.
- [0106] 서열 목록 번호 69: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 10.
- [0107] 서열 목록 번호 70: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 11.
- [0108] 서열 목록 번호 71: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 12.
- [0109] 서열 목록 번호 72: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 13.
- [0110] 서열 목록 번호 73: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 14.
- [0111] 서열 목록 번호 74: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 15.
- [0112] 서열 목록 번호 75: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 16.
- [0113] 서열 목록 번호 76: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 17.
- [0114] 서열 목록 번호 77: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 18.
- [0115] 서열 목록 번호 78: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 19.
- [0116] 서열 목록 번호 79: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 20.

- [0117] 서열 목록 번호 80: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 21.
- [0118] 서열 목록 번호 81: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 22.
- [0119] 서열 목록 번호 82: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 23.
- [0120] 서열 목록 번호 83: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 24.
- [0121] 서열 목록 번호 84: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 25.
- [0122] 서열 목록 번호 85: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 26.
- [0123] 서열 목록 번호 86: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 27.
- [0124] 서열 목록 번호 87: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 28.
- [0125] 서열 목록 번호 88: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 29.
- [0126] 서열 목록 번호 89: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 30.
- [0127] 서열 목록 번호 90: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 31.
- [0128] 서열 목록 번호 91: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 32.
- [0129] 서열 목록 번호 92: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 33.
- [0130] 서열 목록 번호 93: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 34.
- [0131] 서열 목록 번호 94: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 35.
- [0132] 서열 목록 번호 95: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 36.
- [0133] 서열 목록 번호 96: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 37.
- [0134] 서열 목록 번호 97: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 38.
- [0135] 서열 목록 번호 98: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 39.
- [0136] 서열 목록 번호 99: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 40.
- [0137] 서열 목록 번호 100: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 41.
- [0138] 서열 목록 번호 101: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 42.
- [0139] 서열 목록 번호 102: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 43.
- [0140] 서열 목록 번호 103: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 44.
- [0141] 서열 목록 번호 104: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 45.
- [0142] 서열 목록 번호 105: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 46.
- [0143] 서열 목록 번호 106: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 47.
- [0144] 서열 목록 번호 107: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 48.
- [0145] 서열 목록 번호 108: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 49.
- [0146] 서열 목록 번호 109: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 50.
- [0147] 서열 목록 번호 110: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 51.
- [0148] 서열 목록 번호 111: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 52.
- [0149] 서열 목록 번호 112: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 53.
- [0150] 서열 목록 번호 113: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 54.
- [0151] 서열 목록 번호 114: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 55.
- [0152] 서열 목록 번호 115: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 56.

- [0153] 서열 목록 번호 116: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 57.
- [0154] 서열 목록 번호 117: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 58.
- [0155] 서열 목록 번호 118: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 59.
- [0156] 서열 목록 번호 119: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 60.
- [0157] 서열 목록 번호 120: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 61.
- [0158] 서열 목록 번호 121: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 62.
- [0159] 서열 목록 번호 122: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 63.
- [0160] 서열 목록 번호 123: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 64.
- [0161] 서열 목록 번호 124: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 65.
- [0162] 서열 목록 번호 125: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 66.
- [0163] 서열 목록 번호 126: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 67.
- [0164] 서열 목록 번호 127: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 68.
- [0165] 서열 목록 번호 128: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 69.
- [0166] 서열 목록 번호 129: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 70.
- [0167] 서열 목록 번호 130: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 71.
- [0168] 서열 목록 번호 131: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 72.
- [0169] 서열 목록 번호 132: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 73.
- [0170] 서열 목록 번호 133: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 74.
- [0171] 서열 목록 번호 134: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 75.
- [0172] 서열 목록 번호 135: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 76.
- [0173] 서열 목록 번호 136: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 77.
- [0174] 서열 목록 번호 137: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 78.
- [0175] 서열 목록 번호 138: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 79.
- [0176] 서열 목록 번호 139: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 80.
- [0177] 서열 목록 번호 140: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 81.
- [0178] 서열 목록 번호 141: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 82.
- [0179] 서열 목록 번호 142: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 83.
- [0180] 서열 목록 번호 143: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 84.
- [0181] 서열 목록 번호 144: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 85.
- [0182] 서열 목록 번호 145: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 86.
- [0183] 서열 목록 번호 146: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 87.
- [0184] 서열 목록 번호 147: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 88.
- [0185] 서열 목록 번호 148: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 89.
- [0186] 서열 목록 번호 149: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 90.
- [0187] 서열 목록 번호 150: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 91.
- [0188] 서열 목록 번호 151: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 92.

- [0189] 서열 목록 번호 152: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 93.
- [0190] 서열 목록 번호 153: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 94.
- [0191] 서열 목록 번호 154: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 95.
- [0192] 서열 목록 번호 155: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 96.
- [0193] 서열 목록 번호 156: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 97.
- [0194] 서열 목록 번호 157: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 98.
- [0195] 서열 목록 번호 158: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 99.
- [0196] 서열 목록 번호 159: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 100.
- [0197] 서열 목록 번호 160: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 101.
- [0198] 서열 목록 번호 161: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 102.
- [0199] 서열 목록 번호 162: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 103.
- [0200] 서열 목록 번호 163: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 104.
- [0201] 서열 목록 번호 164: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 105.
- [0202] 서열 목록 번호 165: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 106.
- [0203] 서열 목록 번호 166: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 107.
- [0204] 서열 목록 번호 167: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 108.
- [0205] 서열 목록 번호 168: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 109.
- [0206] 서열 목록 번호 169: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 110.
- [0207] 서열 목록 번호 170: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 111.
- [0208] 서열 목록 번호 171: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 112.
- [0209] 서열 목록 번호 172: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 113.
- [0210] 서열 목록 번호 173: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 114.
- [0211] 서열 목록 번호 174: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 115.
- [0212] 서열 목록 번호 175: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 116.
- [0213] 서열 목록 번호 176: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 117.
- [0214] 서열 목록 번호 177: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 118.
- [0215] 서열 목록 번호 178: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 119.
- [0216] 서열 목록 번호 179: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 120.
- [0217] 서열 목록 번호 180: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 121.
- [0218] 서열 목록 번호 181: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 122.
- [0219] 서열 목록 번호 182: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 123.
- [0220] 서열 목록 번호 183: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 124.
- [0221] 서열 목록 번호 184: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 125.
- [0222] 서열 목록 번호 185: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 126.
- [0223] 서열 목록 번호 186: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 127.
- [0224] 서열 목록 번호 187: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 128.

- [0225] 서열 목록 번호 188: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 129.
- [0226] 서열 목록 번호 189: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 130.
- [0227] 서열 목록 번호 190: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 131.
- [0228] 서열 목록 번호 191: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 132.
- [0229] 서열 목록 번호 192: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 133.
- [0230] 서열 목록 번호 193: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 134.
- [0231] 서열 목록 번호 194: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 135.
- [0232] 서열 목록 번호 195: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 136.
- [0233] 서열 목록 번호 196: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 137.
- [0234] 서열 목록 번호 197: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 138.
- [0235] 서열 목록 번호 198: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 139.
- [0236] 서열 목록 번호 199: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 140.
- [0237] 서열 목록 번호 200: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 141.
- [0238] 서열 목록 번호 201: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 142.
- [0239] 서열 목록 번호 202: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 143.
- [0240] 서열 목록 번호 203: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 144.
- [0241] 서열 목록 번호 204: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 145.
- [0242] 서열 목록 번호 205: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 146.
- [0243] 서열 목록 번호 206: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 147.
- [0244] 서열 목록 번호 207: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 148.
- [0245] 서열 목록 번호 208: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 149.
- [0246] 서열 목록 번호 209: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 150.
- [0247] 서열 목록 번호 210: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 151.
- [0248] 서열 목록 번호 211: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 152.
- [0249] 서열 목록 번호 212: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 153.
- [0250] 서열 목록 번호 213: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 154.
- [0251] 서열 목록 번호 214: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 155.
- [0252] 서열 목록 번호 215: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 156.
- [0253] 서열 목록 번호 216: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 157.
- [0254] 서열 목록 번호 217: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 158.
- [0255] 서열 목록 번호 218: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 159.
- [0256] 서열 목록 번호 219: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 160.
- [0257] 서열 목록 번호 220: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 161.
- [0258] 서열 목록 번호 221: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 162.
- [0259] 서열 목록 번호 222: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 163.
- [0260] 서열 목록 번호 223: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 164.

- [0261] 서열 목록 번호 224: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 165.
- [0262] 서열 목록 번호 225: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 166.
- [0263] 서열 목록 번호 226: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 167.
- [0264] 서열 목록 번호 227: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 168.
- [0265] 서열 목록 번호 228: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 169.
- [0266] 서열 목록 번호 229: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 170.
- [0267] 서열 목록 번호 230: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 171.
- [0268] 서열 목록 번호 231: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 172.
- [0269] 서열 목록 번호 232: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 173.
- [0270] 서열 목록 번호 233: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 174.
- [0271] 서열 목록 번호 234: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 175.
- [0272] 서열 목록 번호 235: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 176.
- [0273] 서열 목록 번호 236: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 177.
- [0274] 서열 목록 번호 237: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 178.
- [0275] 서열 목록 번호 238: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 179.
- [0276] 서열 목록 번호 239: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 180.
- [0277] 서열 목록 번호 240: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 181.
- [0278] 서열 목록 번호 241: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 182.
- [0279] 서열 목록 번호 242: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 183.
- [0280] 서열 목록 번호 243: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 184.
- [0281] 서열 목록 번호 244: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 185.
- [0282] 서열 목록 번호 245: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 186.
- [0283] 서열 목록 번호 246: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 187.
- [0284] 서열 목록 번호 247: 추정 인간 CD8 세포 에피토프 188.
- [0285] 서열 목록 번호 248: M. 튜버쿨로시스 H37Rv 균주로부터의 Rv2836c의 폴리펩티드 서열.
- [0286] 서열 목록 번호 249: M. 튜버쿨로시스 H37Rv 균주로부터의 Rv2707c의 폴리펩티드 서열.

상세한 설명

- [0288] 현재, 생(生) 박테리아를 이용한 백신접종은 보호 면역을 유도하는데 가장 효과적인 방법이다. 상기 목적에 사용되는 가장 흔한 *미코박테리움*은 60년 전에 개발된 *M. 보비스(M. bovis)*의 무독성 균주인 *바실러스 칼메트-구에린(BCG)*이다. 그러나, BCG의 안전성 및 효능은 논쟁의 원인이며, 이는 아동에서 중증 질병 표현을 보호하나, 성체에서 잠복 TB의 확립 또는 폐 질병의 재활성화를 예방하지 않는다. 추가로, 미국과 같은 일부 나라는 일반 대중을 상기 작용제로 백신접종시키지 않는다.
- [0289] 현재 임상 개발되는 거의 모든 신규한 세대의 TB 백신은 노출전(pre-exposure) 백신으로 설계되었다. 이들은 이전 BCG 백신접종에 의해 유도된 부스팅 면역에 특히 효과적인 서브유닛 백신, 및 BCG를 더욱 효과적이고/이거나 안전한 균주로 대체하기 위한 진보된 생(生) 미코박테리아 백신을 포함한다. 이러한 백신은 감염에 대한 내성을 개선시키기 위한 것이나, 이들은 잠복 TB 환자에서 노출 후 또는 치료 백신으로서 덜 효과적인 것으로 보인다(Lin MY et al *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 2008 8:15-29).
- [0290] 미코박테리움 감염의 초기 단계 동안 강하게 발현되는 단백질 중 여러 단백질이 동물 백신접종 모델에서 강한

보호 효능을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 감염의 초기 단계 동안 강하게 발현되는 항원을 이용한 백신 접종은 이후의 단계의 감염을 처리하기 위한 최적 면역 반응을 제공할 수 없다. 이후의 단계의 감염 동안의 적절한 제어는 상기 시기에서 발현되는 특정 항원에 특이적인 T 세포를 필요로 할 수 있다.

- [0291] 휴면 지속 박테리아를 직접적으로 표적으로 하는 노출후 백신이 TB 재활성화에 대한 보호를 도움으로써, TB 재발을 향상시킬 수 있거나, 감염의 청소를 가능하게 할 수 있다. 따라서, 잠복 TB를 표적으로 하는 백신은 전세계 TB 감염률을 현저하고 경제적으로 감소시킬 수 있다.
- [0292] 후기 단계 항원을 기반으로 하는 서브유닛 백신이 또한 다국면(multiphase)의 백신을 제공하기 위해 초기 단계 항원과 조합하여 사용될 수 있다. 대안적으로, 후기 단계 항원은 BCG 백신접종을 보충하고 개선(BCG 반응을 부스팅시키거나, 향상된 재조합 BCG 균주의 개발을 포함)시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0293] 최근에, *M. 투베르쿨로시스* 백신 후보의 범위가 전체 유전체 *M. 투베르쿨로시스* 유전체의 생물정보학 분석(Zvi et al. *BMC Medical Genetics* 2008 1:18) 및 활성 및 잠복 감염 개체에서의 차별적으로 발현되는 단백질의 시험(Schuck SD et al. *PLoS ONE* 2009 4(5):e5590)을 기초로 하여 제시되었다.
- [0294] 대식세포는 *미코박테리움* 면역성의 주요 효과기로 작용하는 것으로 밝혀졌고, T 세포는 상기 면역성의 우선적인 유도인자이다. 결핵에 대한 보호에서의 T 세포의 본질적인 역할은 CD4+ T 세포의 관련 결핍으로 인해 인간 면역결핍 바이러스에 감염된 개체에서의 TB 재활성화의 증가되는 비율에 의해 예시된다. 또한, *M. 투베르쿨로시스*에 대한 일차 면역 반응의 고도에서 획득된 CD4+ T 세포의 채택 전달은 T 세포 결핍 마우스에서 *M. 투베르쿨로시스*에 대한 보호를 부여하는 것으로 밝혀졌다(Orme et al *J. Exp. Med.* 1983 158:74-83).
- [0295] 미코박테리움-반응성 CD4+ T 세포는 γ -인터페론(IFN- γ)의 효능있는 생산자로 밝혀졌고, 차례로 마우스에서 대식세포의 항-미코박테리아 효과를 촉발시키는 것으로 밝혀졌다(Flynn et al. *J. Exp. Med.* 1993 178:2249-2254). 인간에서의 IFN- γ 의 역할은 덜 명백하나, 연구는 단독이거나 IFN- γ 또는 종양 괴사 인자-알파와 조합된 1,25-디히드록시-비타민 D3가 인간 대식세포를 활성화시켜 *M. 투베르쿨로시스* 감염을 억제하는 것을 밝혀내었다. 또한, IFN- γ 는 인간 대식세포를 자극하여 1,25-디히드록시-비타민 D3를 제조하는 것으로 공지되어 있다. 유사하게, 인터루킨-12(IL-12)는 *M. 투베르쿨로시스* 감염에 대한 내성을 자극하는 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. *M. 투베르쿨로시스* 감염의 면역학의 개관을 위해, 문헌[Chan & Kaufmann, *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control* (Bloom ed., 1994), *Tuberculosis* (2nd ed., Rom and Garay, eds., 2003), 및 *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005)]을 참조하라.
- [0296] 본 발명은 일반적으로 TB 항원(특히, 잠복 TB와 관련된 항원)으로서의 Rv1753c의 확인, 및 TB의 예방 및 치료, 특히 잠복 TB의 예방 및 치료 및 TB 재활성화의 예방 또는 지연에서의 관련 방법 및 용도에 관한 것이다.
- [0297] 따라서, 본 발명은 TB를 치료하거나 예방하는데 사용하기 위한 Rv1753c 단백질, 이의 변이체 또는 면역원성 단편, 또는 상기 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이의 변이체 또는 단편을 제공한다. 적합하게는, 이는 잠복 TB의 예방 및 치료(특히, 잠복 TB의 치료)에서 특히 사용될 수 있다. 대안적으로, 이는 TB 재활성화의 예방 또는 지연(특히, 예를 들어, 수개월, 수년 또는 심지어 무기한까지의 TB 재활성화의 지연)에 사용될 수 있다.
- [0298] 용어 "결핵군(tuberculosis complex)의 *미코박테리움* 종"은 결핵 질병을 야기하는 것으로 통상적으로 간주되는 종, 뿐만 아니라 AIDS에 걸린 환자와 같이 면역약화된 환자에서 결핵 및 폐 질환을 야기하는 *미코박테리움* 환경 감염 및 기회감염 종, 예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*, *M. 보비스*(*M. bovis*), 또는 *M. 아프리카눔*(*M. africanum*), BCG, *M. 아비움*(*M. avium*), *M. 인트라셀룰라레*(*M. intracellulare*), *M. 셀라툼*(*M. celatum*), *M. 제나벤스*(*M. genavense*), *M. 헤모필룸*(*M. haemophilum*), *M. 칸사시이*(*M. kansasii*), *M. 시미에*(*M. simiae*), *M. 바카에*(*M. vaccae*), *M. 포르투이툼*(*M. fortuitum*), 및 *M. 스크로풀라세움*(*M. scrofulaceum*)을 포함한다(예를 들어, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005) 참조). 본 발명은 특히 *M. 투베르쿨로시스* 감염에 관한 것이다.
- [0299] 용어 "활성 감염"은 명백해진 질병 증상 및/또는 병변(적합하게는 명백해진 질병 증상을 가짐)을 갖는 감염(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 감염)을 의미한다.
- [0300] 용어 "비활성 감염", "휴면 감염" 또는 "잠복 감염"은 명백해진 질병 증상 및/또는 병변이 없는(적합하게는 명백해진 질병 증상이 없는) 감염(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 감염)을 의미한다.

- [0301] 용어 "일차 결핵"은 직접적인 감염(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 감염) 후의 임상 질병(질병 증상의 명백해짐)을 의미한다. 문헌[Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005)] 참조.
- [0302] 용어 "이차 결핵" 또는 "일차후 결핵"은 휴면, 비활성 또는 잠복 감염(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 감염)의 재활성화를 의미한다. 문헌[Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005)] 참조.
- [0303] 용어 "결핵 재활성화"는 감염에 대해 양성으로 시험(예를 들어, 결핵 피부 시험, 적합하게는 시험관내 T 세포 기반의 검정)되나, 명백한 질병 증상을 갖지 않는 개체에서 질병 증상의 이후의 명백해짐을 의미한다. 양성 진단 시험은 개체가 감염되나, 개체가 결핵을 비활성 또는 잠복 상태가 되도록 하기에 충분히 처리된 이전에 명백한 활성 질병 증상을 갖거나 갖지 않을 수 있는 것을 나타낸다. 결핵 재활성화의 예방, 지연 또는 치료 방법이 질병의 활성 증상이 명백해지는 개체에서 개시될 수 있음이 인지될 것이다.
- [0304] 용어 "약물 내성" 결핵은 감염 균주가 결핵을 치료하는데 효과적인 하나 이상의 소위 "제1선(front-line)" 화학요법제(예를 들어, 이소니아지드, 리팜핀, 에탐부톨, 스트렙토마이신 및 피라진아미드)에 대해 정적 상태로 유지되지 않거나 사멸되지 않는(즉, 상기 화학요법제에 대해 내성인) 감염(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 감염)을 의미한다.
- [0305] 용어 "다약 내성" 결핵은 감염 균주가 결핵을 치료하는데 효과적인 2개 이상의 "제1선" 화학요법제에 대해 내성인 감염(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 감염)을 의미한다.
- [0306] "화학요법제"는 결핵(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*에 의한 감염)을 치료하는 것으로 공지되고 당 분야에서 사용되는 약리학적 작용제를 의미한다. 결핵을 치료하는데 사용되는 예시적인 약리학적 작용제는 아미카신, 아미노살리실산, 카프레오마이신, 시클로세린, 에탐부톨, 에티온아미드, 이소니아지드, 카나마이신, 피라진아미드, 리파마이신(즉, 리팜핀, 리파펜틴 및 리파부틴), 스트렙토마이신, 오플록사신, 시프로플록사신, 클라리트로마이신, 아지트로마이신 및 플루오로퀴놀론을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 약물 내성이 아닌 결핵을 치료하는데 사용되는 "일차(First-line)" 또는 "제1선(Front-line)" 화학요법제는 이소니아지드, 리팜핀, 에탐부톨, 스트렙토마이신 및 피라진아미드를 포함한다. 하나 이상의 "일차" 약물에 대해 약물 내성으로 입증된 결핵을 치료하는데 사용되는 "이차(Second-line)" 화학요법제는 오플록사신, 시프로플록사신, 에티온아민, 아미노살리실산, 시클로세린, 아미카신, 카나마이신 및 카프레오마이신을 포함한다. 이러한 약리학적 작용제는 문헌 [Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman and Limbird eds., 2001]의 48장에 개관되어 있다.
- [0307] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하는 것으로 상호교환적으로 본원에서 사용된다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학 모방체인 아미노산 중합체, 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산 중합체 및 비-자연 발생 아미노산 중합체에도 적용된다. 적합하게는, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 자연 발생 아미노산 잔기, 특히 유전 부호에 의해 엔코딩되는 아미노산만으로 구성될 것이다.
- [0308] 용어 "아미노산"은 자연 발생 및 합성 아미노산, 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 의미한다. 자연 발생 아미노산은 유전 부호에 의해 엔코딩된 아미노산, 뿐만 아니라 이후에 변형되는 아미노산, 예를 들어, 히드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트 및 0-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본적인 화학 구조, 즉 수소에 결합되는 α 탄소, 카르복실기, 아미노기, 및 R기를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포늄을 의미한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 가지나, 자연 발생 아미노산과 동일한 기본적인 화학 구조를 보유한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반적인 화학 구조와 상이한 구조를 가지나, 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 화학적 화합물을 의미한다. 적합하게는, 아미노산은 자연 발생 아미노산 또는 아미노산 유사체, 특히 자연 발생 아미노산, 특히 유전 부호에 의해 엔코딩되는 아미노산이다.
- [0309] "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이의 중합체를 의미한다. 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 참조 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 물질대사되는 합성, 자연 발생 및 비-자연 발생의 공지된 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 백본 잔기 또는 결합을 함유하는 핵산을 포함한다. 상기 유사체의 예는 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-

메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산(PNA)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 적합하게는, 용어 "핵산"은 자연 발생 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이의 중합체를 의미한다.

- [0310] 달리 지정되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 이의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어, 축퇴성 코돈 치환) 및 상보적 서열, 뿐만 아니라 명백히 지정된 서열(적합하게는, 명백히 지정된 서열을 의미함)을 함축적으로 포함한다. 특히, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 세번째 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 발생시킴으로써 달성될 수 있다(Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). 용어 핵산은 유전자, cDNA, mRNA, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드와 상호교환적으로 사용된다.
- [0311] 아미노산은 이의 통상적으로 공지된 3 문자의 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)에 의해 권고된 1 문자의 기호로 본원에서 언급될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드는 이의 통상적으로 허용되는 1 문자의 코드로 언급될 수 있다.
- [0312] 본원에서 사용되는 용어 'Rv1753c 단백질 서열'은 결핵균의 *미코박테리움* 종, 예를 들어, *M. 투베르쿨로시스*, *M. 보비스* 또는 *M. 아프리카눔*과 같은 종, 또는 *BCG*, *M. 아비움*, *M. 인트라셀룰라레*, *M. 셀라툼*, *M. 제나벤스*, *M. 헤모필룸*, *M. 칸사시이*, *M. 시미에*, *M. 바카에*, *M. 포르투이툼* 및 *M. 스크로풀라세움*과 같은 환경감염성 또는 기회감염성이고, 면역 약화된 숙주(예를 들어, AIDS에 걸린 환자)에서 폐 감염과 같은 기회 감염을 야기하는 *미코박테리움* 종으로부터의 서열 목록 번호:1에 제공된 폴리펩티드 서열 또는 이의 동족체를 의미한다(예를 들어, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Chapter 150, pp. 953-966, 16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005 참조).
- [0313] 백신접종된 숙주에서 높은 효율을 보장하기 위해, 백신의 성분은 임상적 중요성의 균주 사이에서 잘 보존되어야 한다. 적합하게는, Rv1753c 단백질은 또 다른 *M. 투베르쿨로시스* 균주(예를 들어, CDC1551, F11, 할렘 A 및 C 균주)로부터의 *M. 투베르쿨로시스* H37Rv(즉, 서열 목록 번호:1에 제공된 폴리펩티드 서열) 또는 이의 동족체로부터 유래된다. 약물 내성과 관련된 *M. 투베르쿨로시스*의 균주(예를 들어, MDR 또는 특히 XDR)가 Rv1753c 단백질 서열에 대해 특히 가치있는 기초 균주이다. 관심 균주는 하기를 포함한다:
- [0314] CDC1551 - 전염성 및 독성 균주
- [0315] 할렘 패밀리(예를 들어, 할렘 A) - 균중 인간 집단에서 발견된 약물 내성 균주. *M. 투베르쿨로시스* 균주의 할렘 패밀리의 일원은 전세계의 많은 지역에서 발견되었다. 상기 패밀리의 첫번째 대표균주는 네덜란드의 할렘에서 발견되었다.
- [0316] KZN4207 - 남아프리카의 과줄루-나탈(KwaZulu-Natal)의 환자로부터의 약물 민감성 분리체.
- [0317] KZN 1435 - 남아프리카의 과줄루-나탈의 환자로부터의 다약 내성(MDR) 분리체.
- [0318] KZN605 - 남아프리카의 과줄루-나탈의 환자로부터의 광범위 약물 내성(Extensively drug resistant, XDR) 분리체.
- [0319] C - 뉴욕시에서의 매우 전염성의 균주. 한 연구에서, 이러한 균주는 주사 약물 사용자에서 보다 흔하고, 반응성 질소 중간체에 대해 내성인 것으로 밝혀졌다(Friedman *et al.* *J. Infect. Dis.* 1997 176(2):478-84).
- [0320] 94_M4241A - 중국에서 태어난 환자로부터 1994년 샌프란시스코에서 분리된 균주. 이러한 균주는 유전체 결실 분석에 의해 이전에 분석되었다(Gagneux *et al.*, *PNAS* 2006 103(8):2869-2873).
- [0321] 02_1987 - 한국에서 태어난 환자로부터 2002년에 샌프란시스코에서 분리된 균주. 이러한 균주는 유전체 결실 분석에 의해 이전에 분석되었다(Gagneux *et al.*, *PNAS* 2006 103(8):2869-2873).
- [0322] T92 - 필리핀에서 태어난 환자로부터 1999년에 샌프란시스코에서 분리된 균주. 이러한 균주는 문헌[Hirsh *et al.* *PNAS* 2004 101 :4871-4876]에서 공개되었다.
- [0323] T85 - 중국에서 태어난 환자로부터 1998년에 샌프란시스코에서 분리된 균주. 이러한 균주는 문헌[Hirsh *et al.* *PNAS* 2004 101 :4871-4876]에서 공개되었다.
- [0324] EAS054 - 인도에서 태어난 환자로부터 1993년에 샌프란시스코에서 분리된 균주. 이러한 균주는 유전체 결실 분석에 의해 이전에 분석되었다(Gagneux *et al.*, *PNAS* 2006 103(8):2869-2873).

- [0325] 문헌[Gagneux et al., *PNAS* 2006 103(8):2869-2873 및 Herbert et al. *Infect. Immun.* 2007 75(12):5798-5805]은 존재하는 것으로 공지된 *M. 투베르쿨로시스*의 범위에 대한 가치있는 배경지식을 제공된다.
- [0326] 가장 적합하게는, Rv1753c 단백질은 서열 목록 번호:1 및 3-7, 특히 서열 목록 번호:1 및 3-6, 예를 들어, 서열 목록 번호:1에 제공된 폴리펩티드 서열로부터 선택된다.
- [0327] 특히 관심있는 폴리뉴클레오티드는 하기를 엔코딩하는 서열을 포함하는(예를 들어, 이로 구성되는) 것이다:
- [0328] (i) Rv1753c 단백질 서열;
- [0329] (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는
- [0330] (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편.
- [0331] 폴리뉴클레오티드는 적합하게는 서열 목록 번호:2의 변이체 또는 Rv1753c 단백질의 면역원성 단편을 엔코딩하는 서열 목록 번호:2의 단편을 포함할(예를 들어, 이로 구성될) 것이다.
- [0332] **조합물**
- [0333] 본 발명의 Rv1753c 관련 폴리펩티드는 면역원성을 향상시키거나 다른 점에서 상기 항원을 개선시키도록 설계된 다른 성분을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 항원의 개선된 분리는 항원의 한쪽 말단을 향해 히스티딘 잔기의 스트레치(통상적으로, his-tag로 공지됨)의 첨가를 통해 촉진될 수 있다.
- [0334] 용어 "his-tag"는 참조 서열 내에 삽입된 통상적으로 6개 잔기의 한가닥의 히스티딘 잔기를 의미한다. 참조 서열과 관련된 활성의 붕괴를 최소화시키기 위해, his-tag는 통상적으로 N-말단(보통, 개시 메티오닌 잔기 바로 뒤), 또는 그렇지 않으면 C-말단에 삽입된다. 이들은 보통 자연 서열에 대해 이중성이나, 이들은 고정된 금속 친화성 크로마토그래피 수지(IMAC)에 대한 단백질 결합을 개선시킴으로써 분리를 촉진하므로 통합된다. 일반적으로 말하면, his-tag의 존재 또는 부재는 참조 단백질에 대한 요망되는 면역 반응을 유도하는 관점에서 중요하지 않다. 그러나, his-tag 자체에 대한 부작용의 위험을 피하기 위해, his-tag의 길이를, 예를 들어, 4개 이하의 잔기, 특히 2개의 잔기로 최소화시키는 것(또는 his-tag의 사용을 완전히 배제시키는 것)이 최적으로 간주된다.
- [0335] 유발된 면역 반응의 크기 및/또는 폭을 개선시키기 위해, 본 발명의 조성물, 폴리펩티드 및 핵산은 본 발명의 항원의 다중 카피 및/또는 *미코박테리움* 종(특히, *M. 투베르쿨로시스*)으로부터의 추가의 이중성 폴리펩티드(또는 이를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드)를 포함할 수 있다.
- [0336] 당업자는 다수의 성분이 조합하여 사용되는 경우에, 정밀한 제시가 변경될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들어, Rv1753c 성분 및 본 발명의 항원 또는 추가 이중성 항원 성분의 추가 카피가 하기와 같이 제시될 수 있다:
- [0337] (1) 2개의 개별적 폴리펩티드 성분;
- [0338] (2) 둘 모두의 폴리펩티드 성분을 포함하는 융합 단백질;
- [0339] (3) 하나의 폴리펩티드 및 하나의 폴리뉴클레오티드 성분;
- [0340] (4) 2개의 개별적 폴리뉴클레오티드 성분;
- [0341] (5) 2개의 개별적 폴리펩티드 성분을 엔코딩하는 단일한 폴리뉴클레오티드; 또는
- [0342] (6) 둘 모두의 폴리펩티드 성분을 포함하는 융합 단백질을 엔코딩하는 단일한 폴리뉴클레오티드.
- [0343] 이러한 유연성은 3개 이상의 성분이 조합하여 사용되는 상황에 동등하게 적용된다. 그러나, 편의를 위해, 다수의 성분이 존재하는 경우에 이들은 단일한 융합 단백질 또는 단일한 융합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 내에 함유되는 것이 종종 요망된다. 본 발명의 한 구체예에서, 모든 항원 성분이(예를 들어, 단일한 융합 단백질 내에서) 폴리펩티드로서 제공된다. 본 발명의 한 대안적 구체예에서, 모든 항원 성분이 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 단일한 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 단일한 융합 단백질을 엔코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드)로서 제공된다.
- [0344] 핵산의 일부와 관련하여 사용되는 경우 용어 "이중성"은 핵산이 자연에서 서로 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 서브서열(subsequence)을 포함하는 것을 나타낸다. 예를 들어, 통상적으로 신규한 기능적 핵산을 제조하기 위해 배열된 관련되지 않은 유전자로부터의 2개 이상의 서열, 예를 들어, 하나의 공급원으로부터의 프로모터 및 또 다른 공급원으로부터의 코딩 영역을 갖는 핵산이 재조합적으로 생성된다. 유사하게, 이중성 단백질

은 단백질이 자연에서 서로 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 서브서열을 포함(예를 들어, 융합 단백질)하는 것을 나타낸다.

- [0345] "융합 폴리펩티드" 또는 "융합 단백질"은 직접적 또는 아미노산 링커를 통해 공유적으로 연결된 2개 이상의 이중성 폴리펩티드(예를 들어, 2개 이상의 *미코박테리움* 종 폴리펩티드)를 갖는 단백질을 의미한다. 융합 단백질을 형성하는 폴리펩티드는 통상적으로 C-말단 대 N-말단으로 연결되나, 이들은 또한 C-말단 대 C-말단, N-말단 대 N-말단, 또는 N-말단 대 C-말단으로 연결될 수 있다. 융합 단백질의 폴리펩티드는 임의의 순서일 수 있다. 이러한 용어는 또한 융합 단백질을 구성하는 항원의 보존적으로 변형된 변이체, 다형 변이체, 대립유전자, 돌연 변이, 번역원성 단편, 및 중간 동족체를 의미한다. *미코박테리움* 투베르쿨로시스 항원은 전체 *미코박테리움* 투베르쿨로시스 유전체를 기재하는 문헌[Cole et al., *Nature* 393:537 (1998)]에 기재되어 있다. *M. 투베르쿨로시스* 항원에 해당하는 다른 *미코박테리움* 종으로부터의 항원은, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 서열 비교 알고리즘, 또는 당업자에게 공지된 다른 방법, 예를 들어, 하이브리드화 검정 및 항체 결합 검정을 이용하여 확인될 수 있다.
- [0346] 용어 "융합된"은 융합 단백질 내에서 2개의 폴리펩티드 사이의 공유 결합을 의미한다. 폴리펩티드는 통상적으로 서로 직접적으로 펩티드 결합을 통하거나 아미노산 링커를 통해 연결된다. 임의로, 펩티드는 당업자에게 공지된 비-펩티드 공유 결합을 통해 연결될 수 있다.
- [0347] Rv1753c와 조합될 수 있는 예시적인 *M. 투베르쿨로시스* 항원은 하기중 하나 이상(예를 들어, 하기(i) 내지(xii) 중 하나 이상)(예를 들어, 1 내지 5, 예를 들어, 1 내지 3, 특히 1):
- [0348] (i) W097/09428호의 서열 목록 번호:102(서열 목록 번호:101의 cDNA) 및 문헌[Coler et al *Journal of Immunology* 1998 161:2356-2364]에 기재된 폴리펩티드 서열인 Mtb8.4(DPV 및 Rv1174c로도 공지됨). 특히 관심 있는 것은 선도 신호 펩티드가 부재하는 성숙 Mtb8.4 서열(즉, W097/09428호의 서열 목록 번호:102로부터의 아미노산 잔기 15-96)이다. Mtb8.4의 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:8에 제시되어 있다;
- [0349] (ii) W098/53075호의 서열 목록 번호:109(MSL의 단편은 W098/53075호의 서열 목록 번호:110-124에 기재되어 있으며, 특히 관심 있는 것은 서열 목록 번호:119 및 120임) 및 또한 문헌[Coler et al *Vaccine* 2009 27:223-233](특히 이의 도 2에 도시된 반응성 단편)에 기재된 폴리펩티드 서열인 Mtb9.8(MSL 및 Rv0287로도 공지됨). Mtb9.8에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:9에 도시되어 있다;
- [0350] (iii) W098/53075호의 서열 목록 번호:19 및 문헌[Alderson et al *Journal of Experimental Medicine* 2000 7:551-559](MTI의 단편은 W098/53075호의 서열 목록 번호:17 및 51-66에 기재되어 있으며, 특히 관심 있는 것은 서열 목록 번호:17, 51, 52, 53, 56 및 62-65임)에 기재된 폴리펩티드 서열인 Mtb9.9(Mtb9.9A, MTI, MTI-A 및 Rv1793으로도 공지됨). MTI의 다수의 폴리펩티드 변이체가 W098/53075호의 서열 목록 번호:21, 23, 25, 27, 29 및 31 및 문헌[Alderson et al *Journal of Experimental Medicine* 2000 7:551-559]에 기재되어 있다. Mtb9.9에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:10에 도시되어 있다;
- [0351] (iv) W001/98460호의 서열 목록 번호:10 및 문헌[Skeiky et al *Journal of Immunology* 2004 172:7618-7682]에 기재된 폴리펩티드 서열인 Ra12(Mtb32A C-말단 항원으로도 공지됨). Ra12의 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:11에 도시되어 있다;
- [0352] (v) W001/98460호의 서열 목록 번호:8 및 문헌[Skeiky et al *Journal of Immunology* 2004 172:7618-7682]에 기재된 폴리펩티드 서열인 Ra35(Mtb32A N-말단 항원으로도 공지됨). Ra35에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:12에 도시되어 있다;
- [0353] (vi) W097/09428호의 서열 목록 번호:107 및 또한 문헌[Dillon et al *Infection and Immunity* 1999 67(6):2941-2950 및 Skeiky et al *Journal of Immunology* 2004 172:7618-7682]에 기재된 폴리펩티드 서열인 TbH9(Mtb39, Mtb39A, TbH9FL 및 Rv1196으로도 공지됨). TbH9에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:13에 도시되어 있다;
- [0354] (vii) W098/53075호의 서열 목록 번호:138(서열 목록 번호:137의 cDNA)에 기재된 폴리펩티드 서열인 Mtb40(HTCC1 및 Rv3616c로도 공지됨). Mtb40에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:14에 도시되어 있다;
- [0355] (viii) W098/53075호의 서열 목록 번호:142(서열 목록 번호:140의 cDNA) 및 문헌[Skeiky et al *Journal of Immunology* 2000 165:7140-7149]에 기재된 폴리펩티드 서열인 Mtb41(MTCC2 및 Rv0915c로도 공지됨). Mtb41에

대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:15에 도시되어 있다;

- [0356] (ix) W097/09428호의 서열 목록 번호:103(서열 목록 번호:104의 cDNA) 및 문헌[Sorensen et al *Infection and Immunity* 1995 63(5):1710-1717]에 기재된 폴리펩티드 서열인 ESAT-6(esxA 및 Rv3875로도 공지됨). ESAT-6에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:16에 도시되어 있다;
- [0357] (x) 예를 들어, 문헌[Content et al *Infection and Immunity* 1991 59:3205-3212 및 Huygen et al *Nature Medicine* 1996 2(8):893-898]에 논의된 Ag85 복합체 항원(예를 들어, fbpA 및 Rv3804c로도 공지된 Ag85A; 또는 fbpB 및 Rv1886c로도 공지된 Ag85B). Ag85A에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:17(즉, 신호 펩티드가 결핍된 잔기 43-338의 성숙 단백질이 특히 흥미로움)에 도시되어 있다. Ag85B에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:18(즉, 신호 펩티드가 결핍된 잔기 41-325의 성숙 단백질이 특히 흥미로움)에 도시되어 있다;
- [0358] (x i) 문헌[Verbon et al *Journal of Bacteriology* 1992 174:1352-1359 및 Friscia et al *Clinical and Experimental Immunology* 1995 102:53-57]에 기재된 알파-크리스탈린(hspX 및 Rv2031c로도 공지됨)(특히 흥미로운 것은 잔기 71-91, 21-40, 91-110 및 111-130에 해당하는 단편임). 알파-크리스탈린에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:19에 도시되어 있다;
- [0359] (x ii) 문헌[Roche et al *Scandinavian Journal of Immunology* 1996 43:662-670]에 기재된 Mpt64(Rv1980c로도 공지됨). MPT64에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:20(즉, 신호 펩티드가 결핍된 잔기 24-228의 성숙 단백질이 특히 흥미로움)에 도시되어 있다;
- [0360] (x iii) W001/98460호의 서열 목록 번호:2(전장) 및 서열 목록 번호:4의 잔기 8-330(성숙)에 기재되어 있는 폴리펩티드 서열인 Mtb32A, 특히 돌연변이된 촉매 트라이어드(triad) 중 하나 이상(예를 들어, 알라닌으로 돌연변이될 수 있는 촉매 세린 잔기)을 갖는 변이체. Mtb32A에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:21에 도시되어 있다. Ser/Ala 돌연변이를 갖는 Mtb32A의 성숙 형태는 서열 목록 번호:22에 도시되어 있다;
- [0361] (x iv) TB10.4, TB10.4의 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:23에 도시되어 있다;
- [0362] (x v) Rv2386c, *미코박테리움 투베르쿨로시스* H37Rv로부터의 Rv2386c에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:248에 도시되어 있다;
- [0363] (x vi) Rv2707c, *미코박테리움 투베르쿨로시스* H37Rv로부터의 Rv2707c에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:249에 도시되어 있다;
- [0364] 또는 상기의 조합물, 예를 들어, 하기와 같은 조합물(예를 들어, (a) 내지 (g)와 같은 조합물)을 포함한다:
- [0365] (a) 예를 들어, 융합 단백질 형태의 Ra12, TbH9 및 Ra35 성분의 조합물, 예를 들어, Mtb72f. Mtb72f의 폴리펩티드 서열(이는 정제를 돕기 위해 임의의 His-tag를 포함하고, 본 발명에서 사용되는 경우, 적합하게는 Mtb72f는 임의의 히스티딘 잔기가 부재함)은 W02006/117240호의 서열 목록 번호:6(서열 목록 번호:5의 cDNA) 및 문헌[Skeiky et al *Journal of Immunology* 2004 172:7618-7682]에 기재되어 있다. Mtb72f에 대한 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:24에 도시되어 있다;
- [0366] (b) 예를 들어, 융합체 단백질 형태의 Ra12, TbH9 및 Ser/Ala 돌연변이된 Ra35(즉, 촉매 세린 잔기가 알라닌으로 대체됨)의 조합물, 예를 들어, M72. M72의 폴리펩티드 서열은 W02006/117240호의 서열 목록 번호:4(서열 목록 번호:3의 cDNA)에 기재되어 있고, 여기서 이는 정제를 돕기 위해 임의의 이중 히스티딘을 포함하고, 본 발명에서 사용되는 경우, M72는 또한 이중 히스티딘을 포함할 수 있으나, 적합하게는 M72는 임의의 이중 히스티딘이 부재한다(즉, W02006/117240호의 서열 목록 번호:4로부터의 잔기 4-725가 특히 흥미로움). M72에 대한 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:25에 도시되어 있다;
- [0367] (c) 예를 들어, 융합 단백질 형태의 Mtb8.4, Mtb9.8, Mtb9.9 및 Mtb41 성분의 조합물, 예를 들어, Mtb71f. Mtb71f의 폴리펩티드 서열은 W099/051748호의 서열 목록 번호:16(서열 목록 번호:15의 cDNA)에 기재되어 있고, 여기서 이는 정제를 돕기 위해 임의의 His-tag를 포함하고, 본 발명에서 사용되는 경우 적합하게는 Mtb71f은 W099/051748호의 서열 목록 번호:16의 아미노산 잔기 9-710에 해당한다. Mtb71f에 대한 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:26에 도시되어 있다;
- [0368] (d) 예를 들어, 융합 단백질의 Mtb72f 또는 M72(적합하게는 발현을 돕기 위한 임의의 히스티딘 잔기가 없음)와 Mtb9.8 및 Mtb9.9의 조합물. M72-Mtb9.9-Mtb9.8 융합체에 대한 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:27에 도시

되어 있고(M92 융합체), 본 발명에서 사용되는 경우, M72-Mtb9.9-Mtb9.8 융합체는 임의로 제조를 돕기 위한 개시 메티오닌 잔기 뒤에 이중 히스티딘을 포함할 수 있다;

[0369] (e) 예를 들어, 융합 단백질의 Mtb72f 또는 M72(적합하게는 발현을 돕는 임의의 히스티딘 잔기가 없음)와 Ag85B의 조합물, 예를 들어, Mtb103f. Mtb103f의 폴리펩티드 서열은 W003/070187호의 서열 목록 번호:18(서열 목록 번호:10의 cDNA)에 기재되어 있고, 여기서 이는 정제를 돕기 위해 임의의 His-tag를 포함하고, 본 발명에서 사용되는 경우, 적합하게는 Mtb103f는 W003/070187호로부터의 서열 목록 번호:18의 아미노산 잔기 8-1016에 해당한다. 또한 특히 흥미로운 것은 M103, 즉 Ra35 성분 내에 Ser/Ala 돌연변이를 포함하는 Mtb103f이고, 본 발명에서 사용되는 경우, 적합하게는 M103은 위치 710의 Ser 잔기가 Ala로 대체된 W003/070187호로부터의 서열 목록 번호:18의 아미노산 잔기 8-1016에 해당한다. M103에 대한 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:28에 도시되어 있고, 본 발명에서 사용되는 경우, M72-Mtb9.9-Mtb9.8 융합체는 정제를 돕는 개시 메티오닌 잔기 뒤에 이중 히스티딘을 임의로 포함할 수 있다;

[0370] (f) 예를 들어, 융합 단백질의 Mtb72f 또는 M72(적합하게는 발현을 돕는 임의의 히스티딘 잔기가 없음)와 Mtb41의 조합물, 예를 들어, Mtb114f. Mtb114f의 폴리펩티드 서열은 W003/070187호의 서열 목록 번호:16(서열 목록 번호:9의 cDNA)에 기재되어 있고, 여기서 이는 정제를 돕기 위해 임의의 His-tag를 포함하고, 본 발명에서 사용되는 경우, 적합하게는 Mtb114f는 W003/070187호로부터의 서열 목록 번호:16의 아미노산 잔기 8-1154에 해당한다. 또한, 특히 흥미로운 것은 M114, 즉 Ra35 성분에서 Ser/Ala 돌연변이를 포함하는 Mtb114f이고, 본 발명에서 사용되는 경우, 적합하게는 M114는 위치 710의 Ser 잔기가 Ala로 대체된 W003/070187호로부터의 서열 목록 번호:16의 아미노산 잔기 8-1154에 해당한다. M114에 대한 폴리펩티드 서열은 서열 목록 번호:29에 도시되어 있고, 본 발명에서 사용되는 경우, M72-Mtb9.9-Mtb9.8 융합체는 제조를 돕는 개시 메티오닌 잔기 뒤에 이중 히스티딘을 임의로 포함할 수 있다;

[0371] (g) 문헌[Doherty et al *Journal of Infectious Diseases* 2004 190:2146-2153]에 기재된 융합체와 같은 Ag85B 및 ESAT-6 성분의 조합물; 및/또는

[0372] (h) 문헌[Dietrich et al *Journal of Immunology* 2005 174(10):6332-6339 190:2146-2153]에 기재된 융합체와 같은 Ag85B 및 TB10.4 성분의 조합물.

[0373] Rv1753c 성분 및 Mtb40 성분의 조합물이 특히 흥미롭다. 명백히, 이러한 조합물은 다른 추가 항원 성분(예를 들어, M72 성분)을 임의로 함유할 수 있다.

[0374] 또 다른 흥미로운 조합물은 Rv1753c 성분 및 M72 성분을 포함한다.

[0375] 추가의 흥미로운 조합물은 Rv1753c 성분 및 Rv1753c 성분을 포함한다.

[0376] 다른 흥미로운 조합물은 Rv1753c 성분 및 Rv2707c 성분을 포함하는 것을 포함한다.

[0377] 추가의 흥미로운 조합물은 Rv1753c 성분 및 알파-크리스탈린 성분을 포함한다.

[0378] 당업자는 조합물이 상기 (i)-(xvi) 및 (a)-(h)에 기재된 특정 서열에 서열에 좌우될 필요는 없고, 본원에 기재된 서열의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어, 70% 이상의 동일성, 예를 들어, 80% 이상의 동일성, 특히 90% 이상의 동일성 및 특히 95% 이상의 동일성을 가짐) 또는 면역원성 단편(예를 들어, 전장 항원의 20% 이상, 예를 들어, 항원의 50% 이상, 특히 70% 이상, 특히 80% 이상)이 동일한 실시 효과를 달성하기 위해 사용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0379] 상기 개별적 항원 서열의 각각은 문헌[Cole et al *Nature* 1998 393:537-544 및 *Camus Microbiology* 2002 148:2967-2973]에 개시되어 있다. *M. 투베르쿨로시스* H37Rv의 유전체는, 예를 들어, 웰컴 트러스트 생거 인스티튜트(Welcome Trust Sanger Institute) 웹사이트(www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/) 및 다른 곳에서 공적으로 이용가능하다.

[0380] 상기 항원 중 다수는 또한 미국 특허 출원 번호 08/523,435호, 08/523,436호, 08/658,800호, 08/659,683호, 08/818,111호, 08/818,112호, 08/942,341호, 08/942,578호, 08/858,998호, 08/859,381호, 09/056,556호, 09/072,596호, 09/072,967호, 09/073,009호, 09/073,010호, 09/223,040호, 09/287,849호 및 PCT 특허 출원 PCT/US98/10407호, PCT/US98/10514호, PCT/US99/03265호, PCT/US99/03268호, PCT/US99/07717호, W097/09428호 및 W097/09429호, W098/16645호, W098/16646호에 기재되어 있고, 이들은 참조로서 본원에 포함된다.

[0381] 본 발명의 조성물, 폴리펩티드 및 핵산은 또한 다른 공급원으로부터의 추가 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예

를 들어, 본 발명의 조성물 및 용합 단백질은 폴리펩티드 또는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산을 포함할 수 있고, 상기 폴리펩티드는 항원, 예를 들어, 인플루엔자 바이러스 단백질인 NS1의 발현을 향상시킨다(예를 들어, W099/40188호 및 W093/04175호 참조). 본 발명의 핵산은 선택 중, 예를 들어, 인간(생체내 발현의 경우) 또는 특정 박테리아(폴리펩티드 생성의 경우)에서 코돈 선호(codon preference)를 기초로 하여 유전공학 처리될 수 있다.

[0382] Rv1753c 성분은 또한 결핵(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스* 감염)에 대해 효과적인 하나 이상의 화학요법제와 함께 투여될 수 있다. 이러한 화학요법제의 예는 아미카신, 아미노살리실산, 카프레오마이신, 시클로세린, 에탐부톨, 에티온아미드, 이소니아지드, 카나마이신, 피라진아미드, 리파마이신(즉, 리팜핀, 리파퀼린 및 리파부틴), 스트렙토마이신, 오플록사신, 시프로플록사신, 클라리트로마이신, 아지트로마이신 및 플루오로퀴놀론을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 화학요법제는 바람직한 약물 조합물을 이용하여 치료 전문의의 판단에 의해 결정된다. 약물 내성이 아닌 결핵(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스* 감염)을 치료하는데 사용되는 "일차" 화학요법제는 이소니아지드, 리팜핀, 에탐부톨, 스트렙토마이신 및 피라진아미드를 포함한다. 하나 이상의 "일차" 약물에 대해 약물 내성으로 입증된 결핵(예를 들어, *M. 투베르쿨로시스* 감염)을 치료하는데 사용되는 "이차" 화학요법제는 오플록사신, 시프로플록사신, 에티온아미드, 아미노살리실산, 시클로세린, 아미카신, 카나마이신 및 카프레오마이신을 포함한다.

[0383] 통상적인 화학요법제는 일반적으로 비교적 장기간(약 9개월)에 걸쳐 투여된다. 본 발명에 따른 Rv1753c 성분의 투여와 함께 통상적인 화학요법제의 조합물은 효능의 감소 없이 화학요법 치료 기간이 감소(예를 들어, 8개월, 7개월, 6개월, 5개월, 4개월, 3개월 이하)되는 것을 가능하게 할 수 있다.

[0384] 특히 흥미로운 것은 *바실러스 칼메트-구에린*(BCG)과 조합된 Rv1753c 성분의 용도이다. 예를 들어, Rv1753c(또는 본원에 기재된 바와 같은 이의 변이체 또는 단편)를 재조합적으로 발현하는 변형된 BCG의 형태. 대안적으로, Rv1753c 성분은 공동 투여 또는 이전의 BCG 백신접종의 부스팅에 의해 BCG 백신접종에 대한 피검체의 반응을 향상시키는데 사용될 수 있다. BCG 백신접종에 대한 피검체의 반응을 향상시키는데 사용되는 경우, Rv1753c 성분은 명백히 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 형태(임의로 상기 기재된 추가 항원성 성분과 조합됨)로 제공될 수 있다.

[0385] 당업자는 성분의 조합물은 함께 투여되는 것이 필요하지는 않고, 동일하거나 상이한 경로를 통해 동시에, 순차적으로 또는 짧은 기간 내에 단독으로 또는 조합하여 적용될 수 있음을 인지할 것이다. 그럼에도 불구하고, 편의를 위해, 일반적으로 단일한 조성물로서 성분의 조합물을 투여하는 것이 요망된다(투여 요법이 양립되는 경우).

[0386] 본 발명의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 조성물은 보통 인간에게 투여될 것이나, 가축(예를 들어, 개, 고양이, 토끼, 래트, 마우스, 기니아 피그, 햄스터, 친칠라) 및 농경 동물(예를 들어, 소, 돼지, 양, 염소, 말)을 포함하는 다른 포유동물에도 효과적이다.

[0387] **면역원성 단편**

[0388] T 세포 에피토프는 T 세포(예를 들어, CD4+ 또는 CD8+ T 세포)에 의해 인지되는 아미노산의 짧은 연속 스트레치이다. T 세포 에피토프의 확인은 당업자에게 널리 공지된 에피토프 맵핑 실험을 통해 달성될 수 있다(예를 들어, Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (1993); Beiβbarth et al *Bioinformatics* 2005 21 (Suppl. 1):i29-i37 참조).

[0389] 대안적으로, 에피토프는 실시예에 논의된 방법을 이용하여 예측될 수 있다.

[0390] 결핵에서의 T 세포 반응의 중요한 연관성의 결과로서, 하나 이상의 T 세포 에피토프를 함유하는 전장 Rv1753c 폴리펩티드의 단편이 면역원성일 것이고, 면역보호를 제공할 수 있음이 용이하게 명백하다. 이러한 단편은 본원에서 면역원성 단편으로 언급된다.

[0391] 본 발명에 따른 면역원성 단편은 통상적으로 전장 폴리펩티드 서열로부터의 9개 이상의 연속 아미노산(예를 들어, 10개 이상), 예를 들어, 12개 이상의 연속 아미노산(예를 들어, 15개 이상 또는 20개 이상의 연속 아미노산), 특히 50개 이상의 연속 아미노산, 예를 들어, 100개 이상의 연속 아미노산(예를 들어, 200개 이상의 연속 아미노산)을 포함할 것이다. 적합하게는, 면역원성 단편은 전장 폴리펩티드 서열의 20% 이상, 예를 들어, 50% 이상, 70% 이상 또는 80% 이상일 것이다.

[0392] 다양한 비근교계(out-bred) 집단, 예를 들어, 인간에서, 다양한 HLA 유형은 특정 에피토프가 집단의 모든 일원

에 의해 인지되지 않을 수 있음을 의미한다. 결과적으로, 인지의 수준 및 폴리펩티드에 대한 면역 반응의 규모를 최대화시키기 위해, 일반적으로 면역원성 단편이 전장 서열로부터의 다수의 에피토프(적합하게는, 모든 에피토프)를 함유하는 것이 바람직하다.

[0393] 사용될 수 있는 Rv1753c 단백질의 특정 단편은 하나 이상의 CD4+ 에피토프, 적합하게는 두개 이상의 CD4+ 에피토프, 특히 모든 CD4+ 에피토프(실시예, 및 서열 목록 번호:30-52에 기재된 에피토프, 특히 다수의 HLA 대립유전자와 관련된 에피토프, 예를 들어, 2, 3, 4, 5개 이상의 대립유전자와 관련된 에피토프)를 함유하는 것을 포함한다.

[0394] 사용될 수 있는 Rv1753c 단백질의 다른 단편은 하나 이상의 CD8 에피토프, 적합하게는 2개 이상의 CD8 에피토프, 특히 모든 CD8 에피토프(예를 들어, 실시예, 및 서열 목록 번호:53-154에 기재된 에피토프, 특히 다수의 HLA 대립유전자와 관련된 에피토프, 예를 들어, 2, 3, 4, 5개 이상의 대립유전자와 관련된 에피토프)를 함유하는 것을 포함한다.

[0395] 전장 폴리펩티드의 개별적 단편이 사용되는 경우, 이러한 단편은 림프구증식을 통한 세포의 활성화, 배양 상층액 내에서의 사이토카인의 생성(ELISA, CB 등에 의해 측정됨) 또는 세포내 및 세포외 염색(예를 들어, 면역 마커, 예를 들어, CD3, CD4, CD8, IL2, TNF α , IFN γ , CD40L, CD69 등에 특이적인 항체를 이용함)에 의한 T 및 B 세포 반응의 특성규명을 측정하는 특정 항원을 이용한 PBMC 또는 전체 혈액의 시험관내 재자극 검정(예를 들어, 수시간 내지 2주 이하, 예를 들어, 1일 이하, 1일 내지 1주 또는 1 내지 2주의 기간 동안의 재자극), 및 이후 유세포분석기를 이용한 분석에서 참조 서열의 활성의 20% 이상, 적합하게는 50% 이상, 특히 75% 이상(예를 들어, 90% 이상)인 반응을 유발시키는 경우에 면역원성인 것으로 간주된다. 적합하게는, 단편은 T 세포 증식 및/또는 IFN-감마 생성 검정에서 참조 서열의 활성의 20% 이상, 적합하게는 50% 이상, 특히 75% 이상(예를 들어, 90% 이상)인 반응을 유발시키는 경우에 면역원성인 것으로 간주된다.

[0396] 일부 상황에서, 전장 폴리펩티드의 다수의 단편(중첩되거나 중첩되지 않을 수 있고, 전장 서열의 전체를 포함하거나 포함하지 않을 수 있음)은 전장 서열 자체에 대한 동등한 생물학적 반응을 수득하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 조합된 상기 기재된 바와 같은 2개 이상의 면역원성 단편(예를 들어, 3, 4 또는 5개)은 PBMC 또는 전체 혈액의 시험관내 재자극 검정(예를 들어, T 세포 증식 및/또는 IFN-감마 생성 검정)에서 참조 서열의 활성의 50% 이상, 적합하게는 75% 이상, 특히 90% 이상을 제공한다.

[0397] **변이체**

[0398] "변이체" 또는 "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 엔코딩하는 핵산, 또는 핵산이 아미노산 서열을 엔코딩하지 않는 경우 본질적으로 동일한 서열을 의미한다.

[0399] 유전 부호의 축퇴성으로 인해, 많은 수의 기능적으로 동일한 핵산이 임의의 제공된 단백질을 엔코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU 모두는 아미노산 알라닌을 엔코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 지정되는 모든 위치에서 코돈은 엔코딩되는 폴리펩티드를 변경시키지 않고 기재된 해당 코돈 중 어느 코돈으로도 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변화는 보존적으로 변형된 변화의 한 종인 "침묵(silent)" 또는 "축퇴성" 변이체를 발생시킨다. 폴리펩티드를 엔코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변화를 기재한다. 당업자는 핵산의 각각의 코돈(메티오닌에 대한 보통 유일한 코돈인 AUG, 및 트립토판에 대한 보통 유일한 코돈인 TGG 제외)이 변형되어 기능적으로 동일한 분자를 생성시킬 수 있는 것을 인지할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변화는 각각의 기재된 서열에 함축되어 있다.

[0400] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 참조 서열에 비교하는 경우 다수의 침묵 변화(예를 들어, 1-50, 예를 들어, 1-25, 특히 1-5, 특히 1개의 코돈(들)이 변경될 수 있음)를 함유할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 참조 서열과 비교하는 경우 다수의 비-침묵 보존적 변화(예를 들어, 1-50, 예를 들어, 1-25, 특히 1-5, 특히 1개의 코돈(들)이 변경될 수 있음)를 함유할 수 있다. 비-침묵 변화는 엔코딩된 아미노산 서열에서 변화(아미노산 잔기의 치환, 결실 또는 첨가를 포함)를 발생시키는 것이다. 당업자는 특정 폴리뉴클레오티드 서열이 침묵 및 비-침묵 보존적 변화 둘 모두를 함유할 수 있음을 인지할 것이다.

[0401] 단백질 서열의 변화와 관련하여, 당업자는 단일한 아미노산 또는 아미노산의 적은 백분율을 변경시키거나, 첨가하거나, 결실시키는 폴리펩티드에 대한 개별적 치환, 결실 또는 첨가가 상기 변경(들)이 아미노산의 기능적으로 유사한 아미노산으로의 치환, 또는 변이체의 생물학적 기능에 실질적으로 영향을 주지 않는 잔기의 치환/결실/첨가를 발생시키는 "보존적으로 변형된 변이체"임을 인지할 것이다.

- [0402] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 이외에 본 발명의 다형 변이체, 중간 동족체, 및 대립유전자를 배제하지 않는다.
- [0403] 본 발명의 폴리펩티드는 참조 서열에 비교하는 경우 다수의 보존적 치환(예를 들어, 1-50, 예를 들어, 1-25, 특히 1-10, 특히 1개의 아미노산 잔기(들)이 변경될 수 있음)을 함유할 수 있다. 일반적으로, 이러한 보존적 치환은 하기 특정된 아미노산 그룹화 중 하나에 해당할 것이나, 일부 상황에서 항원의 면역원성 특성에 실질적으로 영향을 주지 않고 다른 치환이 가능할 수 있다. 하기 8개의 그룹 각각은 서로에 대해 통상적으로 보존적 치환인 아미노산을 함유한다:
- [0404] 1) 알라닌(A), 글리신(G);
- [0405] 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);
- [0406] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);
- [0407] 4) 아르기닌(R), 리신(K);
- [0408] 5) 이소루신(I), 루신(L), 메티오닌(M), 발린(V);
- [0409] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);
- [0410] 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및
- [0411] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)
- [0412] (예를 들어, Creighton, *Proteins* 1984 참조).
- [0413] 적합하게는, 이러한 치환은 에피토프의 영역에서 발생하지 않고, 이에 따라 항원의 면역원성 특성에 유의한 영향을 미치지 않는다.
- [0414] 단백질 변이체는 또한 추가 아미노산이 참조 서열에 비해 삽입되는 변이체를 포함할 수 있고, 예를 들어, 상기 삽입은 1-10개의 위치(예를 들어, 1-5개의 위치, 적합하게는 1 또는 2개의 위치, 특히 1개의 위치)에서 발생할 수 있고, 이는, 예를 들어, 각각의 위치에서 50개 이하(예를 들어, 20개 이하, 특히 10개 이하, 특히 5개 이하)의 아미노산의 첨가를 포함할 수 있다. 적합하게는, 이러한 삽입은 에피토프의 영역에서 발생하지 않고, 이에 따라 항원의 면역원성 특성에 유의한 영향을 미치지 않는다. 삽입의 한 예는 당해 항원의 발현 및/또는 정제를 돕는 히스티딘 잔기의 짧은 스트레치(예를 들어, 2-6개의 잔기)를 포함한다.
- [0415] 단백질 변이체는 아미노산이 참조 서열에 비해 결실되는 변이체를 포함하고, 예를 들어, 상기 결실은 1-10개의 위치(예를 들어, 1-5개의 위치, 적합하게는 1 또는 2개의 위치, 특히 1개의 위치)에서 발생할 수 있고, 이는, 예를 들어, 각각의 위치에서 50개 이하(예를 들어, 20개 이하, 특히 10개 이하, 특히 5개 이하)의 아미노산의 결실을 포함할 수 있다. 적합하게는, 이러한 결실은 에피토프의 영역에서 발생하지 않고, 이에 따라 항원의 면역원성 특성에 유의한 영향을 미치지 않는다.
- [0416] 당업자는 특정 단백질 변이체가 치환, 결실 및 첨가(또는 이의 임의의 조합)를 포함할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0417] 항원의 에피토프 영역을 결정하는 방법은 실시예에 기재되고, 예시되어 있다.
- [0418] 변이체는 바람직하게는 관련 참조 서열에 대해 약 70% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 약 90% 이상의 동일성(예를 들어, 약 95% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상)을 나타낸다.
- [0419] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련한 용어 "동일한" 또는 "동일성" 백분율은 하기 서열 비교 알고리즘 중 하나를 이용하거나 수작업 정렬 및 시각적 검사에 의해 측정시 비교 영역(window), 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 일치에 대해 비교되고 정렬되는 경우에 동일하거나, 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 특정 백분율(즉, 특정된 영역에 걸쳐 70%의 동일성, 임의로 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 동일성)을 갖는 2개 이상의 서열 또는 서브서열을 의미한다. 이후, 이러한 서열은 "실질적으로 동일한" 것으로 언급된다. 이러한 정의는 또한 시험 서열의 상보체를 의미한다. 임의로, 동일성은 약 25 내지 약 50개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역, 또는 임의로 75-100개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역에 걸쳐 존재한다. 적합하게는, 비교는 참조 서열의 전체 길이에 해당하는 영역에 걸쳐 수행된다.

- [0420] 서열 비교를 위해, 통상적으로 하나의 서열이 참조 서열로 작용하고, 시험 서열이 여기에 비교된다. 서열 비교 알고리즘을 이용하는 경우, 시험 및 참조 서열이 컴퓨터에 기입되고, 필요시 서열 좌표가 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터가 지정된다. 디폴트 프로그램 파라미터가 사용될 수 있거나, 대안적으로 파라미터가 지정될 수 있다. 이후, 서열 비교 알고리즘이 프로그램 파라미터에 기초하여 참조 서열에 비한 참조 서열에 대한 서열 동일성 백분율을 계산한다.
- [0421] 본원에서 사용되는 "비교 영역"은 서열이 두개의 서열이 최적으로 정렬된 후 연속 위치의 동일한 수의 참조 서열에 대해 비교될 수 있는 세그먼트를 의미한다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예를 들어, 문헌[Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘, 문헌[Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)]의 유사성 방법을 위한 검색, 상기 알고리즘의 전산화된 수행(문헌[Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI]에서 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA), 또는 수작업 정렬 및 시각적 검사(예를 들어, 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)] 참조)에 의해 수행될 수 있다.
- [0422] 유용한 알고리즘의 한 예는 PILEUP이다. PILEUP은 관계 및 서열 동일성 백분율을 나타내는 진행적인 쌍을이룬(pairwise) 정렬을 이용한 관련 서열의 그룹으로부터의 다중 서열 정렬을 발생시킨다. 이는 또한 정렬을 생성 시키는데 사용되는 클러스터링 관계를 나타내는 트리 또는 덴도그램(dendrogram)을 작도한다. PILEUP은 문헌[Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987)]의 진행적 정렬 방법의 간소화를 이용한다. 사용되는 방법은 문헌[Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989)]에 기재된 방법과 유사하다. 프로그램은 300개 이하의 서열(5,000개 뉴클레오티드 또는 아미노산의 최대 길이 각각)을 정렬시킬 수 있다. 다중 정렬 절차는 2개의 가장 유사한 서열의 쌍을이룬 정렬로 시작하여, 두개의 정렬된 서열의 클러스터를 생성시킨다. 이후, 이러한 클러스터는 다음의 가장 관련된 서열 또는 정렬된 서열의 클러스터로 정렬된다. 서열의 두개의 클러스터는 두개의 개별적 서열의 쌍을이룬 정렬의 간단한 연장에 의해 정렬된다. 최종 정렬은 일련의 진행적인 쌍을이룬 정렬에 의해 달성된다. 프로그램은 서열 비교 영역에 대한 특정 서열 및 이의 아미노산 또는 뉴클레오티드 좌표를 지정하고, 프로그램 파라미터를 지정함으로써 수행된다. PILEUP을 이용하여, 참조 서열은 디폴트 갭 가중치(default gap weight)(3.00), 디폴트 갭 길이 가중치(0.10), 및 가중치화된 말단 갭과 같은 파라미터를 이용하여 서열 동일성 백분율 관계를 결정하기 위해 다른 시험 서열과 비교된다. PILEUP은 GCG 서열 분석 소프트웨어 패키지, 예를 들어, 버전 7.0으로부터 수득될 수 있다(Devereaux *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:387-395 (1984)).
- [0423] 서열 동일성 백분율 및 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리즘의 또 다른 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이는 문헌[Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977)] 및 Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)] 각각에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)(웹사이트: www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 통해 공적으로 이용 가능하다. 이러한 알고리즘은 데이터베이스 서열 내의 동일 길이의 워드와 정렬되는 경우에 일치하거나 일부 양성값의 역치 스코어 T를 충족시키는 질의 서열 내의 길이 W의 짧은 워드를 확인함으로써 높은 스코어의 서열 쌍(HSP)을 먼저 확인하는 것을 포함한다. T는 인접 워드 스코어 역치로 언급된다(Altschul *et al.*, 상기). 이러한 개시 인접 워드 적중(hit)은 이를 함유하는 보다 긴 HSP를 찾기 위한 검색을 개시하기 위한 시드(seed)로 작용한다. 워드 적중은 축적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 축적 스코어는 뉴클레오티드 서열에 대해 파라미터 M(일치하는 잔기의 쌍에 대한 보상 스코어; 항상 > 0) 및 N(일치하지 않는 잔기에 대한 페널티 스코어; 항상 < 0)을 이용하여 계산된다. 아미노산 서열에 대해, 축적 스코어를 계산하기 위해 스코어링 매트릭스가 사용된다. 각 방향에서의 워드 적중의 연장은 축적 정렬 스코어가 최대 달성 값으로부터의 양 X에 의해 떨어지거나; 축적 스코어가 하나 이상의 음성 스코어링 잔기 정렬의 축적으로 인해 0 이하가 되거나; 어느 하나의 서열의 말단에 도달되는 경우에 정지된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 민감성 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열에 대한)은 11의 워드길이(W), 10의 예기치(E), M=5, N=-4 및 양 가닥의 비교를 디폴트로 사용한다. 아미노산 서열에 대해, BLASTP 프로그램은 3의 워드길이, 및 10의 예기치(E), 및 50의 BLOSUM62 스코어링 매트릭스(Henikoff & Henikoff, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989) 참조) 정렬(B), 10의 예기치(E), M=5, N=-4, 및 양 가닥의 비교를 디폴트로 사용한다.
- [0424] BLAST 알고리즘은 또한 두개의 서열 사이의 유사성의 통계적 분석을 수행한다(예를 들어, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993) 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 한 척도는

가장 작은 합계 공산(probability)(P(N))이며, 두개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 일치 가능성이 우연히 발생할 가능성의 표시를 제공한다. 예를 들어, 참조 핵산에 대한 시험 핵산의 비교에서 가장 작은 합계 공산이 약 0.2 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우에 참조 서열과 유사한 것으로 간주된다.

[0425] 본 발명은 또한 중간 정도로 엄격한 조건(예를 들어, 매우 엄격한 조건하)하에서 (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 번역원형 단편을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 제 2 뉴클레오티드 서열의 상보체에 선택적으로 하이브리드화되는 제 1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로 확대된다.

[0426] 어구 "매우 엄격한 하이브리드화 조건"은 프로브가 통상적으로 핵산의 복잡한 혼합물에서 표적 서브서열에 하이브리드화되나, 다른 서열에는 하이브리드화되지 않는 조건을 의미한다. 매우 엄격한 조건은 서열 의존적이며, 다양한 상황에서 다양할 것이다. 보다 긴 서열은 높은 온도에서 특이적으로 하이브리드화된다. 핵산의 하이브리드화에 대한 광범위한 지침은 문헌[Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridisation and the strategy of nucleic acid assays" (1993)]에서 발견된다. 일반적으로, 매우 엄격한 조건은 정의된 이온 강도 pH에서 특정 서열에 대한 열융점(Tm) 보다 약 5-10°C 낮도록 선택된다. Tm은 표적에 대해 상보적인 프로브의 50%가 평형에서 표적 서열에 하이브리드화되는 온도(규정된 이온 강도, pH, 및 핵 농도)이다(표적 서열이 과량으로 존재함에 따라, Tm에서 프로브의 50%가 평형에서 점유됨). 매우 엄격한 조건은 pH 7.0 내지 8.3에서 염 농도가 약 1.0M 미만의 나트륨 이온, 통상적으로 약 0.01 내지 1.0M 나트륨 이온 농도(또는 다른 염)이고, 온도가 짧은 프로브(예를 들어, 10 내지 50개의 뉴클레오티드)에 대해 약 30°C 이상이고, 긴 프로브(예를 들어, 50 뉴클레오티드 초과)에 대해 약 60°C 이상인 조건일 것이다. 매우 엄격한 조건은 또한 포름아미드와 같은 불안정화제의 첨가로 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 하이브리드화를 위해, 양성 신호는 백그라운드 하이브리드화의 2배 이상, 임의로 백그라운드 하이브리드화에 대해 10배 이상이다.

[0427] 예시적인 매우 엄격한 하이브리드화 조건은 다음과 같을 수 있다: 50% 포름아미드, 5x SSC, 및 1% SDS, 42°C에서의 인큐베이션, 또는 5x SSC, 1% SDS, 65°C에서의 인큐베이션과 함께 65°C에서 0.2x SSC, 및 0.1% SDS에서의 세척.

[0428] 매우 엄격한 조건하에서 서로 하이브리드화되지 않는 핵산은, 이들이 엔코딩하는 폴리펩티드가 실질적으로 동일한 경우에 여전히 기능적으로 동등하다. 이는, 예를 들어, 핵산의 한 카피가 유전 부호에 의해 허용되는 최대 코돈 축퇴성을 이용하여 생성되는 경우에 발생한다. 이러한 경우, 핵산은 통상적으로 중간 정도로 엄격한 하이브리드화 조건하에서 하이브리드화된다.

[0429] 예시적인 "중간 정도로 엄격한 하이브리드화 조건"은 37°C에서의 40% 포름아미드, 1M NaCl, 1% SDS의 완충액에서의 하이브리드화, 및 45°C에서의 1X SSC에서의 세척을 포함한다. 양성 하이브리드화는 백그라운드의 2배 이상이다. 당업자는 유사한 엄격성의 조건을 제공하는 대안적 하이브리드화 및 세척 조건이 이용될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다.

[0430] 구 "선택적(또는 특이적)으로 하이브리드화되는"은 서열이 복합 혼합물(예를 들어, 전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA)로 존재하는 경우에 엄격한 하이브리드화 조건하에서 오직 특정 뉴클레오티드 서열로의 분자의 결합, 이중화 또는 하이브리드화를 의미한다.

[0431] 임의의 경우에서, 폴리펩티드 서열의 변이체는 참조 서열과 본질적으로 동일한 활성을 가질 것이다(폴리뉴클레오티드의 경우, 변이체 폴리뉴클레오티드 서열은 참조 서열과 본질적으로 동일한 활성을 갖는 폴리펩티드를 엔코딩할 것이다). 본질적으로 동일한 활성은 림프구증식을 통한 세포의 활성화, 배양 상층액 내의 사이토카인의 생성(ELISA, CBA 등에 의해 측정됨) 또는 세포내 및 세포외 염색에 의한 T 및 B 세포 반응의 특성구명(예를 들어, 면역 마커, 예를 들어, CD3, CD4, CD8, IL2, TNFα, IFNγ, CD40L, CD69 등에 특이적인 항체를 이용함)을 측정하는 특정 항원을 이용한 PBMC 또는 전체 혈액의 시험관내 재자극 검정(예를 들어, 수시간 내지 2주 이하, 예를 들어, 1일 이하, 1일 내지 1주 또는 1 내지 2주의 기간 동안의 재자극), 및 이후 유세포분석기를 이용한 분석에서 참조 서열의 활성의 50% 이상, 적합하게는 75% 이상, 특히 90% 이상의 활성을 의미한다. 적합하게는, 본질적으로 동일한 활성은 T 세포 증식 및/또는 IFN-감마 생성 검정에서 참조 서열의 활성의 50% 이상, 적합하게는 75% 이상, 특히 90% 이상의 활성을 의미한다.

[0432] **폴리뉴클레오티드 조성물**

- [0433] 본원에 사용된 용어 "누클레오티드"는 특정 종의 전체 유전체 DNA가 없는 분리된 분자를 의미한다. 따라서 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리누클레오티드는, 폴리누클레오티드가 얻어지는 종의 전체 유전체 DNA로부터 실질적으로 분리되거나 상기 유전체 DNA가 없게 정제되는 하나 이상의 코딩 서열을 함유하는 폴리누클레오티드 세그먼트를 의미한다.
- [0434] 당업자에 의해 이해될 것이지만, 본 발명에서 사용되는 폴리누클레오티드는 유전체 서열, 유전체의 서열 및 플라스미드 엔코딩된 서열, 및 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 등을 발현하거나 발현하도록 적합될 수 있는 더욱 작은 유전공학 처리된 유전자 세그먼트를 포함할 수 있다. 그러한 세그먼트는 자연적으로 분리되거나 수작업에 의해 합성적으로 변형될 수 있다.
- [0435] 본원에 사용된 "분리된"은 폴리누클레오티드가 실질적으로 다른 코딩 서열로부터 멀리 위치하며, 폴리누클레오티드가 관련되지 않은 코딩 DNA의 큰 부분, 예를 들어, 큰 크로모솜 단편 또는 다른 기능성 유전자 또는 폴리펩티드 코딩 영역을 함유하지 않음을 의미한다. 분리된 핵산은 유전자에 접하고 유전자 이외의 단백질을 엔코딩하는 다른 열린해독틀로부터 분리된다. 물론, 이는 원래 분리된 DNA 세그먼트를 의미하며, 수작업에 의해 뒤에 세그먼트에 첨가된 유전자 또는 코딩 영역을 배제하지는 않는다.
- [0436] 당업자에 의해 인식될 것이지만, 폴리누클레오티드는 단일 가닥(코딩 또는 안티센스)이거나 이중 가닥일 수 있고, DNA(유전체, cDNA 또는 합성) 또는 RNA(분자일 수 있다. RNA 분자는 인트론을 함유하며 일대일 방식으로 DNA 분자에 상응하는 HnRNA 분자, 및 인트론을 함유하지 않는 mRNA 분자를 포함한다. 추가의 코딩 또는 비코딩 서열은 본 발명의 폴리누클레오티드 내에 존재할 수 있지만 반드시 그래야 하는 것은 아니며, 폴리누클레오티드는 다른 분자 및/또는 지지 물질에 결합될 수 있지만 이 또한 반드시 그래야 하는 것은 아니다.
- [0437] 폴리누클레오티드는 자연 서열(즉, *미코박테리움* 항원 또는 이의 일부를 엔코딩하는 내인성 서열)을 포함할 수 있거나, 이 서열의 변이체, 또는 생물학적이거나 기능적인 등가물을 포함할 수 있다. 폴리누클레오티드 변이체는 이하에 추가로 설명한 대로 바람직하게는 엔코딩된 폴리펩티드의 번역원성이 참조 단백질에 비해 감소되지 않도록, 하나 이상의 치환, 첨가, 결실 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 엔코딩된 폴리펩티드의 번역원성에 대한 효과는 일반적으로 본원에서 설명한 바와 같이 평가될 수 있다.
- [0438] 추가의 구체예에서, 본 발명은 본원에 기술된 하나 이상의 서열과 동일하거나 이에 대해 상보적인 서열의 다양한 길이의 연속 스트레치를 포함하는 분리된 폴리누클레오티드 및 폴리펩티드를 제공한다. 예를 들어, 본원에 개시된 참조 서열의 적어도 약 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 또는 1000개 이상 뿐만 아니라 이들 사이에서의 모든 중간 길이의 연속 누클레오티드를 포함하는 폴리누클레오티드가 본 발명에 의해 제공된다. 이러한 상황에서 "중간 길이"는 인용된 값 사이에서의 임의의 길이, 예를 들어, 30, 31, 32 등; 50, 51, 52, 53 등; 100, 101, 102, 103 등; 150, 151, 152, 153 등; 200 내지 500, 500 내지 1000 등 사이에서의 모든 정수를 의미하는 것으로 용이하게 이해될 것이다.
- [0439] 또한, 유전 부호의 축퇴성의 결과로, 본원에 기술된 폴리펩티드를 엔코딩하는 많은 누클레오티드 서열이 존재함이 당업자에 의해 인지될 것이다. 이러한 폴리누클레오티드 일부는 임의의 자연 유전자의 누클레오티드 서열에 대해 비교적 적은 동일성을 갖는다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용빈도에서의 차로 달라지는 폴리누클레오티드, 예를 들어 인간 및/또는 영장류의 코돈 선택에 대해 최적화된 폴리누클레오티드가 본 발명에 의해 특히 고려된다. 추가로, 본원에서 제공된 폴리누클레오티드 서열을 포함하는 유전자의 대립유전자가 본 발명의 범위에 속한다. 대립유전자는 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어, 누클레오티드의 결실, 첨가 및/또는 치환의 결과로 변경되는 내인성 유전자이다. 생성되는 mRNA 및 단백질은 변경된 구조 또는 기능을 가질 수 있지만 반드시 요구되는 것은 아니다. 대립유전자는 표준 기술(예를 들어, 하이브리드화, 증폭 및/또는 데이터베이스 서열 비교)을 사용하여 확인될 수 있다.
- [0440] **폴리누클레오티드 확인 및 특성화**
- [0441] 폴리누클레오티드는 다양한 널리 확립된 기술 중 임의의 것을 사용하여 확인, 제조 및/또는 조작될 수 있다. 예를 들어, 폴리누클레오티드는 하기에 더욱 구체적으로 설명한 바와 같이 cDNA의 마이크로어레이를 스크리닝함으로써 확인될 수 있다. 그러한 스크리닝은, 예를 들어, 제조업자의 설명서에 따라 (및 필수적으로 문헌[Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10614-10619 (1996) 및 Heller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2150-2155 (1997)]에 기재된 바와 같이) 신테니(Synteni) 마이크로어레이(캘리포니아, 팔로알토)를 사용하여 실시될 수 있다. 대안적으로, 폴리누클레오티드는 본원에 기재된 단백질을 발현하는 세포, 예를 들어, *M. 투베르쿨로시스* 세포로부터 제조된 cDNA로부터 증폭될 수 있다. 이러한 폴리누클레오티드는 중합효소연쇄반응

(PCR)을 통해 증폭될 수 있다. 이 방법을 위해, 서열 특이적인 프라이머가 본원에 제공된 서열을 기초로 설계될 수 있고, 구매되거나 합성될 수 있다.

[0442] 폴리뉴클레오티드의 증폭된 부분은 널리 공지된 기술을 사용하여 적합한 라이브러리(예를 들어, *M. 루베르쿨로시스* cDNA 라이브러리)로부터 전장 유전자를 분리시키는데 사용될 수 있다. 그러한 기술 내에서, 라이브러리(cDNA 또는 유전체)가 증폭에 적합한 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 프로브 또는 프라이머를 사용하여 스크리닝된다. 바람직하게는, 하나의 라이브러리가 더욱 큰 분자를 포함하도록 사이즈 선택된다. 무작위 프라이밍된 라이브러리가 또한 유전자의 5' 및 업스트림 영역을 확인하는데 바람직할 수 있다. 유전체 라이브러리가 인트론을 얻고 5' 서열을 연장시키는데 바람직하다.

[0443] 하이브리드화 기술을 위해서는, 부분적인 서열이 널리 공지된 기술을 사용하여 (예를 들어, 닉-번역(nick-translation) 또는 ³²P를 사용한 말단-라벨링에 의해) 라벨링될 수 있다. 이후, 박테리아 또는 박테리오파아지 라이브러리는 일반적으로 변성된 박테리아 콜로니(또는 파아지 플라크를 함유하는 론(lawn))를 함유하는 필터를 라벨링된 프로브로 하이브리드화시킴으로써 스크리닝된다(참고: Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2000)). 하이브리드화 콜로니 또는 플라크가 선택되고 확장되고, DNA가 추가 분석을 위해 분리된다. cDNA 클론은 부분 서열로부터의 프라이머 및 벡터로부터의 프라이머를 사용하여 추가 서열의 양을 결정하기 위해, 예를 들어, PCR에 의해 분석될 수 있다. 제한 맵 및 부분 서열은 하나 이상의 중첩 클론을 확인하기 위해 생성될 수 있다. 이후, 완전 서열이, 일련의 결실 클론을 생성시키는 것을 포함할 수 있는 표준 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 이후, 생성되는 중첩 서열은 단일의 연속 서열 내로 어셈블링될 수 있다. 전장 cDNA 분자는 널리 공지된 기술을 사용하여 적합한 단편을 라이게이션시킴으로써 생성될 수 있다.

[0444] 대안적으로, 부분 cDNA 서열로부터 전장 코딩 서열을 얻기 위한 다수의 증폭 기술이 있다. 이러한 기술에서, 증폭은 일반적으로 PCR을 통해 수행된다. 다수의 시판되는 키트 중 임의 것이 증폭 단계를 실시하는데 사용될 수 있다. 프라이머는, 예를 들어, 당업계에 널리 공지된 소프트웨어를 사용하여 설계될 수 있다. 프라이머는 바람직하게는 길이가 22 내지 30개의 뉴클레오티드로 구성되고, 50% 이상의 GC 함량을 지니며, 약 68°C 내지 72°C의 온도에서 표적 서열로 어닐링된다. 증폭된 영역은 상기한 바와 같이 서열분석될 수 있고, 중첩 서열은 연속 서열 내로 어셈블링될 수 있다.

[0445] 이러한 하나의 증폭 기술은 유전자의 공지된 영역에서 단편을 생성시키기 위해 제한 효소를 사용하는 역 PCR이다[참고: Triglia *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16: 8186 (1988)]. 이후, 상기 단편은 분자내 라이게이션에 의해 원형화되고, 공지된 영역으로부터 유래한 분기 프라이머를 이용한 PCR을 위한 주형으로 사용된다. 대안적인 방법에서, 부분 서열에 인접한 서열은 링커 서열에 대한 프라이머 및 공지된 영역에 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭에 의해 복구될 수 있다. 증폭된 서열은 통상적으로 동일한 링커 프라이머 및 공지된 영역에 특이적인 제 2 프라이머를 사용한 제 2 라운드의 증폭에 적용된다. 공지된 서열로부터 반대 방향에서 신장을 시작하는 2개의 프라이머를 사용하는 이러한 과정에 대한 변형예가 WO 96/38591호에 기재되어 있다. 다른 이러한 기술은 "cDNA 말단의 급속 증폭" 또는 RACE로 공지되어 있다. 이 기술은 공지된 서열의 5' 및 3'인 서열을 확인하기 위해 폴리A 영역 또는 벡터 서열로 하이브리드되는 내부 프라이머 및 외부 프라이머의 사용을 포함한다. 추가의 기술은 포획 PCR(참고: Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic.* 1:111-19 (1991)) 및 위킹 PCR(참고: Parker *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 19: 3055-60 (1991))을 포함한다. 증폭을 사용하는 다른 방법이 또한 전장 cDNA 서열을 얻는데 사용될 수 있다.

[0446] 특정 예에서, 유전자은행으로부터 입수가 가능한 것과 같은 발현된 서열 태그(EST) 데이터베이스로 제공되는 서열의 분석에 의해 전장 cDNA 서열을 얻을 수 있다. 중첩 EST에 대한 연구는 일반적으로 널리 공지된 프로그램(예를 들어, NCBI BLAST 연구)을 사용하여 실시될 수 있고, 이러한 EST는 연속적인 전장 서열을 생성시키는데 사용될 수 있다. 전장 DNA 서열은 또한 유전체 단편의 분석에 의해 얻을 수 있다.

[0447] **숙주 세포 내 폴리뉴클레오티드 발현**

[0448] 폴리뉴클레오티드, 또는 용합 단백질 또는 이의 기능적 등가물을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 단편이 적합한 숙주 세포에서 폴리펩타이드의 발현을 유도하기 위해 재조합 DNA 분자에 사용될 수 있다. 유전자 부호의 본질적인 축퇴성으로 인해서, 실질적으로 동일하거나 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 엔코딩하는 다른 DNA 서열이 생성될 수 있고, 이러한 서열은 소정 폴리펩타이드를 클로닝하고 발현하는데 사용될 수 있다.

[0449] 당업자에 의해 이해되듯이, 일부 예에서 비자연 발생 코돈을 보유하는 폴리펩타이드 엔코딩 뉴클레오티드 서열을 생성시키는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, 특정 원핵 또는 진핵 숙주에 의해 선호된 코돈은 단백질 발현 속

도를 증가시키거나, 바람직한 특성, 예를 들어, 자연 발생 서열로부터 생성된 전사체보다 긴 반감기를 갖는 재조합 RNA 전사체를 생성시키도록 선택될 수 있다.

[0450] 더욱이, 폴리뉴클레오티드 서열은 유전자 생성물의 클로닝, 가공 및/또는 발현을 변형시키는 변경을 포함하거나 이로 제한되지 않는 다양한 이유로, 폴리펩티드 엔코딩 서열을 변경시키기 위해 당업계에 일반적으로 공지된 방법을 이용하여 유전공학 처리될 수 있다. 예를 들어, 무작위 단편화 및 유전자 단편과 합성 올리고뉴클레오티드의 PCR 리어셈블리에 의한 DNA 셔플링(schuffling)이 뉴클레오티드 서열을 유전공학 처리하는데 사용될 수 있다. 또한, 부위 특이적 돌연변이유발이 새로운 제한 위치를 삽입시키고, 당화 패턴을 변경시키고, 코돈 선호도를 변경시키고, 스플라이스 변이체를 생성시키거나, 돌연변이를 유도하는 등을 위해 사용될 수 있다.

[0451] 자연, 변형 또는 재조합 핵산 서열은 용합 단백질을 엔코딩하기 위해 이중 서열에 라이게이션될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 활성의 억제체를 위한 펩티드 라이브러리를 스크리닝하기 위해, 시판되는 항체에 의해 인식될 수 있는 키메라 단백질을 엔코딩하는 것이 유용할 수 있다. 용합 단백질은 또한 폴리펩티드 엔코딩 서열과 이중 단백질 서열 사이에 위치한 절단 부위를 함유하여, 그 결과 폴리펩티드가 이중 부분으로부터 절단되고 정제될 수 있도록 유전공학 처리될 수 있다.

[0452] 요망되는 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열은 당업계에 널리 공지된 화학적 방법(참고: Caruthers, M. H. *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* pp. 215-223 (1980), Horn *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* pp. 225-232 (1980))을 이용하여 부분적으로 또는 전체로 합성될 수 있다. 대안적으로, 단백질 자체는 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 이의 일부를 합성하기 위해 화학적 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 펩티드 합성은 다양한 고체상 기술(참고: Roberge *et al.*, *Science* 269: 202-204 (1995))을 이용하여 수행될 수 있고, 자동화된 합성은, 예를 들어, ABI 431A 펩티드 합성장치(캘리포니아 팔로알토에 소재한 퍼킨 엘머)를 이용하여 수행될 수 있다.

[0453] 새롭게 합성된 펩티드는 분취용의 고성능 액체 크로마토그래피(예를 들어, Creighton, *Proteins, Structures and Molecular Principles* (1983)) 또는 당업계에서 이용가능한 다른 동등한 기술에 의해 실질적으로 정제될 수 있다. 합성 펩티드의 조성은 아미노산 분석 또는 서열분석(예를 들어, 에드만 분해 과정)에 의해 확인될 수 있다. 또한, 폴리펩티드의 아미노산 서열, 또는 이의 임의의 일부는 폴리펩티드 변이체를 생성시키기 위해 직접 합성 동안에 변경되고/되거나, 다른 단백질로부터의 서열 또는 이의 임의의 일부와 화학적 방법을 이용하여 조합될 수 있다.

[0454] 요망되는 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 기능적 등가물이 적합한 발현 벡터, 즉 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역을 위해 필요한 요소를 함유하는 벡터 내로 삽입될 수 있다. 당업자에게 널리 공지된 방법이, 관심있는 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열, 및 적합한 전사 및 번역 조절 요소를 함유하는 발현 벡터를 작제하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법에는 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전자 재조합이 포함된다. 이러한 기술은 문헌[Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2000), 및 Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (매년 업데이트됨))에 기재되어 있다.

[0455] 다양한 발현 벡터/숙주 시스템이 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하고 발현시키는데 사용될 수 있다. 여기에는 재조합 박테리오파지, 플라스미드 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아와 같은 미생물; 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바쿨로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 박테리아 발현 벡터(예를 들어, Ti 또는 pBR322 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템, 또는 동물 세포 시스템이 포함되나 이들로 제한되지 않는다.

[0456] 발현 벡터 내에 존재하는 "조절 요소" 또는 "조절 서열"은, 전사 및 번역을 수행하기 위해 숙주 세포 단백질과 상호작용하는, 벡터의 미번역 영역--인핸서, 프로모터, 5' 및 3' 미번역 영역이다. 이러한 요소는 길이 및 특이성이 달라질 수 있다. 사용되는 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 항시성 및 유도성 프로모터를 포함하는 임의 수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다. 예를 들어, 박테리아 시스템에서 클로닝하는 경우에, PBLUESCRIPT 파아지미드(캘리포니아 라졸라 스트라타젠) 또는 PSPORT1 플라스미드(메릴랜드 가터스버그 김코 비알엘) 등의 하이브리드 lacZ 프로모터와 같은 유도성 프로모터가 사용될 수 있다. 포유동물 세포 시스템에서, 포유동물 유전자 또는 포유동물 바이러스로부터의 프로모터가 일반적으로 바람직하다. 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열의 다수의 카피를 함유하는 세포주를 생성시켜야 하는 경우에, SV40 또는 EBV에 기초한 벡터가 적합하게 선택가능한 마커와 함께 유리하게 사용될 수 있다.

- [0457] 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터가 발현되는 폴리펩티드에 대한 용도에 따라 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체의 유도를 위해 많은 양이 요구되는 경우, 용이하게 정제되는 융합 단백질의 고수준의 발현을 유도하는 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 벡터는 다기능성 *E. 콜리* 클로닝 및 발현 벡터, 예를 들어, 관심 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열이 아미노 말단 Met 및 이후의 β -갈락토시다아제의 7개의 잔기를 위한 서열과 함께 프레임으로 (in frame) 벡터 내에 라이게이션될 수 있어, 하이브리드 단백질이 생성되는 BLUESCRIPT(Stratagene); pIN 벡터(Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509 (1989)) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. pGEX 벡터(Promega, Madison, Wis.)가 또한 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST)와의 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현시키는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이고, 글루타티온-아가로오스 비드로의 흡착 후에 유리 글루타티온의 존재하에서의 용출에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. 이러한 시스템에서 제조된 단백질은 헤파린, 트롬빈, 또는 인자 XA 프로테아제 절단 부위를 포함하여, 클로닝된 관심 폴리펩티드가 원하는 경우 GST 부분으로부터 방출될 수 있도록 설계될 수 있다.
- [0458] 효모인 *사카로마이세스 세레비지애*(*Saccharomyces cerevisiae*)에서, 항시성 또는 유도성 프로모터, 예를 들어, 알파 인자, 알코올 옥시다아제, 및 PGH를 함유하는 다수의 벡터가 사용될 수 있다. 항시성 또는 유도성 프로모터를 함유하는 다른 벡터는 GAP, PGK, GAL 및 ADH를 포함한다. 개관을 위해, 문헌[Ausubel *et al.* (*Supra*) 및 Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153:516-544 (1987) 및 Romas *et al.* *Yeast* 8 423-88 (1992)]을 참조하라.
- [0459] 식물 발현 벡터가 사용되는 경우, 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열의 발현은 다수의 프로모터 중 임의의 프로모터에 의해 유도될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 프로모터, 예를 들어, CaMV의 35S 및 19S 프로모터가 단독으로 사용되거나, TMV로부터의 오메가 선도 서열과 조합되어 사용될 수 있다(Takamatsu, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)). 대안적으로, 식물 프로모터, 예를 들어, RUBISCO의 작은 서브유닛 또는 열충격 프로모터가 사용될 수 있다(Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); Broglie *et al.*, *Science* 224:838-843 (1984); 및 Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105 (1991)). 이러한 작제물은 직접적인 DNA 형질전환 또는 병원체 매개 트랜스펙션에 의해 식물 세포로 도입될 수 있다. 이러한 기술은 다수의 일반적으로 이용가능한 개관에 기재되어 있다(예를 들어, Hobbs *in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology* pp. 191-196 (1992) 참조).
- [0460] 관심 폴리펩티드를 발현시키기 위해 곤충 시스템이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 상기 시스템에서, 스포돔테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포 또는 트리코플루시아 라바에(*Trichoplusia larvae*)에서 외래 유전자를 발현시키기 위한 벡터로서 오토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) 핵 다면체형성 바이러스(AcNPV)가 사용된다. 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열은 바이러스의 비필수 영역, 예를 들어, 폴리헤드린 유전자로 클로닝될 수 있고, 폴리헤드린 프로모터의 조절 하에 위치될 수 있다. 폴리펩티드 엔코딩 서열의 성공적인 삽입은 폴리헤드린 유전자가 비활성이 되도록 하고, 코트 단백질이 결핍된 재조합 바이러스를 생성시킬 것이다. 이후, 재조합 바이러스가, 예를 들어, 관심 폴리펩티드가 발현될 수 있는 *S. 프루기페르다*(*S. frugiperda*) 세포 또는 *트리코플루시아 라바에*(*Trichoplusia larvae*)를 감염시키는데 사용될 수 있다(Engelhard *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3224-3227 (1994)).
- [0461] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스 기반의 발현 시스템이 일반적으로 이용가능하다. 예를 들어, 발현 벡터로서 아데노바이러스가 사용되는 경우, 관심 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열은 후기 프로모터 및 셋으로 나뉜 선도 서열로 구성된 아데노바이러스 전사/번역 복합체로 라이게이션될 수 있다. 바이러스 유전체의 비필수 E1 또는 E3 영역에서의 삽입이 감염된 숙주 세포에서 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 살아 있는 바이러스를 수득하는데 사용될 수 있다(Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3655-3659 (1984)). 또한, 전사 인핸서, 예를 들어, 라우스 육종 바이러스(RSV) 인핸서가 포유동물 숙주 세포에서 발현을 증가시키는데 사용될 수 있다. 아데노바이러스 벡터를 이용한 작업을 위한 방법 및 프로토콜은 문헌[Wold, *Adenovirus Methods and Protocols*, 1998]에서 개관된다. 아데노바이러스 벡터의 사용에 관한 추가 참고사항은 문헌[*Adenovirus: A Medical Dictionary, Bibliography, and Annotated Research Guide to Internet References*, 2004]에서 발견될 수 있다.
- [0462] 관심 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열의 보다 효과적인 번역을 달성하기 위해 특정 개시 신호가 또한 사용될 수 있다. 이러한 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열, 이의 개시 코돈, 및 업스트림 서열이 적절한 발현 벡터로 삽입되는 경우, 추가 전사 또는 번역 조절 신호가 필요하지 않을 수 있다. 그러나, 코딩 서열 또는 이의 일부만이 삽입되는 경우, ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 번역 조절 서열이 제공되어야 한다. 또한, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 정확한 관독 프레임에 위치되어야 한다. 외인성 번역 요소 및 개시 코돈은 자연 및 합성 둘 모두의 다양한 기원으로부터 유래될 수 있다.

사용되는 특정 세포 시스템에 적절한 인핸서의 포함에 의해 발현 효율이 향상될 수 있으며, 이는, 예를 들어, 문헌[Scharf, *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162 (1994)]에 기재된 것을 포함한다.

[0463] 또한, 숙주 세포 균주는 요망되는 방식으로 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 발현된 단백질을 가공하는 능력에 대해 선택될 수 있다. 이러한 폴리펩티드의 변형은 아세틸화, 카르복실화, 당화, 인산화, 지질화, 및 아실화를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 단백질의 "프레프로(prepro)" 형태를 절단하는 번역 후 가공이 또한 정확한 삽입, 폴딩 및/또는 기능을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 상기 번역후 활성을 위한 특정 세포 기구 및 특정한 메커니즘을 갖는 CHO, HeLa, MDCK, HEK293, 및 WI38과 같은 다양한 숙주 세포가 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하기 위해 선택될 수 있다.

[0464] 재조합 단백질의 장기간의 고수율 생성을 위해, 안정적인 발현이 일반적으로 바람직하다. 예를 들어, 관심 폴리뉴클레오티드를 안정적으로 발현하는 세포주가 동일한 벡터 또는 별개의 벡터에 바이러스 복제 기점 및/또는 내인성 발현 요소 및 선택성 마커 유전자를 함유할 수 있는 발현 벡터를 이용하여 형질전환될 수 있다. 벡터의 도입 후, 세포는 선택 배지로 전환되기 전에 영양강화 배지에서 1-2일 동안 성장될 수 있다. 선택성 마커의 목적은 선택에 대한 내성을 부여하기 위한 것이며, 이의 존재는 도입된 서열을 성공적으로 발현하는 세포의 성장 및 회수를 가능케 한다. 안정적으로 형질전환된 세포의 내성 클론은 세포 유형에 적절한 조직 배양 기술을 이용하여 증식될 수 있다.

[0465] 형질전환된 세포주를 회수하기 위해 임의의 수의 선택 시스템이 사용될 수 있다. 이는 tk.sup.- 또는 aprt.sup.- 세포에서 각각 사용될 수 있는 단순헤르페스 바이러스 티미딘 키나아제(Wigler *et al.*, *Cell* 11:223-32 (1977)) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(Lowy *et al.*, *Cell* 22:817-23 (1990)) 유전자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 항대사물질, 항생제 또는 제초제 내성이 선택을 위한 기준으로 사용될 수 있고, 이는, 예를 들어, 메토타렉세이트에 대해 내성을 부여하는 dhfr(Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:3567-70 (1980)); 아미노글리코시드, 네오마이신 및 G-418에 대해 내성을 부여하는 npt(Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150:1-14 (1981)); 및 클로르술푸론 및 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라아제 각각에 대해 내성을 부여하는 als 또는 pat(Murry, 상기)를 포함한다. 추가 선택성 유전자, 예를 들어, 세포가 트립토판 대신 인돌을 이용하도록 하는 trpB, 또는 세포가 히스티딘 대신 히스티놀을 이용하도록 하는 hisD(Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8047-51 (1988))가 기재되어 있다. 최근에, 형질전환체를 확인할 뿐만 아니라 특정 벡터 시스템에 기인한 일시적 또는 안정적 단백질 발현의 양을 정량하는데 널리 사용되는 가시 마커, 예를 들어, 안토시아닌, β-글루쿠로니다아제 및 이의 기질 GUS, 및 루시페라아제 및 이의 기질 루시페린과 같은 마커의 사용이 인기를 얻고 있다(Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55:121-131 (1995)).

[0466] 마커 유전자 발현의 존재/부재는 관심 유전자가 또한 존재하는 것을 암시하지만, 이의 존재 및 발현은 확인될 필요가 있다. 예를 들어, 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열이 마커 유전자 서열 내에 삽입되는 경우, 서열을 함유하는 재조합 세포가 마커 유전자 기능의 부재에 의해 확인될 수 있다. 대안적으로, 마커 유전자는 단일 프로모터의 조절 하에서 폴리펩티드 엔코딩 서열과 일렬로(in tandem) 배치될 수 있다. 유도 또는 선택에 대한 마커 유전자의 발현은 보통 탠덤 유전자의 발현을 또한 나타낸다.

[0467] 대안적으로, 요망되는 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하고 발현하는 숙주 세포는 당업자에게 공지된 다양한 절차에 의해 확인될 수 있다. 이러한 절차는 핵산 또는 단백질의 검출 및/또는 정량화를 위한 막, 용액 또는 칩 기반의 기술을 포함하는 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 하이브리드화 및 단백질 바이오검정 또는 면역검정 기술을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0468] 생성물에 특이적인 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 이용한 폴리뉴클레오티드에 의해 엔코딩된 생성물의 발현을 검출하고 측정하는 다양한 프로토콜이 당 분야에 공지되어 있다. 이러한 예는 효소면역측정법(ELISA), 방사선면역측정법(RIA), 및 형광 활성 세포 분리(FACS)를 포함한다. 제공된 폴리펩티드 상의 2개의 비간섭 에피토프에 대해 반응성인 모노클로날 항체를 이용하는 2-부위 모노클로날 기반 면역검정이 일부 응용분야에 바람직할 수 있으나, 경쟁 결합 검정이 또한 사용될 수 있다. 상기 검정 또는 기타 검정이 특히 문헌[Hampton *et al.*, *Serological Methods, a Laboratory Manual* (1990) 및 Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158:1211-1216 (1983)]에 기재되어 있다.

[0469] 매우 다양한 라벨 및 컨주게이션 기술이 당업자에게 공지되어 있고, 다양한 핵산 및 아미노산 검정에 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오티드와 관련된 서열을 검출하기 위한 라벨링된 하이브리드화 또는 PCR 프로브를 생성시키기 위한 수단은 올리고라벨링, 닉(nick) 번역, 말단-라벨링 또는 라벨링된 뉴클레오티드를 이용한 PCR 증폭을 포함

한다. 대안적으로, 서열 또는 이의 임의의 일부가 mRNA 프로브의 생성을 위해 벡터로 클로닝될 수 있다. 이러한 벡터는 당 분야에 공지되어 있고, 시판되며, T7, T3 또는 SP6과 같은 적절한 RNA 중합효소 및 라벨링된 뉴클레오타이드의 첨가에 의해 시험관내에서 RNA 프로브를 합성시키는데 사용될 수 있다. 이러한 절차는 다양한 시판되는 키트를 이용하여 수행될 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 리포터 분자 또는 라벨은 방사성핵종, 효소, 형광제, 화학발광제, 또는 색소제 뿐만 아니라 기질, 보조인자, 억제제, 자기 입자 등을 포함한다.

[0470]

관심 폴리뉴클레오타이드 서열로 형질전환된 숙주 세포는 세포 배양으로부터의 단백질의 발현 및 회수에 적합한 조건하에서 배양될 수 있다. 재조합 세포에 의해 생성된 단백질은 서열 및/또는 사용되는 벡터에 따라 분비되거나 세포 내에 함유될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물 세포막을 통한 엔코딩된 폴리펩티드의 분비를 유도하는 신호 서열을 함유하도록 설계될 수 있다. 가용성 단백질의 정제를 촉진하는 폴리펩티드 도메인을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 관심 폴리펩티드를 엔코딩하는 서열을 연결시키기 위해 다른 재조합 작제물이 사용될 수 있다. 이러한 정제 촉진 도메인은 고정된 금속 상에서 정제를 가능케 하는 히스티딘-트립토판 모듈, 고정된 면역글로불린 상에서 정제를 가능케 하는 단백질 A 도메인, 및 FLAGS 신장/친화성 정제 시스템(Immunex Corp., Seattle, Wash.)에서 사용되는 도메인과 같은 금속 킬레이트 펩티드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 정제 도메인과 엔코딩된 폴리펩티드 사이에서 인자 XA 또는 엔테로키나아제(Invitrogen, San Diego, Calif.)에 특이적인 것과 같은 절단가능한 링커 서열의 포함이 정제를 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 발현 벡터는 관심 폴리펩티드, 및 티오레독신 또는 엔테로키나아제 절단 부위에 선행하는 6개의 히스티딘을 엔코딩하는 핵산을 함유하는 융합 단백질의 발현을 제공한다. 히스티딘 잔기는 문헌[Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3:263-281 (1992)]에 기재된 바와 같이 IMIAC(고정 금속 이온 친화성 크로마토그래피)에서의 정제를 촉진하며, 엔테로키나아제 절단 부위는 융합 단백질로부터 요망되는 폴리펩티드를 정제하는 수단을 제공한다. 융합 단백질을 함유하는 벡터의 논의는 문헌[Kroll *et al.*, *DNA Cell Biol.* 12:441-453 (1993)]에 제공된다.

[0471]

생체내 폴리뉴클레오타이드 전달 기술

[0472]

추가 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하는 유전 작제물이 생체내 세포로 도입된다. 이는 다양하거나 널리 공지된 방법 중 임의의 방법을 이용하여 달성될 수 있고, 상기 방법 중 여러 방법은 예시를 위해 하기에 개시된다.

[0473]

1. 아데노바이러스

[0474]

하나 이상의 핵산 서열의 생체내 전달을 위한 바람직한 방법 중 하나는 아데노바이러스 발현 벡터의 사용을 포함한다. "아데노바이러스 발현 벡터"는 (a) 작제물의 패키징을 뒷받침하고, (b) 센스 또는 안티센스 배향으로 벡터에 클로닝된 폴리뉴클레오타이드를 발현시키기에 충분한 아데노바이러스 서열을 함유하는 작제물을 포함하는 것을 의미한다. 물론, 안티센스 작제물의 상황에서, 발현은 유전자 생성물이 합성되는 것을 필요로 하지 않는다.

[0475]

발현 벡터는 아데노바이러스의 유전학적으로 조작된 형태를 포함한다. 36 kb의 선형의 이중가닥 DNA 바이러스인 아데노바이러스의 유전학적 구성의 지식은 아데노바이러스 DNA의 큰 조각의 7 kb 이하의 외래 서열로의 치환을 가능케 한다(Grunhaus & Horwitz, 1992). 레트로바이러스와는 대조적으로, 숙주 세포의 아데노바이러스 감염은 염색체 통합을 발생시키지 않는데, 이는 아데노바이러스 DNA가 잠재적인 유전독성 없이 에피솜 방식으로 복제할 수 있기 때문이다. 또한, 아데노바이러스는 구조적으로 안정적이고, 광범위한 증폭 후에 유전체 재배열이 검출되지 않는다. 아데노바이러스는 실질적으로 세포 주기 단계와 관계 없이 모든 상피세포를 감염시킬 수 있다. 지금까지, 아데노바이러스 감염은 인간에서 급성 호흡기 질병과 같은 가벼운 질병만 연관된 것으로 보인다.

[0476]

아데노바이러스는 중간 크기의 유전체, 조작 용이성, 높은 역가, 광범위한 표적-세포 범위 및 높은 감염성으로 인해 유전자 전달 벡터로서 사용하기에 특히 적합하다. 바이러스 유전체의 양 말단은 100-200 염기쌍의 역위 반복부(ITR)를 함유하고, 이는 바이러스 DNA 복제 및 패키징에 필요한 시스 구성요소이다. 유전체의 초기(E) 및 후기(L) 영역은 바이러스 DNA 복제의 개시에 의해 나뉘지는 상이한 전사 단위를 함유한다. E1 영역(E1A 및 E1B)은 바이러스 유전체 및 소수의 세포 유전자의 전사의 조절을 담당하는 단백질을 엔코딩한다. E2 영역(E2A 및 E2B)의 발현은 바이러스 DNA 복제를 위한 단백질의 합성을 발생시킨다. 이러한 단백질은 DNA 복제, 후기 유전자 발현 및 숙주 세포 셧-오프(shut-off)와 관련이 있다(Renan, 1990). 바이러스 캡시드 단백질의 대부분을 포함하는 후기 유전자의 생성물은 주요 후기 프로모터(MLP)에 의해 발생된 단일 일차 전사체의 현저한 가공 후에만 발현된다. MLP(16.8 m.u.에 위치됨)는 특히 감염의 후기 단계 동안 효과적이고, 상기 프로모터로부터 발

생된 모든 mRNA는 이들을 번역에 바람직한 mRNA로 만드는 5'-셋으로 나뉜(tripartite) 선도(TPL) 서열을 갖는다.

- [0477] 현재 시스템에서, 재조합 아데노바이러스는 서플 벡터와 프로바이러스 벡터 사이의 상동성 재조합으로부터 발생된다. 2개의 프로바이러스 벡터 사이에서 가능한 재조합으로 인해, 야생형 아데노바이러스가 상기 과정으로부터 발생될 수 있다. 따라서, 개별적 플라크로부터 바이러스의 단일 클론을 분리시키고, 이의 유전체 구조를 시험하는 것이 중요하다.
- [0478] 복제 결함성인 현재 아데노바이러스 벡터의 생성 및 증식은 Ad5 DNA 단편에 의해 인간 배아 신장 세포로부터 형질전환되고, E1 단백질을 항시적으로 발현하는 293으로 명명된 독특한 헬퍼 세포주에 의존한다(Graham *et al.*, 1977). E3 영역은 아데노바이러스 유전체로부터 중요치 않기 때문에(Jones & Shenk, 1978), 293 세포의 도움으로 현재의 아데노바이러스 벡터는 E1, D3 또는 둘 모두의 영역에 외래 DNA를 갖는다(Graham & Prevec, 1991). 사실상, 아데노바이러스는 야생형 유전체의 약 105%를 패키징할 수 있어(Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987), 약 2 kB의 여분의 DNA에 대한 수용량을 제공한다. E1 및 E3 영역에서 대체되는 약 5.5 kB의 DNA와 조합되는 경우, 현재 아데노바이러스 벡터의 최대 수용량은 7.5 kB 이하, 또는 벡터의 전체 길이의 약 15%이다. 아데노바이러스 바이러스 유전체의 80% 이상이 벡터 백본에 남아 있고, 이는 벡터 유발성 세포독성의 공급원이다. 또한, E1-결실 바이러스의 복제 결핍은 불완전하다. 예를 들어, 바이러스 유전자 발현의 누순이 높은 감염다중도(MOI)의 현재 이용가능한 벡터에서 관찰되었다(Mulligan, 1993).
- [0479] 헬퍼 세포주가 인간 배아 신장 세포, 근육 세포, 조혈 세포 또는 다른 인간 배아 중간엽 또는 상피 세포와 같은 인간 세포로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 헬퍼 세포는 인간 아데노바이러스에 허용되는 다른 포유동물 종의 세포로부터 유래될 수 있다. 이러한 세포는, 예를 들어, 베로(Vero) 세포 또는 다른 원숭이 배아 중간엽 또는 상피 세포를 포함한다. 상기 언급된 바와 같이, 현재 바람직한 헬퍼 세포주는 293이다.
- [0480] 문헌[Racher *et al.* (1995)]에는 293 세포를 배양하고, 아데노바이러스를 증식시키는 개선된 방법이 기재되어 있다. 한 포맷에서, 자연 세포 응집물이 100-200 ml의 배지를 함유하는 1리터의 실리콘화 스피너 플라스크(Techno, Cambridge, UK)에 개별적 세포를 접종시킴으로써 성장된다. 40 rpm에서 교반한 후, 트립판 블루를 이용하여 세포 생활력이 평가된다. 또 다른 포맷에서, Fibracel 미세담체(Bibby Sterlin, Stone, UK)(5 g/l)가 하기와 같이 사용된다. 5 ml의 배지에 재현탁된 세포 접종물이 250 ml 에를렌마이어 플라스크 중의 담체(50 ml)에 첨가되고, 1 내지 4시간 동안 가끔씩의 진탕과 함께 정지된 상태로 방치된다. 이후, 배지가 50 ml의 새로운 배지로 대체되고, 진탕이 개시된다. 바이러스 생성을 위해, 세포는 약 80%의 컨플루언스(confluence)로 성장되고, 이시간 이후 배지가 대체(최종 부피의 25%로 대체)되고, 아데노바이러스가 0.05의 MOI로 첨가된다. 배양물은 밤새 정지 상태로 방치되고, 이후 부피가 100%로 증가되고, 또 다른 72시간 동안 진탕이 개시된다.
- [0481] 아데노바이러스 벡터가 복제 결함성이거나, 적어도 조건적으로 결함성인 필요조건 외에, 아데노바이러스 벡터의 특성은 본 발명의 성공적인 실시예에 중요한 것으로 생각되지 않는다. 아데노바이러스는 42개의 상이한 공지된 혈청형 또는 서브그룹 A-F 중 임의의 것일 수 있다. 서브그룹 C의 아데노바이러스 타입 5가 본 발명에 사용하기 위한 조건적 복제 결함성 아데노바이러스 벡터를 획득하기 위한 바람직한 출발 물질인데, 이는 아데노바이러스 타입 5가 생화학적 및 유전적 정보의 많은 부분이 공지된 인간 아데노바이러스이며, 벡터로서 아데노바이러스를 이용하는 대부분의 작제물에 통상적으로 사용되었기 때문이다.
- [0482] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에 따른 통상적인 벡터는 복제 결함성이고, 이는 아데노바이러스 E1 영역을 갖지 않을 것이다. 따라서, 이는 E1-코딩 서열이 제거된 위치에 관심 유전자를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입시키기에 가장 편리할 것이다. 그러나, 아데노바이러스 서열 내의 작제물의 삽입 위치는 본 발명에 중요하지 않다. 관심 유전자를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 문헌[Karlsson *et al.* (1986)]에 기재된 바와 같은 E3 대체 벡터 내의 결실된 E3 영역 대신, 또는 헬퍼 세포주 또는 헬퍼 바이러스 보충물 E4 결함성인 E4 영역에 삽입될 수 있다.
- [0483] 아데노바이러스는 성장시키거나 조작하기에 용이하고, 시험관내 및 생체내에서 광범위한 숙주 범위를 나타낸다. 이러한 그룹의 바이러스는 높은 역가, 예를 들어, ml 당 10^9 - 10^{11} 개의 플라크 형성 단위로 수득될 수 있고, 이들은 매우 감염성이다. 아데노바이러스의 생활 주기는 숙주 세포 유전체로의 통합을 필요로 하지 않는다. 아데노바이러스 벡터에 의해 전달된 외래 유전자는 에피솜이며, 따라서 숙주 세포에 대해 낮은 유전독성을 갖는다. 야생형 아데노바이러스를 이용한 백신접종의 연구에서 부작용이 보고되지 않았고(Couch *et al.*, 1963; Top *et al.*, 1971), 이는 생체내 유전자 전달 벡터로서의 안전성 및 치료 잠재성을 입증한다. 아데노바이러스 벡터는 진핵생물 유전자 발현(Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) 및 백신 개발(Grunhaus & Horwitz,

1992; Graham & Prevec, 1992)에 사용되어 왔다. 최근에, 동물 연구는 재조합 아데노바이러스가 유전자 요법에 사용될 수 있음을 암시하였다(Stratford-Perricaudet & Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1993). 다양한 조직으로의 재조합 아데노바이러스 투여 연구는 기관 점적주입(Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), 근육 주사(Ragot *et al.*, 1993), 주위 정맥내 주사(Herz & Gerard, 1993) 및 뇌로의 정위 접종(Le Gal La Salle *et al.*, 1993)을 포함한다.

[0484] 아데노바이러스 벡터는 인간 아데노바이러스로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 이들은 바이러스 벡터가 많은 인간 피검체에서 순환하는 인간 아데노바이러스에 대한 항체의 의해 중화되지 않는 장점을 가질 수 있는 침팬지와 같은 다른 종의 아데노바이러스로부터 유래될 수 있다(예를 들어, Tatsis N *et al* *Gene Therapy* 2006 13:421-429 참조).

[0485] 비교적 흔하지 않아 벡터 자체에 미리 존재하는 면역성이 낮은 수준인 아데노바이러스 타입 35가 개발 중인 특정 결핵 백신에서 전달 시스템으로 사용되었다(예를 들어, Radosevic *et al* *Infection and Immunity* 2007 75(8):4105-4115 참조). 아데노바이러스 타입 35는 또한 전달 벡터로서 본 발명에서 특히 가치가 있을 수 있다.

[0486] 2. 레트로바이러스

[0487] 레트로바이러스는 역전사의 과정에 의해 감염된 세포에서 레트로바이러스의 RNA를 이중 가닥의 DNA로 전환시키는 능력을 특징으로 하는 단일 가닥의 RNA 바이러스 군이다(Coffin, 1990). 이후, 생성된 DNA는 프로바이러스로서 세포 염색체로 안정적으로 통합되고, 바이러스 단백질의 합성을 유도한다. 통합은 수용체 세포에서의 바이러스 유전자 서열의 보존 및 이의 전래를 발생시킨다. 레트로바이러스 유전체는 캡시드 단백질, 중합효소, 및 외피 성분을 각각 코딩하는 3개의 유전자 gag, pol 및 env를 함유한다. gag 유전자로부터 엡스트림에서 발견된 서열은 비리온으로의 유전체의 패키징을 위한 신호를 함유한다. 2개의 긴 말단 반복(LTR) 서열이 바이러스 유전체의 5' 및 3' 말단에 존재한다. 이는 강한 프로모터 및 인핸서 서열을 함유하고, 또한 숙주 세포 유전체 내의 통합에 요구된다(Coffin, 1990).

[0488] 레트로바이러스 벡터를 작제하기 위해, 하나 이상의 관심 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 엔코딩하는 핵산이 복제 결합성인 바이러스를 생성시키기 위해 특정 바이러스 서열의 위치의 바이러스 유전체에 삽입된다. 비리온을 생성시키기 위해, gag, pol 및 env 유전자를 함유하나, LTR 및 패키징 성분을 갖지 않는 패키징 세포주가 작제된다(Mann *et al.*, 1983). 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열과 함께 cDNA를 함유하는 재조합 플라스미드가 세포주로 도입(예를 들어, 인산칼슘 침전에 의한)되는 경우, 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자로 패키징된 후, 배지로 분비되도록 한다(Nicolas & Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). 이후, 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지가 수거되고, 임의로 농축되고, 유전자 전달에 사용된다. 레트로바이러스 벡터는 광범위한 세포 유형을 감염시킬 수 있다. 그러나, 통합 및 안정적인 발현은 숙주 세포의 분열을 필요로 한다(Paskind *et al.*, 1975).

[0489] 레트로바이러스 벡터의 특정 표적화를 가능케 하도록 설계된 신규한 방법이 바이러스 외피로의 락토오스 잔기의 화학적 첨가에 의한 레트로바이러스의 화학적 변형을 기초로 하여 최근에 개발되었다. 이러한 변형은 시알로당 단백질(sialoglycoprotein) 수용체를 통한 간세포의 특정 감염을 허용할 수 있다.

[0490] 레트로바이러스 외피 단백질 및 특정 세포 유형체에 대한 비오틴닐화된 항체가 사용되는 재조합 레트로바이러스를 표적으로 하는 다양한 방법이 사용되었다. 항체가 스트렙타비딘을 이용함으로써 비오틴 성분을 통해 커플링되었다(Roux *et al.*, 1989). 구조적 복합 복합체 클래스 I 및 클래스 II 항원에 대한 항체를 이용하여, 시험관 내에서 동종숙주역(ecotropic) 바이러스를 이용하여 표면 항원을 천공시키는 다양한 인간 세포의 감염이 입증되었다(Roux *et al.*, 1989).

[0491] 3. 아데노-관련 바이러스

[0492] AAV(Ridgeway, 1988; Hermonat & Muzycska, 1984)는 아데노바이러스 스톱의 오염으로 발견된 파로바이러스(parovirus)이다. 이는 임의의 질병과 관련되지 않는 편재성 바이러스(미국 인간 집단의 85%에 항체가 존재함)이다. 이는 또한 데펜도바이러스(dependovirus)로 분류되는데, 이는 이의 복제가 아데노바이러스와 같은 헬퍼 바이러스의 존재에 의지하기 때문이다. 5개의 혈청형이 분리되었고, 이중 AAV-2가 가장 특성규명화되어 있다. AAV는 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3으로 캡슐화되어, 20 내지 24 nm 직경의 20면체 비리온을 형성하는 단일 가닥 선형 DNA를 갖는다(Muzyczka & McLaughlin, 1988).

[0493] AAV DNA는 약 4700개의 염기 길이이다. 이는 2개의 열린해독틀을 함유하고, 2개의 ITR이 인접하고 있다. AAV

유전체에는 2개의 주요 유전자인 rep 및 cap가 존재한다. rep 유전자는 바이러스 복제를 담당하는 단백질을 코딩하고, cap는 캡시드 단백질 VP1-3을 코딩한다. 각각의 ITR은 T 형태의 헤어핀 구조를 형성한다. 이러한 말단 반복부는 염색체 통합을 위한 AAV의 유일한 필수 시스 요소이다. 따라서, AAV는 제거되는 모든 바이러스 코딩 서열을 갖는 벡터로 사용될 수 있고, 전달을 위한 유전자의 카세트에 대체될 수 있다. 3개의 바이러스 프로모터가 확인되었고, 맵 위치에 따라 p5, p19 및 p40으로 명명되었다. p5 및 p19로부터의 전사는 rep 단백질을 생성시키고, p40으로부터의 전사는 캡시드 단백질을 생성시킨다(Hermonat & Muzyczka, 1984).

[0494] 연구자가 발현 벡터로서 rAAV를 이용할 가능성을 연구하도록 촉구하는 여러 요인이 존재한다. 이중 하나는 유전자를 숙주 염색체로 통합시키기 위해 전달하기 위한 필요조건이 놀랍게도 소수라는 점이다. AAV 유전체의 단지 6%인 145-bp의 ITR을 갖는 것이 요구된다. 이는 4.5-kb DNA 삽입물을 어셈블리하는 벡터 내에 공간을 남긴다. 이러한 적재 능력은 AAV를 대량의 유전자를 전달하는 것으로부터 방지하면서, 안티센스 작제물을 전달하기에 충분히 적합하다.

[0495] AAV는 또한 안정성으로 인해 전달 비히클의 우수한 선택이다. 비교적 복잡한 구조 메커니즘이 존재하며; 야생형 아데노바이러스 뿐만 아니라 AAV 유전자가 rAAV를 동원하기 위해 요구된다. 마찬가지로, AAV는 병원성이 아니며, 임의의 질병과 연관되지 않는다. 바이러스 코딩 서열의 제거는 바이러스 유전자 발현에 대한 면역 반응을 최소화시키며, 따라서 rAAV는 염증 반응을 유발하지 않는다.

[0496] 4. 발현 작제물로서의 기타 바이러스 벡터

[0497] 숙주 세포로의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 전달을 위한 본 발명에서의 발현 작제물로서 기타 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 백시니아 바이러스(Ridgeway, 1988; Coupar et al., 1988), 렌티바이러스, 폴리오 바이러스 및 헤르페스 바이러스와 같은 바이러스로부터 유래된 벡터가 사용될 수 있다. 기타 폭스바이러스 유래 벡터, 예를 들어, 조류-폭스 유래 벡터가 사용되는 것이 예상될 수 있다. 이들은 다양한 포유동물 세포에 대한 여러 매력적인 특징을 제공한다(Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990).

[0498] 결합성 B형 간염 바이러스의 최근의 인지와 함께, 다양한 바이러스 서열의 구조-기능 상관관계에 대한 새로운 통찰이 획득되었다. 시험관내 연구는 바이러스가 이의 유전체의 80% 이하의 결실에도 불구하고 헬퍼 의존성 패키징 및 역전사에 대한 능력을 유지할 수 있음을 나타내었다(Horwich et al., 1990). 이는 유전체의 많은 부분이 외래 유전 물질로 대체될 수 있음을 암시한다. hepatotropism 및 지속성(통합)이 간 특이적 유전자 전달에 대한 매력적인 특성이다. 문헌[Chang et al. (1991)]에서는 중합효소, 표면 코딩 서열 및 전-표면(pre-surface)코딩 서열의 위치에 오리 B형 간염 바이러스 유전체로 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT) 유전자를 도입시켰다. 조류 간세포주로 야생형 바이러스와 함께 공동트랜스펙션되었다. 높은 역가의 재조합 바이러스를 함유하는 배양 배지가 일차 새끼오리 간세포를 감염시키는데 사용되었다. 안정적인 CAT 유전자 발현이 적어도 트랜스펙션 24일 후에 검출되었다(Chang et al., 1991).

[0499] 추가적인 "바이러스" 벡터는 바이러스 유사 입자(VLP) 및 과아지를 포함한다.

[0500] 5. 비-바이러스 벡터

[0501] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 달성하기 위해, 발현 작제물은 세포로 전달되어야 한다. 이러한 전달은 세포주를 형질전환시키기 위한 실험실 절차로서 시험관내, 또는 특정 질병 상태의 치료로서 생체내 또는 생체외에서 달성될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 전달을 위한 한 바람직한 메커니즘은 발현 작제물이 감염성 바이러스 입자 내에 캡슐화되는 바이러스 감염을 통하는 것이다.

[0502] 발현 작제물이 세포로 전달된 후, 요망되는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 엔코딩하는 핵산이 다양한 부위에 위치되고 발현될 수 있다. 특정 구체예에서, 작제물을 엔코딩하는 핵산이 세포의 유전체로 안정적으로 통합될 수 있다. 이러한 통합은 상동 재조합(유전자 교환)을 통해 특정 위치 및 배향으로 존재할 수 있거나, 무작위의 비특이적 위치로 통합(유전자 보강)될 수 있다. 또 다른 추가 구체예에서, 핵산은 DNA의 별개의 에피솜 세그먼트로서 세포 내에서 안정적으로 유지될 수 있다. 이러한 핵산 세그먼트 또는 "에피솜"은 숙주 세포 주기에 의존적이거나 상기 숙주 세포 주기와 동기화된 유지 및 복제를 가능케 하기에 충분한 서열을 엔코딩한다. 발현 작제물이 세포로 전달되는 방법 및 핵산이 세포 내에 어디에서 유지되는지는 사용되는 발현 작제물의 유형에 좌우된다.

[0503] 본 발명의 특정 구체예에서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 작제물은 간단히 네이키드 재조합 DNA 또는 플라스미드로 구성된다. 작제물의 전달은, 예를 들어, 세포막을 물리

적 또는 화학적으로 투과화시키는 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 이는 시험관내 전달에 특히 적용가능하나, 이는 또한 생체내 사용에도 적용될 수 있다. 문헌[Dubensky et al. (1984)]에서는 인산칼슘 침전물 형태의 폴리오마바이러스 DNA를 성체 및 신생아 마우스의 간 및 비장에 성공적으로 주사하였고, 이는 활성 바이러스 복제 및 급성 감염을 나타내었다. 문헌[Benvenisty & Reshef (1986)]에서는 또한 인산칼슘 침전된 플라스미드의 직접적인 복막내 주사가 트랜스펙션된 유전자를 발현시키는 것을 입증하였다. 관심 유전자를 엔코딩하는 DNA가 또한 생체내에서 유사한 방식으로 전달되고, 유전자 생성물을 발현할 수 있는 것이 예견된다.

[0504] 네이키드 DNA 발현 작제물을 세포로 전달하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예는 입자 붐바드먼트(bombardment)를 포함할 수 있다. 이러한 방법은 DNA 코팅된 미세발사체를 높은 속도로 가속화시켜 이들을 세포막을 관통하여 세포막을 사멸시키지 않고 세포로 진입하도록 하는 능력에 의존한다(Klein et al., 1987). 작은 입자를 가속화시키기 위한 여러 장치가 개발되었다. 하나의 이러한 장치는 전류를 발생시켜, 차례로 동력을 제공하는 고전압 방출에 의존한다(Yang et al., 1990). 사용되는 미세발사체는 생물학적 비활성 물질, 예를 들어, 텅스텐 또는 금 비드로 구성된다.

[0505] 래트 및 마우스의 간, 피부 및 근육 조직을 포함하는 선택 기관이 생체내에서 붐바딩(bombarding)된다(Yang et al., 1990; Zelenin et al., 1991). 이는 붐바드먼트 총과 표적 기관 사이에 임의의 개재된 조직을 제거하기 위해 조직 또는 세포의 수술적 노출, 즉, 생체의 치료를 필요로 할 수 있다. 또한, 미립자 유전자를 엔코딩하는 DNA가 상기 방법을 통해 전달될 수 있고, 여전히 통합될 수 있다.

[0506] 전달 방법으로서 박테리아, 특히 BCG가 또한 사용될 수 있다(예를 들어, 리스테리아, W02004/11048호 참조).

[0507] **폴리펩티드 조성물**

[0508] 본 발명은 다른 양태에서 폴리펩티드 조성물을 제공한다.

[0509] 일반적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 분리된 폴리펩티드(즉, 보통 자연 발견될 수 있는 구성요소로부터 구별된 폴리펩티드)일 것이다.

[0510] 예를 들어, 자연 발생 단백질은 자연계에서 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 구별되는 경우에 분리된다. 바람직하게는, 이러한 폴리펩티드는 약 90% 이상 순수하며, 바람직하게는 약 95% 이상, 가장 바람직하게는 약 99% 이상 순수하다. 예를 들어, 자연 환경의 일부가 아닌 벡터로 클로닝되는 경우에 폴리뉴클레오티드는 분리된 것으로 간주된다.

[0511] 폴리펩티드는 다양한 널리 공지된 기술 중 임의의 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 기재된 바와 같은 DNA 서열에 의해 엔코딩된 재조합 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 다양한 발현 벡터 중 임의의 벡터를 이용하여 DNA 서열로부터 용이하게 제조될 수 있다. 발현은 재조합 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA 분자를 함유하는 발현 벡터로 형질전환되거나 트랜스펙션된 임의의 적절한 숙주 세포에서 달성될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 및 고등한 진핵생물 세포, 예를 들어, 포유동물 세포 및 식물 세포를 포함한다. 바람직하게는, 사용되는 숙주 세포는 E. 콜리, 효모 또는 포유동물 세포주, 예를 들어, COS 또는 CHO이다. 배양 배지로 재조합 단백질 또는 폴리펩티드를 분비하는 적합한 숙주/벡터 시스템으로부터 상층액이 시판되는 필터를 이용하여 먼저 농축될 수 있다. 농축 후, 농축액은 적합한 정제 매트릭스, 예를 들어, 친화성 매트릭스 또는 이온 교환 수지에 적용될 수 있다. 최종적으로, 하나 이상의 역상 HPLC 단계가 재조합 폴리펩티드를 추가로 정제하기 위해 사용될 수 있다.

[0512] 본 발명의 폴리펩티드, 이의 면역원성 단편, 및 약 100개 미만의 아미노산, 및 일반적으로 약 50개 미만의 아미노산을 갖는 변이체가 또한 당업자에게 널리 공지된 기술을 이용하여 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 이러한 폴리펩티드는 시판되는 고상 기술 중 임의의 기술, 예를 들어, 메리필드(Merrifield) 고상 합성 방법을 이용하여 합성될 수 있고, 여기서 아미노산이 성장하는 아미노산 사슬에 연속적으로 첨가된다. 문헌[Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146 (1963)]을 참조하라. 폴리펩티드의 자동화된 합성을 위한 장치는 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)/어플라이드 바이오시스템즈 디비전(Applied BioSystems Division)(Foster City, CA)사와 같은 공급업체에서 시판되고, 제조업체의 설명서에 따라 수행될 수 있다.

[0513] 특정한 특정 구체예에서, 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 다수의 폴리펩티드를 포함하거나, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 폴리펩티드, 및 관련되지 않은 서열(예를 들어, 과산화물, 결핵 및 간염 단백질을 포함함)을 포함하는 융합 단백질일 수 있다(예를 들어, Stoute et al., New Engl. J. Med. 336:86-91 (1997) 참조). 예를 들어, 융합 파트너는 T 헬퍼 에피토프(면역학적 융합 파트너), 바람직하게는 인간에 의해 인지되는 T 헬퍼 에피토프를 제공하는 것을 도울 수 있거나, 자연 재조합 단백질보다 높은 수율로 단백질을 발현(발현 중

관계)하는 것을 도울 수 있다. 특정한 바람직한 융합 파트너는 면역학적 및 발현 향상 융합 파트너 둘 모두이다. 단백질의 가용성을 증가시키거나, 요망되는 세포내 구획으로 단백질이 표적화되는 것을 가능케 하기 위해 다른 융합 파트너가 선택될 수 있다. 또 다른 추가 융합 파트너는 단백질의 정제를 촉진하는 친화성 태그(tag)를 포함한다.

[0514] 융합 단백질은 일반적으로 화학적 건유게이션을 포함하는 표준 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 바람직하게는, 융합 단백질은 발현 시스템에서 융합되지 않은 단백질에 비해 증가된 수준의 생성을 가능케 하는 재조합 단백질로 발현된다. 간략히, 폴리펩티드 성분을 엔코딩하는 DNA 서열은 개별적으로 어셈블리될 수 있고, 적절한 발현 벡터로 라이게이션될 수 있다. 하나의 폴리펩티드 성분을 엔코딩하는 DNA 서열의 3' 말단은 펩티드 링커의 존재 또는 부재하에서 제 2의 폴리펩티드 성분을 엔코딩하는 DNA 서열의 5' 말단에, 상기 서열의 해독틀이 일치하도록 라이게이션된다. 이는 둘 모두의 성분의 폴리펩티드의 생물학적 활성을 보유하는 단일한 융합 단백질로의 번역을 가능케 한다.

[0515] 각각의 폴리펩티드가 이의 이차 및 삼차 구조로 폴딩되는 것을 보장하기에 충분한 거리로 제 1 및 제 2 폴리펩티드 성분을 분리시키기 위해 펩티드 링커 서열이 사용될 수 있다. 이러한 펩티드 링커 서열은 당 분야에 널리 공지된 표준 기술을 이용하여 융합 단백질로 통합된다. 적합한 펩티드 링커 서열은, (1) 유연한 연장된 형태를 채택하는 능력; (2) 제 1 및 제 2 폴리펩티드 상의 기능성 에피토프와 상호작용할 수 있는 이차 구조를 채택하지 않는 능력; 및 (3) 폴리펩티드 기능성 에피토프와 반응하는 소수성 또는 하전된 잔기의 결핍과 같은 요인에 기초하여 선택될 수 있다. 바람직한 펩티드 링커 서열은 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 함유한다. 다른 인접한 중성 아미노산, 예를 들어, Thr 및 Ala가 또한 링커 서열로 사용될 수 있다. 링커로 유용하게 사용될 수 있는 아미노산 서열은 문헌[Maratea et al., Gene 40:39-46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986); 미국 특허 제4,935,233호 및 미국 특허 제4,751,180호]에 기재된 것을 포함한다. 링커 서열은 일반적으로 1 내지 약 50개의 아미노산 길이일 수 있다. 제 1 및 제 2 폴리펩티드가 기능성 도메인을 분리시키고 입체 간섭을 방지하는데 사용될 수 있는 비필수 N-말단 아미노산 영역을 갖는 경우에 링커 서열이 필요하지 않다.

[0516] 바람직한 구체예에서, 면역학적 융합 파트너는 그람-음성 박테리아 헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenza) B의 표면 단백질인 단백질 D로부터 유래한다(WO 91/18926). 바람직하게는, 단백질 D 유도체는 단백질의 대략 1/3(예를 들어, N-말단 처음의 100-110개의 아미노산)을 포함하고, 단백질 D 유도체는 지질화될 수 있다. 특정한 바람직한 구체예에서, 지질단백질 D 융합 파트너의 처음 109개의 잔기가 N-말단에 포함되어, 추가의 외인성 T-세포 에피토프를 갖는 폴리펩티드를 제공하고, E. 콜리에서 발현 수준을 증가시킨다(따라서, 발현 향상제로 작용함). 지질 꼬리는 항원 제시 세포로의 항원의 최적의 제시를 보장한다. 다른 융합 파트너는 인플루엔자 바이러스, NS1(헤마글루티닌)으로부터의 비구조 단백질을 포함한다. 통상적으로, N-말단의 81개의 아미노산이 사용되나, T-헬퍼 에피토프를 포함하는 다양한 단편이 사용될 수 있다.

[0517] 또 다른 구체예에서, 면역학적 융합 파트너는 LYTA로 공지된 단백질 또는 이의 일부(바람직하게는, C-말단 부분)이다. LYTA는 아미다아제 LYTA로 공지된 N-아세틸-L-알라닌 아미다아제(LytA 유전자에 의해 엔코딩됨; Gene 43:265-292 (1986))를 합성하는 스트렙토코쿠스 뉴모니에(Streptococcus pneumoniae)로부터 유래된다. LYTA는 펩티도글리칸 백본에서 특정 결합을 특이적으로 분해시키는 자가용해소이다. LYTA 단백질의 C-말단 도메인은 콜린, 또는 DEAE와 같은 일부 콜린 유사체로의 친화성을 담당한다. 융합 단백질의 발현에 유용한 E. 콜리 C-LYTA 발현 플라스미드의 개발을 위해 상기 특성이 활용되었다. 아미노산 말단에서 C-LYTA 단편을 함유하는 하이브리드 단백질의 정제가 기재되었다(Biotechnology 10:795-798 (1992) 참조). 바람직한 구체예에서, LYTA의 반복 부분이 융합 단백질에 통합될 수 있다. 반복 부분은 잔기 178에서 시작하는 C-말단 영역에서 발견된다. 특히 바람직한 반복 부분은 잔기 188-305를 통합한다.

[0518] T 세포

[0519] 면역치료 조성물은 또한, 또는 대안적으로, 미코박테리움 항원에 특이적인 T 세포를 포함할 수 있다. 이러한 세포는 일반적으로 표준 절차를 이용하여 시험관내 또는 생체외에서 제조될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 시판되는 세포 분리 시스템, 예를 들어, 넥셀 써라퓨틱스, 인크(Nexell Therapeutics, Inc.)(Irvine, CA)사에서 시판되는 이소렉스™(Isolex™) 시스템을 이용하여 환자의 골수, 말초 혈액, 또는 골수 또는 말초 혈액의 분획으로부터 분리될 수 있다(미국 특허 제5,240,856호; 미국 특허 제5,215,926호; WO 89/06280호; WO 91/16116호 및 WO 92/07243호 참조). 대안적으로, T 세포는 관련 또는 관련되지 않은 인간, 비-인간 포유동물, 세포주 또는 배양물로부터 유래될 수 있다.

- [0520] T 세포는 본 발명의 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및/또는 상기 폴리펩티드를 발현하는 항원 제시 세포(APC)로 자극될 수 있다. 이러한 자극은 폴리펩티드에 특이적인 T 세포의 생성을 허용하기에 충분한 조건 및 시간으로 수행된다. 바람직하게는, 특정 T 세포의 생성을 촉진하기 위해 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 전달 비히클, 예를 들어, 미세구 내에 존재한다.
- [0521] T 세포는 T 세포가 특이적으로 증식하고, 사이토카인을 분비하거나, 폴리펩티드로 코팅되거나 폴리펩티드를 엔코딩하는 유전자를 발현하는 표적 세포를 사멸시키는 경우에 본 발명의 폴리펩티드에 대해 특이적인 것으로 간주된다. T 세포 특이성은 다수의 표준 기술 중 임의의 기술을 이용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 크로뮴 방출 검정 또는 증식 검정에서, 음성 대조군에 비한 용해 및/또는 증식에서의 2배 이상의 증가의 자극 지수가 T 세포 특이성을 나타낸다. 이러한 검정은, 예를 들어, 문헌[Chen et al., Cancer Res. 54:1065-1070 (1994)]에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 대안적으로, T 세포 증식의 검출은 다양한 공지된 기술에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, T 세포 증식은 DNA 합성의 증가된 속도를 측정(예를 들어, 삼중수소화된 티미딘을 이용한 T 세포의 펄스-라벨링 배양, 및 DNA로 혼입된 삼중수소화된 티미딘의 양의 측정에 의한)함으로써 검출될 수 있다. 3-7일 동안의 본 발명의 폴리펩티드(100 ng/ml - 100 mg/ml, 바람직하게는 200 ng/ml - 25 mg/ml)와의 접촉은 T 세포의 증식에서 2배 이상의 증가를 발생시킬 것이다. 2-3시간 동안의 상기 기재된 바와 같은 접촉은 표준 사이토카인 검정을 이용하여 측정시 T 세포의 활성화를 발생시킬 것이고, 여기서 사이토카인 방출(예를 들어, TNF 또는 IFN- γ) 수준의 2배 증가는 T 세포 활성화를 나타낸다(Coligan et al., Current Protocols in Immunology, vol. 1 (1998) 참조). 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 발현 APC에 반응하여 활성화된 T 세포는 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺일 수 있다. 단백질 특이적 T 세포는 표준 기술을 이용하여 확장될 수 있다. 바람직한 구체예에서, T 세포는 환자, 관련 공여자 또는 관련되지 않은 공여자로부터 유래되고, 자극 및 확장 후에 환자에 투여된다.
- [0522] 치료를 위해, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 APC에 반응하여 증식하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포는 시험관내 또는 생체내에서 수가 확장될 수 있다. 시험관내에서의 상기 T 세포의 증식은 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 T 세포 성장 인자, 예를 들어, 인터루킨-2, 및/또는 폴리펩티드를 합성하는 자극제 세포의 존재 또는 부재하에서 폴리펩티드, 또는 상기 폴리펩티드의 면역원성 부분에 해당하는 짧은 펩티드에 다시 노출될 수 있다. 대안적으로, 단백질의 존재하에서 증식하는 하나 이상의 T 세포는 클로닝에 의해 수가 확장될 수 있다. 세포를 클로닝하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 제한 희석을 포함한다.
- [0523] **약학적 조성물**
- [0524] 추가 구체예에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, T 세포 및/또는 항체 조성물은 세포 또는 동물의 투여를 위해 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료 방식과 함께 약학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 용액으로 제형화될 것이다.
- [0525] 요망시, 본원에 기재된 폴리펩티드를 발현하는 핵산 세그먼트(예를 들어, RNA 또는 DNA)가 다른 작용제, 예를 들어, 다른 단백질 또는 폴리펩티드 또는 다양한 약학적으로 활성인 작용제, 예를 들어, *M. 투베르쿨로시스* 감염에 대해 효과적인 화학요법제와 함께 투여될 수 있음이 또한 이해될 것이다. 사실, 포함될 수 있는 다른 성분에는 실질적으로 제한이 없으나, 단, 추가 작용제는 표적 세포 또는 숙주 조직과의 접촉 후 유의한 부작용을 야기하지 않아야 한다. 따라서, 조성물은 특정 예에서 필요한 다양한 다른 작용제와 함께 전달될 수 있다. 이러한 조성물은 숙주 세포 또는 다른 생물학적 공급원으로부터 정제될 수 있거나, 대안적으로 본원에 기재된 바와 같이 화학적으로 합성될 수 있다. 마찬가지로, 이러한 조성물은 치환되거나 유도체화된 RNA 또는 DNA 조성물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0526] 약학적으로 허용되는 부형제 및 담체 용액의 제형은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 경구, 비경구, 정맥내, 비내, 및 근내 투여 및 제형을 포함하는 다양한 치료 요법에서 본원에 기재된 특정 조성물을 이용하기에 적합한 용량 및 치료 요법이 개발되고 있다. 다른 투여 경로는 점막 표면을 통하는 것을 포함한다.
- [0527] 통상적으로, 치료적 유효량을 포함하는 제형은 투여당 약 0.1 ug 내지 약 1000 ug의 폴리펩티드, 더욱 통상적으로 투여당 약 2.5 ug 내지 약 100 ug의 폴리펩티드를 전달한다. 폴리뉴클레오티드 조성물에 관하여, 이는 통상적으로 투여당 약 10 ug 내지 약 20 mg의 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 더욱 통상적으로 투여당 약 0.1 mg 내지 약 10 mg의 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 전달한다.
- [0528] 자연히, 각각의 치료적으로 유용한 조성물에서의 활성 화합물(들)의 양은 화합물의 임의의 제공된 단위 용량에서 적합한 투여량이 수득되는 방식으로 제조될 수 있다. 가용성, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 생

식품 저장 수명 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항과 같은 요인이 상기 약학적 조성물의 제조 분야의 당업자에 의해 고려될 것이고, 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0529]

1. 경구 전달

[0530]

특정 적용에서, 본원에 기재된 약학적 조성물은 동물로의 경구 투여를 통해 전달될 수 있다. 이와 같이, 상기 조성물은 비활성 희석제 또는 동화가능한 음용성 담체와 함께 제형화될 수 있거나, 이들은 경질 또는 연질 껍질 젤라틴 캡슐에 봉해질 수 있거나, 이들은 압착된 정제일 수 있거나, 이들은 음식에 직접 혼입될 수 있다.

[0531]

활성 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 섭취가능한 정제, 협측 정제, 트로키(troche), 캡슐, 엘릭서(elixir), 현탁액, 시럽, 웨이퍼(wafer) 등의 형태로 사용될 수 있다(Mathiowitz *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998; 미국 특허 제5,641,515호; 미국 특허 제5,580,579호 및 미국 특허 제5,792,451호, 이들 각각은 전체내용이 참조로서 본원에 특별히 포함됨). 정제, 트로키, 환약, 캡슐 등은 또한 결합제, 예를 들어, 검 트래거캔스, 아카시아, 전분, 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어, 제2인산칼슘; 봉해제, 예를 들어, 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 등; 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트; 및 감미제, 예를 들어, 수크로오스, 락토오스 또는 사카린; 또는 착향제, 예를 들어, 페퍼민트, 동록유 또는 체리 착향제를 함유할 수 있다. 투여 단위 형태가 캡슐인 경우, 이는 상기 유형의 물질 외에 액체 담체를 함유할 수 있다. 다양한 다른 물질이 코팅으로 존재할 수 있거나, 투여 단위의 물리적 형태를 달리 변형시키기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 환약 또는 캡슐이 셸락(shellac), 당, 또는 둘 모두로 코팅될 수 있다. 엘릭서의 시럽은 활성 성분, 감미제로서 수크로오스, 보존제로서 메틸 및 프로필파라벤, 염료 및 착향제, 예를 들어, 체리 또는 오렌지 착향제를 함유할 수 있다. 물론, 임의의 투여 단위 형태를 제조하는데 사용되는 임의의 물질은 사용되는 양에서 약학적으로 순수해야 하고, 실질적으로 비독성이어야 한다. 또한, 활성 성분은 서방형 제조물 및 제형에 혼입될 수 있다.

[0532]

경구 투여를 위해, 본 발명의 조성물은 대안적으로 구강세척제, 치약, 협측 정제, 경구 스프레이, 또는 설하 경구 투여 제형의 형태로 하나 이상의 부형제와 함께 혼입될 수 있다. 예를 들어, 구강세척제는 적절한 용매, 예를 들어, 붕산나트륨 용액(도벨 용액(Dobell's Solution))에 요망되는 양의 활성 성분을 혼입시켜 제조될 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 경구 용액, 예를 들어, 붕산나트륨, 글리세린 및 중탄산칼륨을 함유하는 경구 용액에 혼입될 수 있거나, 치약에 분산될 수 있거나, 물, 결합제, 연마제, 착향제, 발포제, 및 습윤제를 포함할 수 있는 조성물에 치료학적 유효량으로 첨가될 수 있다. 대안적으로, 조성물은 혀 아래에 위치될 수 있거나 구강에서 달리 용해될 수 있는 정제 또는 용액 형태로 형성될 수 있다.

[0533]

2. 주사 전달

[0534]

특정 상황에서, 본원에 기재된 약학적 조성물을 문헌[미국 특허 제5,543,158호; 미국 특허 제5,641,515호 및 미국 특허 제5,399,363호(이들 각각은 전체내용이 참조로서 본원에 특별히 포함됨)]에 기재된 바와 같이 비경구, 정맥내, 근내, 피내, 또는 복막내로 전달하는 것이 바람직할 것이다. 유리 염기 또는 약리학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액은 계면활성제, 예를 들어, 히드록시프로필셀룰로오스와 적절하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 통상적인 저장 및 사용 조건하에서, 이러한 제조물은 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유한다.

[0535]

주사 용도에 적합한 약학적 형태는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다(전체내용이 참조로서 본원에 특별히 포함되는 미국 특허 제5,466,468호). 모든 경우에서, 형태는 멸균되어야 하고, 용이한 주사성(syringability)이 존재하도록 하는 정도로 유체화되어야 한다. 제조 및 저장 조건하에서 안정적이어야 하고, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적합한 혼합물, 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 촉진될 수 있다. 많은 경우, 등장화제, 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제의 조성물, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 발생될 수 있다.

[0536]

수용액에서의 비경구 투여를 위해, 예를 들어, 용액은 필요시 적절히 완충되어야 하고, 액체 희석제는 먼저 충분한 염수 또는 글루코오스로 등장성이 되어야 한다. 이러한 특정 수용액은 정맥내, 근내, 피하 및 복막내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 발명의 개시에 비추어 당업자에게

공지될 것이다. 예를 들어, 하나의 투여량은 1 ml의 등장성 NaCl 용액에 용해될 수 있고, 1000 ml의 피하주입 용액에 첨가되거나, 제안된 주입 부위에 주사된다(예를 들어, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15th Edition, pp. 1035-1038 and 1570-1580 참조). 치료되는 피검체의 상태에 따라 투여량의 일부 변화가 반드시 발생할 것이다. 투여 담당자는 어느 경우에도 개별적 피검체에 대해 적절한 용량을 결정할 것이다. 또한, 인간 투여를 위해, 제조물은 생물학 기준의 식약청에 의해 요구되는 멸균성, 발열원성, 및 전반적인 안전성 및 순도 표준을 충족시켜야 한다.

[0537] 멸균 주사용수는 적절한 용매 중에서 필요시 상기 열거된 다양한 다른 성분과 함께 요망되는 양의 활성 화합물을 혼입시킨 후, 멸균 여과시킴으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균 활성 성분을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 성분으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분 및 상기 멸균 여과된 용액으로부터의 임의의 요망되는 추가 성분을 발생시키는 진공-건조 및 동결-건조 기술이다.

[0538] 본원에 기재된 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은 무기산, 예를 들어, 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예를 들어, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등으로 형성되는 산부가염(단백질의 자유 아미노기와 함께 형성됨)을 포함한다. 자유 카르복실기와 함께 형성된 염은 또한 무기 염기, 예를 들어, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화철(ferric hydroxide), 및 유기 염기, 예를 들어, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프록카인 등으로부터 유래될 수 있다. 제형화 후, 용액은 투여 제형과 양립되는 방식, 및 치료적으로 효과적인 양으로 투여될 것이다. 제형은 주사용 용액, 약물-방출 캡슐 등과 같은 다양한 투여 형태로 용이하게 투여된다.

[0539] 본원에서 사용되는 "담체"는 임의 및 모든 용매, 분산액 매질, 비히클, 코팅, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 상기 매질 및 작용제의 사용은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 성분과 양립되는 경우를 제외하고는, 치료 조성물에서 이의 사용이 고려된다. 보충 활성 성분이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0540] 구 "약학적으로 허용되는"은 인간에게 투여시 알레르기 또는 유사한 성가신 반응을 발생시키지 않는 분자 존재물 및 조성물을 의미한다. 활성 성분으로서 단백질을 함유하는 수성 조성물의 제조는 당 분야에서 널리 이해되어 있다. 통상적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액과 같이 주사가능물질로 제조되고; 주사 전에 액체 중의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 제조물은 또한 에멀전화될 수 있다.

[0541] 3. 비내 및 협측 전달

[0542] 특정 구체예에서, 약학적 조성물은 비내 스프레이, 협측 스프레이, 흡입, 및/또는 다른 에어로졸 전달 비히클에 의해 전달될 수 있다. 유전자, 핵산, 및 펩티드 조성물을 폐에 직접 전달하기 위한 방법, 예를 들어, 비내 및 협측 에어로졸 스프레이를 통한 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,756,353호 및 미국 특허 제5,804,212호(이들 각각은 전체내용이 참조로서 본원에 특별히 포함됨)에 기재되어 있다. 마찬가지로, 비내 미세입자 수지(Takenaga *et al.*, 1998) 및 리소포스파티딜-글리세롤 화합물(전체내용이 참조로서 본원에 특별히 포함되는 미국 특허 제5,725,871호)을 이용한 약물의 전달이 또한 약학 분야에 널리 공지되어 있다. 마찬가지로, 폴리테트라플루오로에테일렌 지지 매트릭스 형태의 경점막 약물 전달이 미국 특허 제5,780,045호(이의 전체내용은 참조로서 본원에 특별히 포함됨)에 기재되어 있다.

[0543] 4. 리포솜, 나노캡슐, 및 미세입자 매개 전달

[0544] 특정 구체예에서, 본 발명자는 본 발명의 조성물의 적합한 숙주 세포로의 도입을 위해 리포솜, 나노캡슐, 미세입자, 미세구, 지질 입자, 소포 등의 사용을 고려한다. 특히, 본 발명의 조성물은 지질 입자, 리포솜, 소포, 나노구(nanosphere), 또는 나노입자 등에 캡슐화된 전달용으로 제형화될 수 있다.

[0545] 이러한 제형은 본원에 기재된 핵산 또는 작제물의 약학적으로 허용되는 제형의 도입에 바람직할 수 있다. 제형 및 리포솜의 용도는 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다(예를 들어, 세포내 박테리아 감염 및 질병에 대한 표적화된 항생제 요법에서의 리포솜 및 나노캡슐의 사용을 기재하는, Couvreur *et al.*, 1977; Couvreur, 1988; Lasic, 1998 참조). 최근에, 개선된 혈청 안정성 및 순환 반감기를 갖는 리포솜이 개발되었다(Gabizon & Papahadjopoulos, 1988; Allen and Choun, 1987; 미국 특허 제5,741,516호, 전체내용이 참조로서 본원에 특별히 포함됨). 추가로, 잠재적인 약물 담체로서의 리포솜 및 리포솜 유사 제조물의 다양한 방법이 개관되었다(Takakura, 1998; Chandran *et al.*, 1997; Margalit, 1995; 미국 특허 제5,567,434호; 미국 특허 제5,552,157

호; 미국 특허 제5,565,213호; 미국 특허 제5,738,868호 및 미국 특허 제5,795,587호, 이들 각각은 전체내용이 참조로서 본원에 특별히 포함됨).

- [0546] 리포솜은 T 세포 현탁액, 일차 간세포 배양물 및 PC 12 세포를 포함하는 다른 절차에 의한 트랜스펙션에 대해 일반적으로 내성인 다수의 세포 유형에 성공적으로 사용되었다(Renneisen *et al.*, 1990; Muller *et al.*, 1990). 또한, 리포솜은 바이러스 기반의 전달 시스템에 통상적인 DNA 길이 구축에서 자유롭다. 리포솜은 유전자, 약물(Heath & Martin, 1986; Heath *et al.*, 1986; Balazsovits *et al.*, 1989; Fresta & Puglisi, 1996), 방사선치료제(Pikul *et al.*, 1987), 효소(Imaizumi *et al.*, 1990a; Imaizumi *et al.*, 1990b), 바이러스(Faller & Baltimore, 1984), 전사 인자 및 알로스테릭 효과기(allosteric effector)(Nicolau & Gersonde, 1979)를 다양한 배양된 세포주 및 동물에 도입시키는데 효과적으로 사용되었다. 또한, 리포솜 매개 약물 전달의 유효성을 시험하는 여러 성공적인 임상 시험이 수행되었다(Lopez-Berestein *et al.*, 1985a; 1985b; Coune, 1988; Sculier *et al.*, 1988). 또한, 여러 연구는 리포솜의 사용이 전신 전달 후의 자가면역 반응, 독성 또는 생식샘 국소화와 관련되지 않는 것을 암시한다(Mori & Fukatsu, 1992).
- [0547] 리포솜은 수성 매질에 분산되는 인지질로부터 형성되며, 이는 자연적으로 다층 동심 이중층 소포(multilamellar concentric bilayer vesicle)(또한 다층 소포(MLV)로 언급됨)를 형성한다. MLV는 일반적으로 25 nm 내지 4 μm의 직경을 갖는다. MLV의 음과처리는 코어 내에 수용액을 함유하는 200 내지 500Å 범위의 직경을 갖는 작은 단층 소포(SUV)를 형성시킨다.
- [0548] 리포솜은 세포막과 유사성을 가지며, 펩티드 조성물의 담체로서 본 발명과 관련하여 사용이 고려된다. 이들은 수용성 및 지용성 물질이 엔트랩핑(entrapping)될 수 있으며, 즉 수성 공간 및 이중층 자체 각각에 엔트랩핑될 수 있어 매우 적합하다. 약물 함유 리포솜이 리포솜 제형을 선택적으로 변형시킴으로써 활성제의 부위 특이적 전달에 사용될 수 있는 것이 가능하다.
- [0549] 문헌[Couvreur *et al.* (1977; 1988)]의 교시 외에, 리포솜 제형을 발생시키기 위해 하기 정보가 이용될 수 있다. 인지질은 지질 대 물의 몰비에 따라 물에 분산되는 경우 리포솜이 아닌 다양한 구조를 형성할 수 있다. 낮은 비에서, 리포솜은 바람직한 구조이다. 리포솜의 물리적 특성은 pH, 이온 강도 및 이가 양이온의 존재에 좌우된다. 리포솜은 이온 및 극성 물질에 대해 낮은 투과성을 나타낼 수 있으나, 상승된 온도에서 투과성을 현저하게 변경시키는 상 전이를 겪는다. 상 전이는 겔 상태로 공지된 밀저하게 패키징된 정연한 구조로부터 유체 상태로 공지된 느슨하게 패키징된 덜 정연한 구조로의 변화를 포함한다. 이는 특정 상 전이 온도에서 발생하고, 이온, 당 및 약물에 대한 투과성을 증가시킨다.
- [0550] 온도 외에, 단백질에 대한 노출이 리포솜의 투과성을 변경시킬 수 있다. 특정 가용성 단백질, 예를 들어, 시토크롬 c는 이중층에 결합하여, 이를 변형시키고, 투과함으로써, 투과성을 변화시킨다. 콜레스테롤은 외관상으로 인지질을 보다 견고하게 패키징함으로써 단백질의 상기 투과를 억제한다. 항생제 및 억제제 전달을 위한 가장 유용한 리포솜 제형이 콜레스테롤을 함유할 것이 고려된다.
- [0551] 용질을 포획하는 능력은 다양한 유형의 리포솜 사이에서 상이하다. 예를 들어, MLV는 용질 포획에서 적당히 효율적이거나, SUV는 극도로 비효율적이다. SUV는 크기 분포에 있어서 균질성 및 재현성의 장점을 제공하나, 크기와 포획 효율 사이의 절충이 큰 단층 소포(LUV)에 의해 제공된다. 이는 에테르 증발에 의해 제조되고, MLV보다 용질 포획에서 3 내지 4배 더 효율적이다.
- [0552] 리포솜 특징 외에, 화합물 포획에서의 중요한 결정인자는 화합물 자체의 물리화학적 특성이다. 극성 화합물은 수성 공간에 포획되고, 비극성 화합물은 소포의 지질 이중층에 결합한다. 극성 화합물은 투과를 통하거나, 이중층이 파괴되는 경우에 방출되나, 비극성 화합물은 온도 또는 지질단백질에 대한 노출에 의해 분쇄되지 않는 한 이중층과 밀접하게 유지된다. 둘 모두의 유형은 상 전이 온도에서 최대 유출 속도를 나타낸다.
- [0553] 리포솜은 하기와 같은 4개의 상이한 메커니즘을 통해 세포와 상호작용한다: 세포막내피계의 포식 세포, 예를 들어, 대식세포 및 호중구에 의한 세포내이입; 비특이적인 약한 수소성 힘 또는 정전기력, 또는 세포 표면 성분의 특이적 상호작용에 의한 세포 표면으로의 흡착; 형질막으로의 리포솜의 지질 이중층의 삽입에 의한 형질세포막과의 융합과 함께, 세포질로의 리포솜 내용물의 동시 방출; 및 리포솜 내용물의 임의의 회합 없이 세포 또는 세포하 막으로의 리포솜 지질의 이동, 또는 이의 반대 작용. 메커니즘이 작동하고, 동시에 하나 이상이 작동할 수 있는지 결정하는 것은 종종 어렵다.
- [0554] 정맥 주사된 리포솜의 운명 및 배치는 크기, 유동성 및 표면 전하와 같은 물리적 특성에 좌우된다. 이들은 이들의 조성, 및 수분 내지 수시간 범위의 혈액에서의 반감기에 따라 수시간 또는 수일 동안 조직에 존재할 수 있

다. MLV 및 LUV와 같이 보다 큰 리포솜은 세포내피계의 포식 세포에 의해 신속하게 흡수되나, 순환계의 생리 기능은 대부분의 부위에서 상기 큰 종의 존재를 제한한다. 이들은 모세혈관 내피세포, 예를 들어, 간 또는 비장의 골맥관에 큰 개구 및 다공이 존재하는 위치에만 존재할 수 있다. 따라서, 이러한 기관은 우선적인 흡수 부위이다. 다른 한편으로, SUV는 보다 넓은 조직 분포를 나타내나, 여전히 간 및 비장에서 고도로 격리된다. 일반적으로, 이러한 생체내 거동은 리포솜의 큰 크기에 대해 접근가능한 기관 및 조직만으로 리포솜의 잠재적 표적화를 제한한다. 이는 혈액, 간, 비장, 골수, 및 림프 기관을 포함한다.

[0555] 표적화는 본 발명과 관련하여 일반적으로 제한이 없다. 그러나, 특이적 표적화가 요망되어야 하고, 이를 달성하기 위한 방법이 이용가능하다. 리포솜 표면에 결합하고, 항체 및 이의 약물 내용물을 특정 세포 유형 표면에 위치된 특정 항원성 수용체로 유도시키기 위해 항체가 사용될 수 있다. 탄수화물 결정인자(세포-세포 인지, 상호작용 및 부착에서 일정한 역할을 하는 당단백질 또는 당지질 세포 표면 성분)이 또한, 이들이 특정 세포 유형으로 리포솜을 유도하는데 있어서 잠재성을 가짐에 따라 인지 부위로 사용될 수 있다. 대부분, 리포솜 제조물의 정맥내 주사가 사용되나, 다른 투여 경로가 또한 생각될 수 있는 것이 고려된다.

[0556] 대안적으로, 본 발명은 본 발명의 조성물의 약학적으로 허용되는 나노캡슐 제형을 제공한다. 나노캡슐은 일반적으로 안정적이고 재현가능한 방식으로 화합물을 엔트랩핑할 수 있다(Henry-Michelland *et al.*, 1987; Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 1987). 세포내 중합체 과적으로 인한 부작용을 피하기 위해, 생체내에서 붕괴될 수 있는 중합체를 이용하여 초미세 입자(약 0.1 mm 크기)가 설계되어야 한다. 상기 필요조건을 충족시키는 생물분해성 폴리알킬-시아노아크릴레이트 나노입자가 본 발명의 사용에 고려된다. 이러한 입자는 문헌[Couvreur *et al.*, 1980; 1988; zur Muhlen *et al.*, 1998; Zambaux *et al.* 1998; Pinto-Alphandry *et al.*, 1995 및 미국 특허 제5,145,684호, 이들의 전체내용은 참조로서 본원에 특별히 포함됨]에 기재된 바와 같이 용이하게 제조될 수 있다.

[0557] 경피 전달을 위해 피부 패치가 또한 사용될 수 있다.

[0558] **면역원성 조성물**

[0559] 본 발명의 바람직한 특정 구체예에서, 면역원성 조성물이 제공된다. 면역원성 조성물은 일반적으로 면역자극제와 조합된 하나 이상의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 상기 논의된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다. 면역자극제는 외인성 항원에 대한 면역 반응을 증강시키거나 효력을 더하는 임의의 물질(항체 및/또는 세포 매개 물질)일 수 있다. 면역자극제의 예는 애쥬번트, 생물분해성 미세구(예를 들어, 폴리락틱 갈락티드) 및 리포솜(이로 화합물이 혼입됨: 예를 들어, Fullerton, 미국 특허 제4,235,877호 참조)을 포함한다.

[0560] 면역원성 조성물의 제법은, 예를 들어, 문헌[Powell & Newman, eds., *Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)*(1995)]에 일반적으로 기재되어 있다. 본 발명의 범위 내의 약학적 조성물 및 면역학적 조성물은 또한 생물학적으로 활성이거나 비활성일 수 있는 다른 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 다른 *M. 투베르쿨로시스(M. tuberculosis)* 항원이 존재할 수 있거나, 융합 폴리펩티드로 혼입될 수 있거나, 약학적 조성물 또는 면역원성 조성물 내에서 별개의 화합물로 존재할 수 있다.

[0561] 예시적인 면역원성 조성물은 상기 기재된 바와 같은 폴리펩티드 중 하나 이상을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, DNA)를 함유할 수 있고, 상기 폴리펩티드는 원 위치(*in situ*)에서 생성(이에 의해, 면역 반응을 유발함)된다. 상기 언급된 바와 같이, DNA는 핵산 발현 시스템, 박테리아 및 바이러스 발현 시스템을 포함하는 당업자에게 공지된 다양한 전달 시스템 중 임의의 시스템 내에 존재할 수 있다. 다수의 유전자 전달 기술은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:143-198 (1998)] 및 이에 인용된 참고문헌에 기재되어 있다. 적절한 핵산 발현 시스템은 환자에서의 발현에 필요한 DNA 서열(예를 들어, 적합한 프로모터 및 종결 신호)을 함유한다. 박테리아 전달 시스템은 폴리펩티드를 발현(예를 들어, 박테리아의 세포 표면에서 발현되거나 폴리펩티드를 분비함)하는 박테리아 숙주 세포(예를 들어, *미코박테리움, 바실러스* 또는 *락토바실러스* 균주, 예를 들어, *바실러스-칼메트-구에린(Bacillus-Calmette-Guerrin)* 또는 *락토코쿠스 락티스*)의 투여를 포함한다(예를 들어, Ferreira, *et al.*, *An Acad Bras Cienc* (2005) 77:113-124; and Raha, *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2005) PubMedID 15635459 참조). 한 바람직한 구체예에서, DNA는 비병원성(결손) 복제 적격 바이러스의 사용을 포함할 수 있는 바이러스 발현 시스템(예를 들어, 백시니아 또는 다른 폭스 바이러스, 레트로바이러스, 또는 아테노바이러스)을 이용하여 도입될 수 있다. 적합한 시스템은, 예를 들어, 문헌[Fisher-Hoch *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:317-321 (1989); Flexner *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86-103 (1989); Flexner *et al.*, *Vaccine* 8:17-21 (1990); 미국 특허 제

4,603,112호, 제4,769,330호, 및 제5,017,487호; WO 89/01973호; 미국 특허 제4,777,127호; GB 2,200,651호; EP 0,345,242호; WO 91/02805호; Berkner, *Biotechniques* 6:616-627 (1988); Rosenfeld *et al.*, *Science* 252:431-434 (1991); Kolls *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219 (1994); Kass-Eisler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11498-11502 (1993); Guzman *et al.*, *Circulation* 88:2838-2848 (1993); 및 Guzman *et al.*, *Cir. Res.* 73:1202-1207 (1993)]에 기재되어 있다. DNA를 상기 발현 시스템에 통합시키는 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. DNA는 또한 문헌[Ulmer *et al.*, *Science* 259:1745-1749 (1993) and reviewed by Cohen, *Science* 259:1691-1692 (1993)]에 기재된 바와 같이 "네이키드(naked)"일 수 있다. 네이키드 DNA의 흡수는 DNA를 세포로 효과적으로 전달되는 생물분해성 비드에 코팅시킴으로써 증가될 수 있다. 면역원성 조성물이 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 성분 둘 모두를 포함할 수 있는 것이 명백할 것이다. 이러한 면역원성 조성물은 향상된 면역 반응을 제공할 수 있다.

[0562] 면역원성 조성물이 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 약학적으로 허용되는 염을 함유할 수 있는 것이 명백할 것이다. 이러한 염은 유기 염기(예를 들어, 일차, 이차 및 삼차 아민 및 염기성 아미노산의 염) 및 무기 염기(예를 들어, 소듐, 포타슘, 리튬, 암모늄, 칼슘 및 마그네슘 염)를 포함하는 약학적으로 허용되는 비독성 염기로부터 제조될 수 있다.

[0563] 당업자에게 공지된 임의의 적합한 담체가 본 발명의 면역원성 조성물에 사용될 수 있으나, 담체의 유형은 투여 방식에 따라 상이할 것이다. 본 발명의 조성물은 임의의 적절한 투여 방식, 예를 들어, 국소, 경구, 비내, 정맥내, 두개내, 복막내, 피하 또는 근내 투여용으로 제형화될 수 있다. 피하 주사와 같은 비경구 투여를 위해, 담체는 바람직하게는 물, 염수, 알코올, 지방, 왁스 또는 완충제를 포함한다. 경구 투여를 위해, 상기 담체 또는 고체 담체 중 임의의 것, 예를 들어, 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 활석, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스, 및 마그네슘 카르보네이트가 사용될 수 있다. 생물분해성 미세구(예를 들어, 폴리락테이트 폴리글리콜레이트)가 또한 본 발명의 약학적 조성물을 위한 담체로 사용될 수 있다. 적합한 생물분해성 미세구가, 예를 들어, 미국 특허 제4,897,268호; 제5,075,109호; 제5,928,647호; 제5,811,128호; 제5,820,883호; 제5,853,763호; 제5,814,344호 및 제5,942,252호에 기재되어 있다. 또한, 숙주에서 클래스 I-제한 세포독성 T 림프구 반응을 유도할 수 있는, 미국 특허 제5,928,647호에 기재된 미립자-단백질 복합체를 포함하는 담체를 이용할 수 있다.

[0564] 이러한 조성물은 또한 완충제(예를 들어, 중성 완충 염수 또는 인산염 완충 염수), 탄수화물(예를 들어, 글루코오스, 만노오스, 수크로오스 또는 텍스트란), 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 아미노산, 예를 들어, 글리신, 항산화제, 정균제, 킬레이트제, 예를 들어, EDTA 또는 글루타티온, 애쥬번트(예를 들어, 수산화알루미늄), 제형이 수용자의 혈액과 등장성, 저장성 또는 약간 고장성이 되도록 하는 용질, 현탁제, 증점제 및/또는 보존제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 조성물은 동결건조물(lyophilizate)로 제형화될 수 있다. 화합물은 또한 널리 공지된 기술을 이용하여 리포솜 내로 캡슐화될 수 있다.

[0565] 다양한 면역자극제 중 임의의 면역자극제가 본 발명의 면역원성 조성물에 사용될 수 있다. 예를 들어, 애쥬번트가 포함될 수 있다. 대부분의 애쥬번트는 신속한 이화작용으로부터 항원을 보호하도록 설계된 물질, 예를 들어, 수산화알루미늄 또는 광유, 및 면역반응의 자극제, 예를 들어, 지질 A, *보르타델라 퍼투시스(Bordetella pertussis)* 또는 *미코박테리움* 종 또는 *미코박테리움* 유래 단백질을 함유한다. 예를 들어, 탈지화되고, 탈당지질화된 *M. 베케(M. vaccae)*("pVac")가 사용될 수 있다. 적합한 애쥬번트는, 예를 들어, 프로인트 불완전 애쥬번트 및 완전 애쥬번트(Difco Laboratories, Detroit, MI); 머크(Merck) 애쥬번트 65(Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS01B, AS02A, AS15, AS-2 및 이의 유도체(GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA); CWS(튜버클 바실러스(*tubercule bacillus*)로부터의 세포벽 골격), TDM(트레할로오스 디코리노미콜레이트), Leif(리슈만편모충 신장 개시 인자), 알루미늄염, 예를 들어, 수산화알루미늄 겔(명반) 또는 염화알루미늄; 칼슘, 철 또는 아연의 염; 아실화된 티로신의 불용성 현탁액; 아실화된 당; 양이온 또는 음이온적으로 유도체화된 다당류; 폴리포스파젠; 생물분해성 미세구; 모노포스포릴 지질 A(MPL®); 및 quil A(예를 들어, QS-21)로 시판된다. 사이토카인, 예를 들어, GM-CSF 또는 인터루킨-2, -7 또는 -12가 또한 애쥬번트로 사용될 수 있다.

[0566] 애쥬번트는 항원에 대한 특정 면역 반응을 증가시키는 백신 또는 치료 조성물 내의 성분을 의미한다(예를 들어, 문헌[Edelman, *AIDS Res. Hum Retroviruses* 8:1409-1411 (1992)] 참조). 애쥬번트는 Th1-유형 및 Th2 유형 반응의 면역 반응을 유도한다. Th1-유형 사이토카인(예를 들어, IFN- γ , IL-2 및 IL-12)은 투여된 항원에 대한 세포 매개 면역 반응의 유도를 선호하는 경향이 있는 반면, Th2 유형 사이토카인(예를 들어, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)은 체액성 면역 반응의 유도를 선호하는 경향이 있다. Th1 세포 매개 면역 반응을 우선적으로 자극

할 수 있는 애주번트는 WO 94/00153호 및 WO 95/17209호에 기재되어 있다.

- [0567] 본원에 제공된 면역원성 조성물에서, 애주번트 조성물은 바람직하게는 Th1 유형의 면역 반응을 우선적으로 유도하도록 설계된다. 본원에 제공된 면역원성 조성물의 적용 후, 환자는 통상적으로 Th1-유형 및 Th2-유형 반응을 포함하는 면역 반응을 유지할 것이다. 반응이 우선적으로 Th1-유형인 한 바람직한 구체예에서, Th1-유형 사이토카인의 수준은 Th2-유형 사이토카인의 수준보다 크게 증가할 것이다. 이러한 사이토카인의 수준은 표준 검정을 이용하여 용이하게 평가될 수 있다. 사이토카인 족의 리뷰는, 예를 들어, 문헌[Janeway, *et al.*, *Immunobiology*, 5th Edition, 2001]을 참조하라.
- [0568] Rv1753c 조성물은 보통 하나 이상의 애주번트, 예를 들어, AS01B(3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A(리포솜 제형 중의 3D-MPL® 및 QS21; 미국 특허 공보 제2003/0143240호 참조); AS02A(3D-MPL® 및 QS21 및 수중유 오일 에멀전; Bojang, *et al.*, *Lancet* (2001) 358:1927 참조); ENHANZYN®(Detox); 3D-MPL®; Quil A 및 이의 성분, 예를 들어, QS21 및 사포닌 모방체(mimetic)를 포함하는 사포닌; CWS(튜버클 바실러스로부터의 세포벽 골격); TDM(트레할로오스 디코리노미콜레이트); 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트(AGPs); 면역자극성 올리고뉴클레오펙티드, 예를 들어, CPG; Leif(리슈만편모충 신장 개시 인자); 및 이의 유도체를 포함한다. 한 바람직한 구체예에서, Rv1753c 폴리펩티드는 리포솜 제형 중의 3D-MPL® 및 QS21, 예를 들어, AS01B 및 3D-MPL® 및 QS21 및 수중유 에멀전(예를 들어, AS02A)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 애주번트와 함께 투여된다. 애주번트 시스템 AS01B 및 AS02A는 문헌[Pichyangkul, *et al.*, *Vaccine* (2004) 22:3831-40]에 추가로 기재되어 있다.
- [0569] Rv1753c 항원을 핵산으로 전달하는 경우, 이는, 예를 들어, 바이러스 벡터(즉, 아데노바이러스 벡터), 또는 돌연변이 박테리아 숙주 세포(즉, 돌연변이의 바실러스 칼메트-구에린(BCG) 및 락토코쿠스 락티스를 포함하는 무독성의 미코박테리움, 락토바실러스 또는 바실러스) 내에서 전달될 수 있다.
- [0570] Th1-유형 반응을 우선적으로 유도하는데 사용되는 바람직한 애주번트는, 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A(MPL®), 바람직하게는 3-O-데아실화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL®)와 임의로 알루미늄염의 조합물을 포함한다(예를 들어, Ribi, *et al.*, 1986, *Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, pp. 407-419; GB 2122204B; GB 2220211; 및 US 4,912,094 참조). 3D-MPL®의 바람직한 형태는 직경 0.2mm 미만의 작은 입자 크기를 갖는 에멀전의 형태이고, 이의 제조 방법은 WO 94/21292호에 기재되어 있다. 모노포스포릴 지질 A 및 계면활성제를 포함하는 수성 제형이 WO 98/43670호에 기재되어 있다. 예시적인 바람직한 애주번트는 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)사에서 시판되는 AS01B(리포솜 제형 중의 MPL® 및 QS21), 리포솜 제형 중의 3D-MPL® 및 QS21, AS02A(MPL® 및 QS21 및 수중유 에멀전), 3D-MPL® 및 QS21 및 수중유 에멀전, 및 AS15를 포함한다. MPL® 애주번트는 글락소스미스클라인사에서 시판된다(미국 특허 제 4,436,727호; 제4,877,611호; 제4,866,034호 및 제4,912,094호 참조).
- [0571] CpG-함유 올리고뉴클레오티드(여기서, CpG 디뉴클레오티드는 메틸화되지 않음)는 또한 Th1 반응을 우선적으로 유도한다. CpG는 DNA에 존재하는 시토신-구아노신 디뉴클레오티드 모티프의 약어이다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 널리 공지되어 있고, 예를 들어, WO 96/02555호, WO 99/33488호 및 미국 특허 제6,008,200호 및 제 5,856,462호에 기재되어 있다. 면역자극성 DNA 서열은 또한, 예를 들어, 문헌[Sato *et al.*, *Science* 273:352 (1996)]에 기재되어 있다. 면역원성 조성물로 제형화되는 경우 CpG는 일반적으로 자유 항원과 함께 자유 용액으로 투여되거나(WO 96/02555; McCluskie and Davis, 상기) 항원에 공유저공로 컨주게이션되거나(WO 98/16247), 수산화알루미늄과 같은 담체와 함께 제형화된다((간염 표면 항원) Davis *et al.* 상기; Brazolot-Millan *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, USA, 1998, 95(26), 15553-8). CpG는 전신 및 점막 경로 둘 모두에 의해 투여될 수 있는 애주번트로 당 분야에 공지되어 있다(WO 96/02555, EP 468520, Davis *et al.*, *J.Immunol.*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie and Davis, *J.Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6).
- [0572] 또 다른 바람직한 애주번트는 단독 또는 다른 애주번트와 함께 사용될 수 있는, 사포닌 또는 사포닌 모방체 또는 유도체, 예를 들어, Quil A, 바람직하게는 QS21(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)이다. 예를 들어, 증강 시스템은 모노포스포릴 지질 A(MPL®) 및 사포닌 유도체의 조합물, 예를 들어, WO 94/00153호에 기재된 바와 같은 QS21 및 3D-MPL®의 조합물, 또는 WO 96/33739호에 기재된 바와 같은 QS21이 콜레스테롤로 케칭된 덜 반응성인 조성물을 포함한다. 다른 바람직한 제형은 수중유 에멀전 및 토코페롤을 포함한다. 수중유 에멀전 중의 QS21, 3D-MPL® 및 토코페롤을 포함하는 특히 효능있는 애주번트 제형이 WO 95/17210호에 기재되어 있다. 본 발명에 사용하기 위한 추가의 사포닌 애주번트는 QS7(WO 96/33739호 및 WO 96/11711호에 기재됨) 및 QS17(미국 특허 제5,057,540호 및 EP 0 362 279 B1호에 기재됨)을 포함한다.

- [0573] 대안적으로, 사포닌 제형은 키토산 또는 다른 다가양이온 중합체로 구성된 백신 비히클, 폴리락티드 및 폴리락티드-코-글리콜리드(poly lactide-co-glycolide) 입자, 폴리-N-아세틸 글루코사민 기반의 중합체 매트릭스, 다당류 또는 화학적으로 변형된 다당류로 구성된 입자, 리포솜 및 지질 기반의 입자, 글리세롤 모노에스테르로 구성된 입자 등과 조합될 수 있다. 사포닌은 또한 콜레스테롤의 존재하에서 제형화되어 리포솜 또는 ISCOM®과 같은 미립자 구조를 형성할 수 있다. 또한, 사포닌은 비-미립자 용액 또는 현탁액, 또는 미립자 구조, 예를 들어, 포실라멜라(paucilamellar) 리포솜 또는 ISCOM® 중에서 폴리옥시에틸렌 에테르 또는 에스테르와 함께 제형화될 수 있다. 사포닌은 또한 점성도를 증가시키기 위해 CARBOPOL®과 같은 부형제와 제형화될 수 있거나, 락토오스와 같은 분말 부형제와의 건조 분말 형태로 제형화될 수 있다.
- [0574] 한 구체예에서, 애주버트 시스템은 모노포스포릴 지질 A 및 사포닌 유도체의 조합물, 예를 들어, WO 94/00153호에 기재된 바와 같은 QS21 및 3D-MPL® 애주버트의 조합물, 또는 WO 96/33739호에 기재된 바와 같은 QS21이 콜레스테롤 함유 리포솜으로 캡슐화된 덜 반응성인 조성물을 포함한다. 다른 적합한 제형은 수중유 에멀전 및 토코페롤을 포함한다. 수중유 에멀전 중의 QS21, 3D-MPL® 애주버트 및 토코페롤을 사용하는 또 다른 적합한 애주버트 제형은 WO 95/17210호에 기재되어 있다.
- [0575] 또 다른 증강 애주버트 시스템은 CpG-함유 올리고뉴클레오티드 및 사포닌 유도체의 조합물, 특히 WO 00/09159호에 기재된 바와 같은 CpG 및 QS21의 조합물을 포함한다. 적합하게는, 제형은 추가로 수중유 에멀전 및 토코페롤을 포함한다.
- [0576] 다른 적합한 애주버트는 MONTANIDE® ISA 720(Seppic, France), SAF(Chiron, California, United States), ISCOMS®(CSL), MF-59(Chiron), SBAS 애주버트 시리즈(SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium), Detox(Corixa), RC-529(Corixa) 및 다른 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트(AGPs), 예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 계류 중인 미국 특허 출원 일련 번호 제08/853,826호 및 제09/074,720호에 기재된 것, 및 폴리옥시에틸렌 에테르 애주버트, 예를 들어, WO 99/52549A1호에 기재된 것을 포함한다. 스미스클라인 비첨(SmithKline Beecham) 및 코릭사 코포레이션(Corixa Corporation)사는 글락소스미스클라인사의 현재 지주이다.
- [0577] 다른 적합한 애주버트는 하기 화학식(I)의 애주버트 분자를 포함한다:
- [0578] $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$
- [0579] 상기 식에서, n 은 1-50이고, A는 결합 또는 $-\text{C}(\text{O})-$ 이고, R은 C_{1-50} 알킬 또는 페닐 C_{1-50} 알킬이다.
- [0580] 추가 관심 애주버트는, 예를 들어, WO2005/112991호에 기재된 바와 같이 사용된 시가(shiga) 독소 b 사슬이다.
- [0581] 본 발명의 한 구체예는 n 이 1 내지 50, 바람직하게는 4 내지 24, 가장 바람직하게는 9이고; R 성분이 C_{1-50} , 바람직하게는 $\text{C}_4\text{-C}_{20}$ 알킬, 가장 바람직하게는 C_{12} 알킬이고, A가 결합인 화학식(I)의 폴리옥시에틸렌 에테르를 포함하는 면역원성 조성물로 구성된다. 폴리옥시에틸렌 에테르의 농도는 0.1-20%, 바람직하게는 0.1-10%, 가장 바람직하게는 0.1-1% 범위이어야 한다. 바람직한 폴리옥시에틸렌 에테르는 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-9-스테오릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-8-스테오릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-4-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-35-라우릴 에테르, 및 폴리옥시에틸렌-23-라우릴 에테르의 군으로부터 선택된다. 폴리옥시에틸렌 에테르, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르가 머크(Merck) 색인(12th edition: entry 7717)에 기재되어 있다. 이러한 애주버트 분자는 WO 99/52549호에 기재되어 있다.
- [0582] 본원에 제공된 임의의 면역원성 조성물은 항원, 면역 반응 인핸서 및 적합한 담체 또는 부형제를 발생시키는 널리 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 지속 방출 제형(즉, 투여 후에 화합물의 느린 방출을 발생시키는 캡슐, 스폰지 또는 겔(예를 들어, 다당류로 구성됨)과 같은 제형)의 일부로 투여될 수 있다. 이러한 제형은 일반적으로 널리 공지된 기술(예를 들어, 문헌[Coombes *et al.*, *Vaccine* 14:1429-1438 (1996)] 참조)을 이용하여 제조될 수 있고, 예를 들어, 경구 투여, 직장 투여 또는 피하 이식, 또는 요망되는 표적 부위에서의 이식에 의해 투여될 수 있다. 지속 방출 제형은 담체 매트릭스에 분산되고/되거나 속도 조절 막에 의해 둘러싸인 저장소 내에 함유된 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 항체를 함유할 수 있다.
- [0583] 상기 제형에서 사용하기 위한 담체는 생체적합성이고, 또한 생물분해성일 수 있고; 바람직하게는 상기 제형은 비교적 일정한 수준의 활성 성분 방출을 제공한다. 이러한 담체는 폴리(락티드-코-글리콜리드), 폴리알킬라이트, 라텍스, 전분, 셀룰로오스, 텍스트란 등의 미세입자를 포함한다. 다른 지연 방출 담체는 비액체 친수성

코어(예를 들어, 가교된 다당류 또는 올리고당류), 및 임의로 인지질과 같은 양쪽성(amphiphilic) 화합물을 포함하는 외부 막을 포함하는 초분자 바이오백터를 포함한다(예를 들어, 미국 특허 제5,151,254호 및 PCT 출원 WO 94/20078호, WO/94/23701호 및 WO 96/06638호 참조). 자연 방출 제형 내에 함유된 활성 화합물의 양은 이식 부위, 방출 속도 및 예상 기간에 좌우된다.

[0584] 항원 특이적 면역 반응의 발생을 촉진하기 위해 다양한 전달 비히클 중 임의의 비히클이 약학적 조성물 및 면역원성 조성물에서 사용될 수 있다. 전달 비히클은 항원 제시 세포(APC), 예를 들어, 수지상 세포, 대식세포, B 세포, 단핵구 및 효과적인 APC가 되도록 설계될 수 있는 다른 세포를 포함한다. 이러한 세포는 항원을 제시하는 능력을 증가시키고/시키거나, T 세포 반응의 활성화 및/또는 유지를 개선시키고/시키거나, 수용자와 면역학적으로 양립(즉, 매치된 HLA 일배체형)되도록 하기 위해 유전적으로 변형될 수 있으나, 반드시 이러한 것은 아니다. APC는 일반적으로 다양한 생물학적 유체 및 기관 중 임의의 것으로부터 분리될 수 있고, 이는 자가, 동종이형, 동계 또는 이종 개체 세포일 수 있다.

[0585] 본 발명의 특정한 바람직한 구체예는 항원 제시 세포로서 수지상 세포 또는 이의 전구세포를 사용한다. 수지상 세포는 고도로 효능 있는 APC이고(Banchereau & Steinman, *Nature* 392:245-251 (1998)), 예방 또는 치료 면역을 유발하는 생리학 적 애췌벤트로서 효과적인 것으로 밝혀졌다(Timmerman & Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529 (1999) 참조). 일반적으로, 수지상 세포는 이의 전형적인 형태(시험관내에서 보이는 현저한 세포질 과정(수지상 돌기)과 함께 원 위치에서 별 모양), 높은 효율로 항원을 흡수하고, 처리하고, 제시하는 능력, 및 나이브 T 세포 반응을 활성화시키는 능력을 기초로 하여 확인될 수 있다. 수지상 세포는 물론 생체내 또는 생체외에서 수지상 세포에서 통상적으로 발견되지 않는 특정 세포 표면 수용체 또는 리간드를 발현하도록 공학처리될 수 있고, 이렇게 변형된 수지상 세포가 본 발명에 고려된다. 수지상 세포에 대한 대안으로서, 분비된 비히클 항원으로 로딩된 수지상 세포(엑소솜으로 언급됨)가 면역원성 조성물 내에서 사용될 수 있다(Zitvogel *et al.*, *Nature Med.* 4:594-600 (1998) 참조).

[0586] 수지상 세포 및 전구세포는 말초 혈액, 골수, 림프절, 비장, 피부, 제대혈 또는 임의의 다른 적합한 조직 또는 유체로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 수지상 세포는 말초 혈액으로부터 수거된 단핵구의 배양을 위해 GM-CSF, IL-4, IL-13 및/또는 TNF α 와 같은 사이토카인의 조합물을 첨가하여 생체외에서 분화될 수 있다. 대안적으로, 말초 혈액, 제대혈 또는 골수로부터 수거된 CD34 양성 세포는 배양 배지에 GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 리간드, LPS, flt3 리간드 및/또는 수지상 세포의 분화, 성숙 및 증식을 유도하는 다른 화합물(들)의 조합물을 첨가함으로써 수지상 세포로 분화될 수 있다.

[0587] 수지상 세포는 편리하게는 "미숙" 및 "성숙" 세포로 분류되고, 이는 2개의 널리 특성규명된 표면형 사이를 구별하는 간단한 방법이다. 그러나, 이러한 명명법은 분화의 모든 가능한 중간 단계를 배제하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 미숙 수지상 세포는 Fcg 수용체 및 만노오스 수용체의 높은 발현과 관련된, 항원 흡수 및 처리에 대한 높은 능력을 갖는 APC로 특성규명되어 있다. 성숙 표현형은 통상적으로 상기 마커의 낮은 발현을 특징으로 하나, T 세포 활성화를 담당하는 세포 표면 분자, 예를 들어, 클래스 I 및 클래스 II MHC, 부착 분자(예를 들어, CD54 및 CD11) 및 공동자극 분자(예를 들어, CD40, CD80, CD86 및 4-1BB)의 높은 발현을 특징으로 한다.

[0588] APC는 일반적으로 단백질(또는 이의 일부 또는 다른 변이체)을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드로 트랜스펙션될 수 있어, 상기 폴리펩티드는 세포 표면에서 발현된다. 이러한 트랜스펙션은 생체외에서 발생할 수 있고, 상기 트랜스펙션된 세포를 포함하는 약학적 조성물 또는 면역원성 조성물이 본원에 기재된 바와 같이 이후에 사용될 수 있다. 대안적으로, 수지상 세포 또는 다른 항원 제시 세포를 표적으로 하는 유전자 전달 비히클이 환자에 투여되어, 생체내에서 발생하는 트랜스펙션이 발생할 수 있다. 예를 들어, 수지상 세포의 생체내 및 생체외 트랜스펙션은 일반적으로 당 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, WO 97/24447에 기재된 방법, 또는 문헌[Mahvi *et al.*, *Immunology and Cell Biology* 75:456-460 (1997)]에 기재된 유전자총 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 수지상 세포의 항원 로딩은 수지상 세포 또는 전구 세포를 폴리펩티드, DNA(네이키드 또는 플라즈미드 벡터 내) 또는 RNA; 또는 항원 발현 재조합 박테리아 또는 바이러스(예를 들어, 백시니아, 조류폭스, 아데노바이러스 또는 렌티바이러스 벡터)와 함께 인큐베이션시킴으로써 달성될 수 있다. 로딩 전, 폴리펩티드는 T 세포 조력(T cell help)을 제공하는 면역학적 파트너(예를 들어, 담체 분자)에 공유적으로 컨쥬게이션될 수 있다. 대안적으로, 수지상 세포는 단독으로 또는 폴리펩티드의 존재하에서 컨쥬게이션되지 않은 면역학적 파트너와 펄스화될 수 있다.

[0589] 면역원성 조성물 및 약학적 조성물은 단위-용량 또는 다용량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 또는 바이알로 제공될 수 있다. 이러한 용기는 바람직하게는 사용시까지 제형의 멸균성을 보존하기 위해 기밀적으로 밀봉된다.

일반적으로, 제형은 오일 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전으로 저장될 수 있다. 대안적으로, 면역원성 조성물 또는 약학적 조성물은 사용 직전에 멸균 액체 담체의 첨가만을 필요로 하는 동결 건조된 상태로 저장될 수 있다.

[0590] 일부 구체예에서, Rv1753c 폴리펩티드(변이체, 면역원성 단편 또는 융합 단백질을 포함함) 또는 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 "프라이밍(priming)" 또는 첫번째 투여 후에 Rv1753c 폴리펩티드(변이체, 면역원성 단편 또는 융합 단백질을 포함함) 또는 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 1회 이상의 "부스팅(boosting)" 또는 후속 투여가 후속된다("프라이밍 및 부스트" 방법). 예를 들어, Rv1753c 폴리펩티드(변이체, 면역원성 단편 또는 융합 단백질) 또는 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용한 첫번째 투여 후에 Rv1753c 폴리펩티드(변이체, 면역원성 단편 또는 융합 단백질을 포함함) 또는 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 1회 이상의 후속 투여가 후속된다.

[0591] 한 구체예에서, Rv1753c 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 이용한 첫번째 투여 후에 Rv1753c 폴리펩티드의 1회 이상의 후속 투여가 후속된다. 한 구체예에서, Rv1753c 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 이용한 첫번째 투여 후에 Rv1753c 폴리뉴클레오티드의 1회 이상의 후속 투여가 후속된다. 보통, 첫번째 또는 "프라이밍" 투여 및 두번째 또는 "부스팅" 투여는 약 2-12주 간격, 또는 4-6개월 이내 간격으로 제공된다. 후속 "부스터" 투여는 약 6개월 간격, 또는 1, 2, 3, 4 또는 5년의 긴 간격으로 제공된다. 통상적인 부스터 치료(예를 들어, 단백질 프라이밍 투여 후에 단백질 부스팅 투여가 후속됨)는 또한 결핵을 예방하거나 치료하는데 유용할 수 있다(예를 들어, 잠복성 결핵을 예방하거나 치료하고, 특히 지연성 결핵 재활성화를 예방하는데 유용함).

[0592] **항체**

[0593] "항체"는 항원에 특이적으로 결합하여 이를 인지하는 면역글로불린 유전자 또는 이의 단편으로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 인지되는 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론, 및 뮤 불변 영역 유전자 뿐만 아니라 무수히 많은 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되고, 이는 차례로 면역글로불린 클래스, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 각각 규정한다.

[0594] 예시적 면역글로불린(항체) 구조 단위는 테트라머를 포함한다. 각각의 테트라머는 각각의 쌍이 하나의 "경쇄"(약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50-70 kDa)를 갖는 폴리펩티드 사슬의 두개의 동일한 쌍으로 구성된다. 각각의 사슬의 N-말단은 항원 인지를 주로 담당하는 약 100 내지 110개 또는 이 이상의 아미노산의 가변 영역을 규정한다. 용어 가변 경쇄(V_L) 및 가변 중쇄(V_H)는 상기 경쇄 및 중쇄를 각각 의미한다.

[0595] 항체는, 예를 들어, 온전한 면역글로불린 또는 다양한 펩티다아제를 이용한 분해에 의해 생성된 다수의 널리 특성규명된 단편으로 존재한다. 따라서, 예를 들어, 펩신은 힌지 영역 내의 이황화 결합 아래에서 항체를 분해하여, 자체가 이황화 결합에 의해 V_H-C_H1 에 연결된 경쇄인 Fab의 이합체인 $F(ab)'_2$ 를 생성시킨다. $F(ab)'_2$ 는 온전한 조건하에서 환원되어 힌지 영역 내의 이황화 결합을 파괴함으로써, $F(ab)'_2$ 이합체가 Fab' 단량체로 전환될 수 있다. Fab' 단량체는 본질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다(*Fundamental Immunology* (Paul ed., 3d ed. 1993) 참조). 다양한 항체 단편이 온전한 항체의 분해에 의해 규정되어 있으나, 당업자는 상기 단편이 화학적으로 또는 제조합 DNA 방법을 이용하여 새로이 합성될 수 있음을 인지할 것이다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 항체는 또한 전체 항체의 변형에 의해 생성된 항체 단편, 또는 제조합 DNA 방법을 이용하여 새로이 합성된 항체 단편(예를 들어, 단일 사슬 Fv) 또는 파아지 디스플레이 라이브러리를 이용하여 확인된 항체 단편(예를 들어, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990) 참조)을 포함한다.

[0596] 모노클로날 또는 폴리클로날 항체의 제조를 위해, 당 분야에 공지된 임의의 기술이 사용될 수 있다(예를 들어, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985) 참조). 단일 사슬 항체를 생성하기 위한 기술(미국 특허 제4,946,778호)이 본 발명의 폴리펩티드에 대한 항체를 생성시키기 위해 적합할 수 있다. 또한, 트랜스제닉 마우스, 또는 다른 유기체, 예를 들어, 다른 포유동물이 인간화된 항체를 발현시키는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 파아지 디스플레이 기술이 선택된 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 이형(heteromeric) Fab 단편을 확인하는데 사용될 수 있다(예를 들어, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992) 참조).

[0597] 단백질 또는 펩티드에 대해 언급되는 경우 구 항체에 "특이적(또는 선택적)으로 결합하는" 또는 항체와 "특이적(또는 선택적)으로 면역반응성인"은 단백질의 이종성 집단 또는 다른 생물체에서 단백질의 존재를 결정하는

결합 반응을 의미한다. 따라서, 설계된 면역검정 조건하에서, 특정 항체는 특정 단백질에 백그라운드의 2배 이상으로 결합하고, 실질적으로 샘플에 존재하는 다른 단백질에 유의한 양으로 결합하지 않는다. 상기 조건하에서의 항체로의 특정 결합은 특정 단백질에 대한 특이성에 대해 선택되는 항체를 필요로 할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질에 대해 발생된 폴리클로날 항체는 융합 단백질과 특이적으로 면역반응성이고, 융합 단백질의 개별적 성분과 특이적으로 면역반응성은 아닌 폴리클로날 항체만을 수득하도록 선택될 수 있다. 이러한 선택은 개별적 항원과 교차반응하는 항체를 공제함으로써 달성될 수 있다. 특정 단백질과 특이적으로 면역반응성이인 항체를 선택하기 위해 다양한 면역검정 포맷이 사용될 수 있다. 예를 들어, 단백질과 특이적으로 면역반응성이인 항체를 선택하기 위해 고상 ELISA 면역검정이 통상적으로 사용된다(예를 들어, 특정 면역반응성을 결정하기 위해 사용될 수 있는 면역검정 포맷 및 조건의 기재에 대한 Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) and *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (1998) 참조). 통상적으로, 특정 반응 또는 선택적 반응은 백그라운드 신호 또는 노이즈(예를 들어, 다른 *미코박테리움 투베르쿨로시스* 단백질과 같은 다른 미코박테리움 단백질로의 결합)의 2배 이상, 더욱 통상적으로 백그라운드의 10, 20 또는 100배 이상이 될 것이다.

진단학

또 다른 양태에서, 본 발명은 결핵을 진단하기 위해 상기 기재된 하나 이상의 폴리펩티드를 이용하는 방법을 제공한다(예를 들어, T 세포 반응 기반의 검정 또는 통상적인 포맷의 항체 기반 검정을 이용함).

예를 들어, (a) 개체로부터 샘플을 수득하는 단계, (b) 상기 샘플과, (i) Rv1753c 단백질 서열; (ii) Rv1753c 단백질 서열의 변이체; 또는 (iii) Rv1753c 단백질 서열의 면역원성 단편을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 접촉시키는 단계; 및 (c) 샘플 반응을 정량하는 단계를 포함하는, 개체에서 *M. 투베르쿨로시스* 감염 전을 결정하는 방법이 제공된다.

샘플은, 예를 들어, 전체 혈액 또는 정제된 세포일 수 있다. 적합하게는, 샘플은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 함유할 것이다. 본 발명의 한 구체예에서, 개체는 혈청반응양성일 것이다. 본 발명의 두번째 구체예에서, 개체는 혈청반응음성일 것이다.

적합하게는, 개체는 *M. 투베르쿨로시스* 감염에 대해 이전에 백신접종되지 않았던 개체일 것이다(예를 들어, 적합하게는 개체는 이전에 BCG로 백신접종되지 않았던 개체일 것이다).

샘플 반응은 림프구 증식 또는 특정 사이토카인 또는 항체의 생성의 모니터링을 포함하는 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 정량화될 수 있다. 예를 들어, 인터페론 감마(IFN γ), 인터루킨 2(IL2) 및 인터루킨 5(IL5)와 같은 사이토카인을 모니터하는데 T-세포 ELISPOT이 사용될 수 있다. B-세포 ELLISPOT이 *M. 투베르쿨로시스* 특이적 항원의 자극을 모니터하는데 사용될 수 있다. 세포 반응은 또한 세포내 및 세포외 염색의 이용 및 유세포 측정기에 의한 분석에 의해 특성규명될 수 있다.

샘플 증식 반응을 정량하는 방법은, (i) 배양된 세포를 방사선라벨(예를 들어, 삼중수소 티미딘)을 이용하여 펠스화시키고, 트리톱 흡수(예를 들어, 기체 신틸레이션)를 모니터하고, (ii) 카르복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 에스테르(CFSE) 라벨링 및 유세포측정기를 이용한 세포 분열의 형광 모니터링을 포함한다.

샘플 사이토카인 반응을 정량하는 것은 특히 인터페론 감마 생성의 모니터링을 포함한다.

상기 정량화 반응을 이용하는 경우, 항원에 대한 양성 반응은 2:1 이상(예를 들어, 3:1 이상 또는 5:1 이상)의 신호 대 노이즈 비(S/N 비)로 규정될 수 있다.

본 발명의 한 추가 양태에서, 피부 시험을 이용하여 *M. 투베르쿨로시스* 감염을 진단하는 방법이 제공된다. 본원에서 사용되는 "피부 시험"은 환자에서 직접 수행되는 임의의 검정이고, 여기서 지연과민성(DTH) 반응(예를 들어, 팽윤, 발적 또는 피부염)이 상기 기재된 Rv153c 폴리펩티드(또는 이의 변이체, 면역원성 단편 또는 이를 인코딩하는 뉴클레오티드)의 피내 주사 후에 측정된다. 상기 주사는 항원 조합물과 환자의 피부 세포를 접촉시키기 위해 충분한 임의의 적합한 장치, 예를 들어, 투베르쿨린 주사 또는 1 mL 주사를 이용하여 달성될 수 있다. 반응은 일정 기간 후, 예를 들어, 주사 후 48시간 이상, 특히 48-72시간 후에 측정된다.

DTH 반응은 세포 매개 면역 반응으로, 이는 시험 화합물에 이전에 노출된 환자에서 더 크다. 반응은 자를 이용하여 시각적으로 측정될 수 있다. 일반적으로, 약 0.5 cm 직경 초과, 특히 약 1.0 cm 직경 초과 반응이 양성 반응이며, 이는 활성 질병으로 나타나거나 나타나지 않을 수 있는 사전 *M. 투베르쿨로시스* 감염을 나타낸다.

피부 시험에 사용하기 위해, Rv1753c 성분은 적합하게는 생리학적으로 허용되는 담체를 함유하는 약학적 조성물로 제형화된다. 적합하게는, 상기 약학적 조성물에 사용되는 담체는 페놀 및/또는 Tween 80TM과 같은 적절한

보존제를 갖는 염수 용액이다.

- [0610] 본 발명은 상기 진단 방법 중 임의의 방법에 사용하기 위한 키트를 추가로 제공한다. 이러한 키트는 통상적으로 진단 검정을 수행하는데 필요한 2개 이상의 성분을 포함한다. 성분은 화합물, 시약, 용기 및/또는 장치일 수 있다.
- [0611] 예를 들어, 키트 내의 하나의 용기는 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 또는 이의 단편을 함유할 수 있다. 이러한 항체 또는 단편은 상기 기재된 바와 같은 지지 물질에 부착되어 제공될 수 있다. 하나 이상의 추가 용기는 검정에서 사용되는 구성요소, 예를 들어, 시약 또는 완충액을 포함할 수 있다. 이러한 키트는 또한 또는 대안적으로 항체 결합의 직접 또는 간접 검출에 적합한 리포터 기를 함유하는 상기 기재된 바와 같은 검출 시약을 함유할 수 있다.
- [0612] 대안적으로, 키트는 생물학적 샘플 내의 단백질을 엔코딩하는 mRNA의 수준을 검출하도록 설계될 수 있다. 이러한 키트는 일반적으로 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화되는 상기 기재된 바와 같은 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 프라이머를 포함한다. 이러한 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어, PCR 또는 하이브리드화 검정에서 사용될 수 있다. 상기 키트에 제공될 수 있는 추가 구성요소는 본 발명의 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의 검출을 촉진하는 이차 올리고뉴클레오티드 및/또는 진단 시약 또는 용기를 포함한다.
- [0613] 다른 진단 키트는 세포 매개 반응의 검출을 위해 설계된 것(이는, 예를 들어, 본 발명의 진단 방법에 사용될 수 있음)을 포함한다. 이러한 키트는 통상적으로, (i) 피검체로부터 적절한 세포 샘플을 수득하기 위한 장치; (ii) 상기 세포 샘플을 Rv1753c 폴리펩티드(또는 이의 변이체, 면역원성 단편, 또는 이러한 폴리펩티드를 엔코딩하는 DNA)로 자극시키기 위한 수단; 및 (iii) 자극에 대한 세포 반응을 검출하거나 정량하기 위한 수단을 포함한다.
- [0614] 세포 반응을 정량하기에 적합한 수단은 당업자에게 공지된 B-세포 ELISPOT 키트 또는 대안적으로 T-세포 ELISPOT 키트를 포함한다.
- [0615] 하나의 가능한 키트는, (a) 본 발명의 폴리펩티드; 및 (b) 항체 결합의 직접 또는 간접 검출에 적합한 검출 시약을 포함한다.
- [0616] 물론, 하기와 같은 T 세포 반응을 정량하기 위해 맞춤형 진단 키트도 흥미롭다:
- [0617] (a) 본 발명의 폴리펩티드; 및 (b) 상기 폴리펩티드와 개체의 피부 세포를 접촉시키기에 충분한 장치를 포함하는 진단 키트.
- [0618] (a) 본 발명의 폴리펩티드; (b) 상기 폴리펩티드와 개체로부터의 샘플(예를 들어, 전체 혈액, 더욱 적합하게는 PBMC)을 접촉시키기에 충분한 장치; 및 (c) T 세포 반응(예를 들어, 증식 또는 IFN-감마 생성)을 정량하기 위한 수단을 포함하는 진단 키트.

도면의 간단한 설명

[0619] **도면의 설명**

도 1: 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서 IFN-감마 및/또는 IL-2 및/또는 TNF-알파 사이토카인을 발현하는 면역화된 CB6F1 마우스로부터의 CD4 및 CD8 세포의 백분율.

도 2: 면역화된 CB6F1 마우스에서의 항원 특이적 CD4 반응의 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서의 사이토카인 프로파일.

도 3: 면역화된 CB6F1 마우스에서의 항원 특이적 CD8 반응의 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서의 사이토카인 프로파일.

도 4: 35일(즉, 세번째 면역화 7일 후)에서 IFN-감마 및/또는 IL-2 및/또는 TNF-알파 사이토카인을 발현하는 면역화된 CB6F1 마우스로부터의 CD4 및 CD8 세포의 백분율.

도 5: 면역화된 CB6F1 마우스에서의 항원 특이적 CD4 반응의 35일(즉, 세번째 면역화 7일 후)에서의 사이토카인 프로파일.

도 6: 면역화된 CB6F1 마우스에서의 항원 특이적 CD8 반응의 35일(즉, 세번째 면역화 7일 후)에서의 사이토카인

프로파일.

도 7: 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서 IFN-감마 및/또는 IL-2 및/또는 TNF-알파 사이토카인을 발현하는 면역화된 C57BL/6 마우스로부터의 CD4 및 CD8 세포의 백분율.

도 8: 면역화된 C57BL/6 마우스에서의 항원 특이적 CD4 반응의 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서의 사이토카인 프로파일.

도 9: 면역화된 C57BL/6 마우스에서의 항원 특이적 CD8 반응의 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서의 사이토카인 프로파일.

도 10: 무경험(naive) 및 잠복성으로 감염된 인간에서의 항원-특이적 CD4 T 세포 반응.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

하기 실시예는 단지 예시로 제공되며, 이로 제한하고자 함이 아니다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 발생시키기 위해 변경되거나 변형될 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 용이하게 인지할 것이다.

실시예 1 - 잠재 TB 백신 표적으로서의 Rv1753c의 확인

PPE24로도 공지된 유전자 Rv1753c는 Gly-, Asn-풍부 단백질의 미코박테리움 튜버쿨로시스 PPE 패밀리의 단백질 일원을 엔코딩한다.

문헌[Murphy and Brown *BMC. Infect. Dis.* 2007 7:84-99]에와 같이 휴면기 유지 및 감염성과 관련된 *미코박테리움 튜버쿨로시스* 유전자의 유전체 수준의 분석을 기초로 하여 Rv1753c를 선택하였다. 가상 휴면 조건하에서 박테리아 유전자 발현의 공개된 유전체 수준의 DNA 마이크로어레이 데이터세트의 생물정보학 메타-분석을 통해 *미코박테리움 튜버쿨로시스* 내의 잠재적 휴면기 유전자 표적을 우선적으로 결정하였다. 이후, 유전자에 의해 엔코딩된 *M. 튜버쿨로시스* 단백질의 세포하 국소화를 백신 표적을 확인하기 위해 전체 유전체에서 수행하였다.

간략히, 휴면 모델에서 실험 조건은 매우 다양하였고, 이에 1) 휴면 상태에 대한 실험 조건의 적절성 및 2) 발현 순위의 2개 기준을 기초로 하여 상기 데이터를 표준화시키기 위해 0 내지 5의 스코어링 시스템을 개발하였다. 특정 실험 데이터세트에 대한 최대 스코어를 휴면기 *M. 튜버쿨로시스* 감염의 임상적 발생에 대한 잠재적 관련성을 기초로 하여 조정하였다. 표 1은 각각의 데이터세트에 대한 조정된 최대 스코어와 함께 단계 1에 대해 획득된 데이터세트를 나타낸다. 성장에 대한 유전자 불가결성에 대한 추가 데이터세트를 트랜스포존 기반의 녹아웃 실험(TraSH)을 이용한 공개 연구로부터 획득하였다. 성장에 대해 효과가 없는 유전자는 0의 스코어를 받았다.

표 1 - *M. 튜버쿨로시스* DNA 마이크로어레이 유전자 발현 및 유전체 수준의 유전자 녹아웃(성장기 불가결성)을 위한 공급원, 실험 모델 및 스코어링 기준.

| 참고문헌 | 실험 모델 | 시점: 최대 스코어 ^a |
|---|--|--|
| Betts JC et al. <i>Mol. Microbiol.</i> 2002 43:717-731 | O ₂ 조절하에서 단식 | 96h: 3 24h: 2 4h: 1 |
| Hampshire T et al. <i>Tuberculosis.(Edinb.)</i> 2004 84:228-238 | O ₂ 조절하에서의 영양소 고갈 | 62 및 75d: 5 49d: 4 18d: 2 |
| Muttucumaru DG et al. <i>Tuberculosis.(Edinb.)</i> 2004 84:239-246 | 저산소증 [#] 의 웨인(Wayne) 모델 | 14d (NRP-2): 4 7d (NRP-1): 2 |
| Voskuil MI et al. <i>Tuberculosis.(Edinb.)</i> 2004 84:218-227 | 저산소증 [#] 의 웨인(Wayne) 모델 | 30 및 80d: 5 14 및 20d: 4 10 및 12d: 3 6 및 8d: 2 |
| Schnappinger D et al. <i>J. Exp. Med.</i> 2003 198:693-704 | 마우스 대식세포의 감염, +/- γ -INF | 24 및 48h: 5 |
| Karakousis PC et al. <i>J. Exp. Med.</i> 2004 200:647-657 | 마우스에서의 중공 섬유 피하 이식 | 10d: 3 |
| Talaat AM et al. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A</i> 2004, 101:4602-4607 | 마우스의 감염. 폐 ^b 로부터 MTB 수거 | 28d: 3 |
| Sassetti CM et al. <i>Mol. Microbiol.</i> 2003 48:77-84 | 고체 배지에서 성장된 TraSH 변이된 라이브러리 | 14d:5 |
| Rengarajan J et al. <i>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</i> 2005, 102:8327-8332 | <i>M. 튜버쿨로시스(M. tuberculosis)</i> 의 TraSH 변이된 라이브러리를 이용한 마우스 대식세포의 감염, +/- γ -INF | 7d:5 |

[0627]

| 참고문헌 | 실험 모델 | 시점: 최대 스코어 ^a |
|--|---|-------------------------|
| Sassetti CM et al. <i>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</i> 2003 100:12989-12994 | <i>M. 튜버쿨로시스</i> 의 TraSH 변이 라이브러리로 감염된 C57BL/6J 마우스 | 7, 14, 28 및 56d:5 |

[0628]

[0629] ^a 휴면 모델로서의 적절성을 기초로한 최대 스코어; h = 시간; d = 일.

[0630] ^b 28일 동안 통기 배양에서의 Balb/c 폐로부터의 *M. 튜버쿨로시스* 대 MTB의 비.

[0631] # Wayne LG and Hayes LG *Infect. Immun.* 1996 64:2062-2069

[0633] 단계 2 - 두번째 기준의 적용에서, 유전자 발현의 순위인 각각의 데이터세트로부터의 유전자 스코어를 발현비 (장기 액체 배양에서 세포에 비한 실험 조건에서의 발현 배수)를 기초로 하여 가장 높은 순서로부터 낮은 순서로 정렬시켰다. 가장 높은 스코어링 유전자가 특정 데이터세트에 대해 최대 스코어를 받았다(표 1의 컬럼 3에 나열됨(예를 들어, 5, 4, ..., 1 포인트)). 스코어는 차례대로 0까지 각각의 유전자에 대해 0.005 포인트 감소하거나, 데이터세트의 끝에 도달하였다. 이에 따라, 최대 스코어가 4 포인트인 경우, 100번째 순위의 유전자는 3.500의 스코어를 받을 것이다. 5 포인트의 최대 스코어에 대해, 1000개의 유전자 또는 *M. 튜버쿨로시스* 유

전체의 25%가 스코어를 받았다. 다수의 시점으로부터의 데이터가 수득되는 실험에 대해, 모든 시점에 걸친 최대 스코어를 최종 스코어로 사용하였다.

[0634] 단계 3에서, 실험 조건 각각에서의 각각의 유전자에 대한 스코어를 마이크로소프트 액세스 데이터베이스로 수득하였다. 우선순위 지정을 촉진시키기 위해 Refseq ID, Genbank function, Genbank note, Tuberculist 분류, 및 KEGG 및 생거 센터(Sanger Center) 링크와 같은 참조 영역을 추가하였다. 다양한 연구 및 공급원으로부터의 데이터를 조합하여, 휴면 상태에서의 생존에 가장 중요한 특정 유전자 및 경로에 대해 일치된 견해에 도달하였다.

[0635] 단계 4에서, 생화학적 경로, 효소학, 약물 순종성, 인간 유전자에 대한 상동성 및 다른 종래 지식의 숙련된 계산 및 수작업 분석에 의해 보충된 상위 400개의 스코어링 유전자(유전체의 ~10%)를 이용하여 치료 표적의 우선순위 리스트를 도출시켰다. 높은 스코어링 유전자의 매우 대다수는 2 또는 3개의 군이 교차하는 서브셋으로부터 유래하였다.

[0636] 단계 5에서, 유전자에 의해 엔코딩된 *M. 투베르쿨로시스* 단백질의 세포하 국소화의 확인을 전체 유전체에서 수행하였다. 막 단백질 예측에 사용된 발견적 방법(heuristic)은 문헌[Chalker et al. *J. Bacteriol.* 2001 183:1259-1268]에 기재되어 있다. 사다리꼴 원도우를 이용하여 칭량된 GES 수치법(hydropathy) 값(Engelman DM et al. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1986 15:321-353)을 이용하여 평균 수치법 프로파일(H)(von Heijne G J. *Mol. Biol.* 1992 225:487-494)을 생성시켰다. TopPred II 알고리즘(Claros MG et al. *Comput. Appl. Biosci.* 1994 10:685-686)의 최초 단계와 유사한 과정을 이용하여, 가장 높은 H 값(MaxH)의 중심에 위치한 19개의 아미노산을 선택하고, 추가적인 고려사항으로부터 상기 값을 차폐시키고, >0.5의 H를 가진 피크가 남아있지 않을 때까지 상기 과정을 반복함으로써 각각의 펩티드 서열에 대한 나선형 막횡단 세그먼트(TMS)를 예측하였다. 피크 MaxH 값, >1.0의 H를 갖는 세그먼트의 수, 및 추정 TMS의 분포 및 피크 H 값을 기초로 하여 세포하 국소화를 지정하였다. 막횡단 단백질 및 세포질 단백질을 각각 함유하는 2개의 SwissProtein 방출 34 시험 데이터세트 사이의 구별을 최대화시키기 위해 1.15의 MaxH 컷오프를 선택하였다(Boyd D et al. *Protein Sci.* 1998 7:201-205). <1.15의 MaxH를 갖는 단백질을 세포질로 분류한 반면, >1.15의 MaxH 및 3개 이상의 가능한 TMS를 갖는 단백질을 막 단백질로 분류하였다. 앵커링된 단백질을 정확히 2개의 TMS를 갖는 것으로 규정하였고, 상기 2개의 TMS 중 하나는 아미노산(aa) 35 앞에서 시작하고, >1.15의 H를 가졌고, 나머지 하나는 0.5 이상의 H를 가졌다. 그람 양성 설정을 갖는 SignalP를 발견적 방법에서 세포질 또는 "공지되지 않은" 것으로 분류된 단백질에서 분비 단백질을 확인하기 위해 *M. 박테리움*에 특별히 사용하였다(Nielsen H et al. *Protein Eng.* 1997 10:1-6).

[0637] Rv1753c는 여러 기준에 따라 백신 항원으로서 매우 높은 순위를 가졌다:

[0638] (i) Rv1753c는 모든 휴면 모델에 걸쳐 일관적으로 상향조절된다. 메타-분석에서 스코어링된 3999개의 유전자의 전체 슈트에서, Rv1753c는 모든 휴면 모델에 걸쳐 상향 발현된 유전자의 상위 10% 중 하나로 116번째의 순위를 가졌다. Rv1753c에 대해 상향 조절된 스코어는 22.28의 상위 유전자 스코어에 비해 유리한 13.29였다. Rv1753c는 임의의 휴면기 모델에서 하향 조절되지 않았고, 가장 크게 하향 조절된 유전자에 대한 -18.13과 비교하여 0으로 스코어링되었다.

[0639] (ii) Rv1753c는 *M. 투베르쿨로시스* 생존에 관한 시험관내 성장 모델에 따라 성장에 필수적인 것으로 지위가 매겨졌다(추정 스코어 5를 벗어난 2.07로 스코어링되었음).

[0640] (iii) 세포하 국소화는 Rv1753c 단백질이 분비되고, 이에 따라 유의한 세포의 노출을 갖는 것으로 예측하였고, 이는 백신 표적으로서의 적합성을 나타낸다.

[0641] **실시예 2 - Rv1753c 에피토프 확인**

[0642] 방법

[0643]

T 세포 에피토프 예측은 하기 방법을 기초로 하였다:

| 예측 | 명칭 | URL/참고문헌 |
|--------------|-----------|--|
| CD4 및 CD8 | Multipred | website: antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/ Zhang,G.L., Khan,A.M., Srinivasan,K.N., August,J.T. and Brusic,V. (2005) "MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides" <i>Nucleic Acids Res.</i> 33, W172 - W179. |
| | SVMHC | website: www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC "Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC." Pierre Dönnes and Arne Elofsson in: <i>BMC Bioinformatics</i> 2002 3: 25 |
| CD4 | ProPred | website: www.imtech.res.in/raghava/propred/ Singh,H. and Raghava,G.P.S.(2001) "ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites." <i>Bioinformatics</i> ,17(12), 1236-37. |
| | Tepitope2 | In house program based on : H. Bian, J. Hammer (2004) "Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE." <i>Methods</i> 34 : 468-75 |
| CD8 | nHLA | website: www.imtech.res.in/raghava/nhlaped/ Bhasin M. and Raghava G P S (2006) "A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes"; <i>J. Biosci.</i> 32:31-42 |
| | NetCTL | website: www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/ "An integrative approach to CTL epitope prediction. A combined algorithm integrating MHC-I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions." Larsen M.V., Lundegaard C., Kasper Lamberth, Buus S., Brunak S., Lund O., and Nielsen M. <i>European Journal of Immunology.</i> 35(8): 2295-303. 2005 |

[0644]

| 예측 | 명칭 | URL/참고문헌 |
|----|-----------|---|
| | EpiJen | website: www.jenner.ac.uk/EpiJen/ Doytchinova, I. A., P. Guan, D. R. Flower. "EpiJen: a server for multi-step T cell epitope prediction." <i>BMC Bioinformatics</i> , 2006, 7, 131. |
| | Syfpeithi | website: www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic: "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." <i>Immunogenetics</i> (1999) 50: 213-219 |
| | PredTAP | website: antigen.i2r.a-star.edu.sg/predTAP/ Zhang, G.L., Petrovsky, N., Kwok, C.K., August, J.T. and Brusic, V. (2006) "PRED ^{TAP} : a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing." <i>Immunome Res.</i> 2(1), 3. |
| | PAPROC | website: www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html C. Kuttler, A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.-G. Rammensee, H. Schild, K.P. Haderl, "An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages", <i>J. Mol. Biol.</i> 298 (2000), 417-429 A.K. Nussbaum, C. Kuttler, K.P. Haderl, H.-G. Rammensee, H. Schild, "PAProc: A Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW", <i>Immunogenetics</i> 53 (2001), 87-94 |

[0645]

[0646]

[0647]

결과

표 2 - 추정 Rv1753c 인간 CD4+ T 세포 에피토프

| 추정 CD4 에피토프 번호 | 아미노산 위치 | 에피토프 서열 | SEQ ID No: | HLA 대립유전자 |
|----------------|---------|----------|---------------|-----------|
| 1 | 57 | WQGASSAM | SEQ ID No: 30 | DRB1_0401 |

[0648]

| 추정 CD4 에피토프 번호 | 아미노산 위치 | 에피토프 서열 | SEQ ID No: | HLA 태입유전자 |
|----------------------|------------|------------|---------------|---|
| 2 | 81 | VQAEQTAAQ | SEQ ID No: 31 | DRB1_0401 |
| 3 | 100 | VKTAVVQPM | SEQ ID No: 32 | DRB1_0301, DRB1_1301 |
| 4 | 105 | VQPMLVAAN | SEQ ID No: 33 | DRB1_1301 |
| 5 | 109 | LVAANRADL | SEQ ID No: 34 | DRB1_0301, DRB1_0801, DRB1_1101, DRB1_1301, DRB1_1501 |
| 6 | 117 | LVSLVMSNL | SEQ ID No: 35 | DRB1_1501 |
| 7 | 120 | LVMSNLFGQ | SEQ ID No: 36 | DRB1_0401, DRB1_1301 |
| 8 | 140 | YEQMWAADV | SEQ ID No: 37 | DRB1_0101 |
| 9 | 144 | WAADVSAMS | SEQ ID No: 38 | DRB1_0401 |
| 10 | 172 | LQNLAGLPA | SEQ ID No: 39 | DRB1_0101, DRB1_1101, DRB1_1501 |
| 11 | 261 | FGNLSGNNV | SEQ ID No: 40 | DRB1_0401 |
| 12 | 291 | FGNTGNNNI | SEQ ID No: 41 | DRB1_0401 |
| 13 | 413 | FLNAGNINT | SEQ ID No: 42 | DRB1_0401 |
| 14 | 453 | LQFSITTPD | SEQ ID No: 43 | DRB1_0401 |
| 15 | 673 | LTIPAGITI | SEQ ID No: 44 | DRB1_1501 |
| 16 | 725 | FGIPFTLQF | SEQ ID No: 45 | DRB1_0401, DRB1_1101 |
| 17 | 731 | LQFQTNVPA | SEQ ID No: 46 | DRB1_0401 |
| 18 | 733 | FQTNVPALQ | SEQ ID No: 47 | DRB1_0401, DRB1_0801, DRB1_1101 |
| 19 | 770 | YTLTGPIVI | SEQ ID No: 48 | DRB1_0101, DRB1_0401, DRB1_1101 |
| 20 | 782 | FLPAFNIPG | SEQ ID No: 49 | DRB1_0401 |
| 21 | 866 | LTIDPINLT | SEQ ID No: 50 | DRB1_0401 |
| 22 | 891 | LTIDPINLT | SEQ ID No: 51 | DRB1_0301, DRB1_1501 |
| 23 | 954 | YFNSSTAPS | SEQ ID No: 52 | DRB1_0401, DRB1_1101 |
| 24 | 955 | FNSSTAPSS | SEQ ID No: 53 | DRB1_0401 |
| 25 | 976 | FGNNGSGLS | SEQ ID No: 54 | DRB1_0401 |
| 26 | 1000 | YQNFGGLSS | SEQ ID No: 55 | DRB1_0101, DRB1_0801, DRB1_1101, DRB1_1501 |
| 27 | 1003 | FGGLSSGFS | SEQ ID No: 56 | DRB1_0401 |
| 28 | 1020 | FANRGILPF | SEQ ID No: 57 | DRB1_0801 |
| 29 | 1025 | ILPFSVASV | SEQ ID No: 58 | DRB1_1301 |
| 30 | 1037 | FANIGNTLA | SEQ ID No: 59 | DRB1_0401, DRB1_1101 |

[0649]

[0650]

표 3 - 추정 Rv1753c 인간 CD8+ T 세포 에피토프

| 추정 CD8 에피토프 번호 | 아미노산 위치 | 에피토프 서열 | SEQ ID No: | HLA 태입유전자 |
|----------------------|------------|-----------|---------------|---------------------|
| 1 | 2 | NFSVLPPEI | SEQ ID No: 60 | A24 |
| 2 | 5 | VLPPEINSA | SEQ ID No: 61 | A2, A_0201 |
| 3 | 6 | LPPEINSAL | SEQ ID No: 62 | B7, B8, B_3501, B51 |
| 4 | 8 | PEINSALIF | SEQ ID No: 63 | B44 |
| 5 | 9 | EINSALIFA | SEQ ID No: 64 | A_0201, A_0301 |
| 6 | 18 | GAGPEPMAA | SEQ ID No: 65 | A_0101, B_3501 |

[0651]

| 추정 CD8 에피토프 번호 | 아미노산 위치 | 에피토프 서열 | SEQ ID No: | HLA 대립유전자 |
|----------------|---------|-----------|----------------|-------------------------------------|
| 7 | 20 | GPEPMAAAA | SEQ ID No: 66 | B7, B_3501 |
| 8 | 22 | EPMAAAATA | SEQ ID No: 67 | B7, B_0702, B8, B_3501, B51 |
| 9 | 26 | AAATAWDGL | SEQ ID No: 68 | A1, B8, B_3501 |
| 10 | 28 | ATAWDGLAM | SEQ ID No: 69 | B7 |
| 11 | 30 | AWDGLAMEL | SEQ ID No: 70 | A1, A_2402, B44, Cw_0602 |
| 12 | 33 | GLAMELASA | SEQ ID No: 71 | A_0101, A_0301, A2, A_0201 |
| 13 | 34 | LAMELASAA | SEQ ID No: 72 | A3, A_0301, B51 |
| 14 | 48 | VTSGLVGGA | SEQ ID No: 73 | A_0101, A_0301 |
| 15 | 64 | AMAAAAPY | SEQ ID No: 74 | A1, A3, A_0301, A_0101, B_4403 |
| 16 | 66 | AAAAAPYAA | SEQ ID No: 75 | A_0301, B_3501 |
| 17 | 68 | AAAPYAOWL | SEQ ID No: 76 | A1, A24, B_3501, B51 |
| 18 | 69 | AAPYAOWLA | SEQ ID No: 77 | A1, A_0301, B_3501 |
| 19 | 70 | APYAOWLAA | SEQ ID No: 78 | A3, A_0301, B7, B_0702, B8, B_3501 |
| 20 | 72 | YAAWLAAAA | SEQ ID No: 79 | A_0301, B8, B_3501 |
| 21 | 73 | AAWLAAAAV | SEQ ID No: 80 | A2, A_0201, B7, B51 |
| 22 | 75 | WLAAAQVQA | SEQ ID No: 81 | A2, A3, A_0201 |
| 23 | 82 | QAEQTAAQA | SEQ ID No: 82 | A1, A_0301 |
| 24 | 83 | AEQTAAQAA | SEQ ID No: 83 | B44, B_4403 |
| 25 | 86 | TAAQAAMI | SEQ ID No: 84 | A3, B8, B51 |
| 26 | 91 | AAMIAFEFA | SEQ ID No: 85 | A_0201, A_0301, B_3501 |
| 27 | 92 | AMIAFEFAV | SEQ ID No: 86 | A2, A_0201 |
| 28 | 95 | AEFEAVKTA | SEQ ID No: 87 | B44 |
| 29 | 97 | FEAVKTAVV | SEQ ID No: 88 | B8, B44 |
| 30 | 98 | EAVKTAVVQ | SEQ ID No: 89 | B8, B_3501 |
| 31 | 101 | KTAVVQPML | SEQ ID No: 90 | A_0101, A_0201 |
| 32 | 106 | QPMLVAANR | SEQ ID No: 91 | A3, B7, B_0702, B_3501, B51 |
| 33 | 107 | PMLVAANRA | SEQ ID No: 92 | A2, A_0201, B8 |
| 34 | 109 | LVAANRADL | SEQ ID No: 93 | B7 |
| 35 | 112 | ANRADLVSL | SEQ ID No: 94 | B7, B44 |
| 36 | 114 | RADLVSLVM | SEQ ID No: 95 | B7, B_3501 |
| 37 | 118 | VSLVMSNLF | SEQ ID No: 96 | A24, A_0101 |
| 38 | 124 | NLFGQNAPA | SEQ ID No: 97 | A2 |
| 39 | 130 | APAIAAIEA | SEQ ID No: 98 | B7, B_3501 |
| 40 | 132 | AIAAIEATY | SEQ ID No: 99 | A1, A_0101, A3, A_0301 |
| 41 | 138 | ATYEQMWAA | SEQ ID No: 100 | A_0101, A2, A_0301 |
| 42 | 142 | QMWAADVSA | SEQ ID No: 101 | A2, A_0201 |
| 43 | 150 | AMSAYHAGA | SEQ ID No: 102 | A2, A_0201 |
| 44 | 152 | SAYHAGASA | SEQ ID No: 103 | B7, B_3501 |
| 45 | 153 | AYHAGASAI | SEQ ID No: 104 | A1, A_0201, A3, A_2402, A_0301, A24 |
| 46 | 157 | GASAIASAL | SEQ ID No: 105 | B7, B_3501 |
| 47 | 160 | AIASALSPF | SEQ ID No: 106 | A_0301, B7 |
| 48 | 164 | ALSPFSKPL | SEQ ID No: 107 | A_0101, A2, A_0201 |
| 49 | 167 | PFSKPLQNL | SEQ ID No: 108 | A24, A_2402, Cw_0401 |
| 50 | 170 | KPLQNLGL | SEQ ID No: 109 | B7, B_3501, B51 |
| 51 | 174 | NLAGLPAWL | SEQ ID No: 110 | A2, A_0201, B7, Cw_0602 |
| 52 | 175 | LAGLPAWLA | SEQ ID No: 111 | A_0101, A_0301 |
| 53 | 178 | LPAWLASGA | SEQ ID No: 112 | B7, B_3501 |

[0652]

| 추정 CD8 에피토프 번호 | 아미노산 위치 | 에피토프 서열 | SEQ ID No: | HLA 대립유전자 |
|----------------------|------------|------------|----------------|--|
| 54 | 181 | WLASGAPAA | SEQ ID No: 113 | A_0201 |
| 55 | 185 | GAPAAAMTA | SEQ ID No: 114 | A3, A_0301, B8 |
| 56 | 186 | APAAAMTAA | SEQ ID No: 115 | A3, B_3501, B7 |
| 57 | 189 | AAMTAAAGI | SEQ ID No: 116 | A1, A_2402, B51 |
| 58 | 192 | TAAAGIPAL | SEQ ID No: 117 | B7, B51, Cw_0602 |
| 59 | 193 | AAAGIPALA | SEQ ID No: 118 | A_0101, A_0301 |
| 60 | 199 | ALAGGPPTAI | SEQ ID No: 119 | A1, A_0101, A2, A_0201, A_0301 |
| 61 | 201 | AGGPPTAINL | SEQ ID No: 120 | A1, A24, B51 |
| 62 | 203 | GPTAINLGI | SEQ ID No: 121 | A_2402, B7, B_0702, B8, B_3501, B51 |
| 63 | 206 | AINLGIANV | SEQ ID No: 122 | A2, A_0201 |
| 64 | 231 | NANLGNYNF | SEQ ID No: 123 | A24, B_3501 |
| 65 | 236 | NYNFGSGNF | SEQ ID No: 124 | A24 |
| 66 | 263 | NLGSNNVGV | SEQ ID No: 125 | A2, A_0201 |
| 67 | 383 | SLNTGSYNYM | SEQ ID No: 126 | A2 |
| 68 | 408 | NANTGFLNA | SEQ ID No: 127 | A_0101, A_0301 |
| 69 | 413 | FLNAGNINT | SEQ ID No: 128 | A2 |
| 70 | 418 | NINTGVFNI | SEQ ID No: 129 | A_0201, A_0301 |
| 71 | 447 | GVGQGSLLQF | SEQ ID No: 130 | B7, B_3501 |
| 72 | 456 | SITTPDLTL | SEQ ID No: 131 | A_0101, A_0201, A_0301 |
| 73 | 459 | TPDLTLPLP | SEQ ID No: 132 | B7, B_3501, B51 |
| 74 | 461 | DLTLPLPLQI | SEQ ID No: 133 | A_0101, A_0201 |
| 75 | 466 | PLQIPGISV | SEQ ID No: 134 | A_0201 |
| 76 | 469 | IPGISVPAF | SEQ ID No: 135 | B7, B_3501 |
| 77 | 471 | GISVPAFSL | SEQ ID No: 136 | A_0101, A_0201, A_0301, B44 |
| 78 | 474 | VPAFSLPAI | SEQ ID No: 137 | B7, B51 |
| 79 | 476 | AFSLPAITL | SEQ ID No: 138 | A_0201, A24, B7 |
| 80 | 479 | LPAITLPSL | SEQ ID No: 139 | A24, B7, B_3501, B51, B_0702, Cw_0401, Cw_0602 |
| 81 | 481 | AITLPSLNI | SEQ ID No: 140 | A_0101, A_0301 |
| 82 | 483 | TLPSLNIPA | SEQ ID No: 141 | A2, A_0201, A_0301 |
| 83 | 484 | LPSLNIPAA | SEQ ID No: 142 | B7, B_3501, B51 |
| 84 | 492 | ATTPANITV | SEQ ID No: 143 | A1, A_0101, A2, A_0201 |
| 85 | 494 | TPANITVGA | SEQ ID No: 144 | B7, B_3501 |
| 86 | 497 | NITVGAFSL | SEQ ID No: 145 | A2, A_0201, A_0301, A24 |
| 87 | 502 | AFSLPGLTL | SEQ ID No: 146 | A24, A_2402, B7 |
| 88 | 505 | LPGLTLPSL | SEQ ID No: 147 | B7, B_3501, B51, B_0702, Cw_0602 |
| 89 | 509 | TLPSLNIPA | SEQ ID No: 148 | A2 |
| 90 | 518 | ATTPANITV | SEQ ID No: 149 | A1, A2 |
| 91 | 523 | NITVGAFSL | SEQ ID No: 150 | A2, A24, A_0201 |
| 92 | 528 | AFSLPGLTL | SEQ ID No: 151 | A_2402, B7 |
| 93 | 531 | LPGLTLPSL | SEQ ID No: 152 | B7, B_0702, B_3501, B51, Cw_0602 |
| 94 | 535 | TLPSLNIPA | SEQ ID No: 153 | A2 |
| 95 | 544 | ATTPANITV | SEQ ID No: 154 | A1, A2 |
| 96 | 549 | NITVGAFSL | SEQ ID No: 155 | A2, A24, A_0201 |
| 97 | 554 | AFSLPGLTL | SEQ ID No: 156 | A_2402, B7 |
| 98 | 557 | LPGLTLPSL | SEQ ID No: 157 | B7, B_0702, B_3501, B51, Cw_0602 |
| 99 | 561 | TLPSLNIPA | SEQ ID No: 158 | A2 |

[0653]

| 추정 CD8 에피토프 번호 | 아미노산 위치 | 에피토프 서열 | SEQ ID No: | HLA 대립유전자 |
|----------------------|------------|-----------|----------------|----------------------------------|
| 100 | 570 | ATTPANITV | SEQ ID No: 159 | A1, A2 |
| 101 | 575 | NITVGAFSL | SEQ ID No: 160 | A2, A24, A_0201 |
| 102 | 580 | AFSLPGLTL | SEQ ID No: 161 | A_2402, B7 |
| 103 | 583 | LPGLTLPSL | SEQ ID No: 162 | B7, B_0702, B_3501, B51, Cw_0602 |
| 104 | 587 | TLPSLNIPA | SEQ ID No: 163 | A2 |
| 105 | 596 | ATTPANITV | SEQ ID No: 164 | A1, A2 |
| 106 | 601 | NITVGAFSL | SEQ ID No: 165 | A2, A24 |
| 107 | 609 | LPGLTLPSL | SEQ ID No: 166 | B7, B_0702, B_3501, B51, Cw_0602 |
| 108 | 622 | ATTPANITV | SEQ ID No: 167 | A1, A2 |
| 109 | 625 | PANITVSGF | SEQ ID No: 168 | A24, B_3501 |
| 110 | 627 | NITVSGFQL | SEQ ID No: 169 | A_0201, A_0301 |
| 111 | 635 | LPPLSIPSV | SEQ ID No: 170 | B7, B51 |
| 112 | 636 | PPLSIPVA | SEQ ID No: 171 | B7, B_3501 |
| 113 | 640 | IPSAIPPV | SEQ ID No: 172 | B7, B51 |
| 114 | 645 | IPPVTPPI | SEQ ID No: 173 | B7, B51 |
| 115 | 650 | VPPITVGAF | SEQ ID No: 174 | B7, B_3501 |
| 116 | 662 | PLQIPEVTI | SEQ ID No: 175 | A_0201 |
| 117 | 665 | IPEVTIPQL | SEQ ID No: 176 | B7, B_3501, B51 |
| 118 | 669 | TIPQLTIPA | SEQ ID No: 177 | A_0201, A_0301 |
| 119 | 673 | LTIPAGITI | SEQ ID No: 178 | A_0101, A_0201, B51 |
| 120 | 678 | GITIGGFSL | SEQ ID No: 179 | A_0101, A_0201, A_0301 |
| 121 | 686 | LPAHTQPI | SEQ ID No: 180 | B7, B8, B51 |
| 122 | 688 | AIHTQPITV | SEQ ID No: 181 | A_0101, A_0201, A_0301 |
| 123 | 693 | PITVGQIGV | SEQ ID No: 182 | A_0201 |
| 124 | 698 | QIGVGQFGL | SEQ ID No: 183 | A_0201 |
| 125 | 705 | GLPSIGWDV | SEQ ID No: 184 | A2, A_0201 |
| 126 | 706 | LPSIGWDVF | SEQ ID No: 185 | B7, B_3501 |
| 127 | 712 | DVFLSTPRI | SEQ ID No: 186 | A_0201 |
| 128 | 714 | FLSTPRITV | SEQ ID No: 187 | A_0101, A2, A_0201, B8 |
| 129 | 717 | TPRITVPAF | SEQ ID No: 188 | B7, B8, B_3501 |
| 130 | 725 | FGIPFTLQF | SEQ ID No: 189 | A_0201, B8, B_3501 |
| 131 | 729 | FTLQFQTNV | SEQ ID No: 190 | A_0101, A2, A_0201 |
| 132 | 732 | QFQTNVPAL | SEQ ID No: 191 | A24 |
| 133 | 739 | ALQPPGGGL | SEQ ID No: 192 | A_0101, A_0201 |
| 134 | 747 | LSTFTNGAL | SEQ ID No: 193 | A_0101, B7 |
| 135 | 748 | STFTNGALI | SEQ ID No: 194 | A_0101, A_0201, A_0301, A24 |
| 136 | 749 | TFTNGALIF | SEQ ID No: 195 | A24 |
| 137 | 754 | ALIFGEFDL | SEQ ID No: 196 | A_0101, A2, A_0201 |
| 138 | 758 | GEFDLPQLV | SEQ ID No: 197 | B44 |
| 139 | 762 | LPQLVVHPY | SEQ ID No: 198 | B7, B51 |
| 140 | 764 | QLVVHPYTL | SEQ ID No: 199 | A_0101, A2, A_0201, B8 |
| 141 | 768 | HPYTLTGPI | SEQ ID No: 200 | B7, B8, B51 |
| 142 | 770 | YTLTGPIVI | SEQ ID No: 201 | A_0101, A2, A_0201 |
| 143 | 774 | GPIVIGSFF | SEQ ID No: 202 | A24, B7, B_3501 |
| 144 | 775 | PIVIGSFFL | SEQ ID No: 203 | A_0101, A_0301 |
| 145 | 780 | SFFLPAFNI | SEQ ID No: 204 | A24 |
| 146 | 783 | LPAFNIPGI | SEQ ID No: 205 | B7, B51 |
| 147 | 788 | IPGIDVPAI | SEQ ID No: 206 | B7, B51 |

[0654]

| 추정 CD8 에피토프 번호 | 아미노산 위치 | 에피토프 서열 | SEQ ID No: | HLA 대립유전자 |
|----------------|---------|------------|----------------|-----------------------------|
| 148 | 790 | GIDVPAINV | SEQ ID No: 207 | A_0101, A_0201, A_0301 |
| 149 | 793 | VPAINVDGF | SEQ ID No: 208 | B7, B_3501 |
| 150 | 795 | AINVDGFTL | SEQ ID No: 209 | A_0101, A_0201, A_0301, B44 |
| 151 | 802 | TLPQITTPA | SEQ ID No: 210 | A2 |
| 152 | 803 | LPQITTPAI | SEQ ID No: 211 | B7, B8, B51 |
| 153 | 808 | TPAITTPEF | SEQ ID No: 212 | B7, B_3501 |
| 154 | 810 | AITTPEFAI | SEQ ID No: 213 | A_0101, A_0201, A_0301 |
| 155 | 813 | TPEFAIPPI | SEQ ID No: 214 | B7, B51 |
| 156 | 818 | IPPIGVGGF | SEQ ID No: 215 | B7, B_3501 |
| 157 | 820 | PIGVGGFTL | SEQ ID No: 216 | A_0101, A_0201, A_0301 |
| 158 | 828 | LPQITTQEI | SEQ ID No: 217 | B7, B51 |
| 159 | 829 | PQITTQEI | SEQ ID No: 218 | A_0101 |
| 160 | 835 | EITPELTI | SEQ ID No: 219 | A_0101, A_0201, A_0301 |
| 161 | 838 | TPELTINSI | SEQ ID No: 220 | B7, B51 |
| 162 | 840 | ELTINSIGV | SEQ ID No: 221 | A_0201 |
| 163 | 845 | SIGVGGFTL | SEQ ID No: 222 | A_0201, A_0301 |
| 164 | 853 | LPQITTPPI | SEQ ID No: 223 | B7, B51 |
| 165 | 858 | TPPITPPPL | SEQ ID No: 224 | B7, B_3501, B51 |
| 166 | 860 | PITPPPLTI | SEQ ID No: 225 | A_0101, A_0201, A_0301 |
| 167 | 863 | TPPLTIDPI | SEQ ID No: 226 | B7, B51 |
| 168 | 870 | PINLTGFTL | SEQ ID No: 227 | A_0101, A_0301 |
| 169 | 913 | TPPLTIEPI | SEQ ID No: 228 | B7, B51 |
| 170 | 915 | PLTIEPIGV | SEQ ID No: 229 | A_0101, A_0201 |
| 171 | 918 | IEPIGVGGF | SEQ ID No: 230 | B44 |
| 172 | 929 | PPLTVPGIH | SEQ ID No: 231 | B_3501 |
| 173 | 930 | PLTVPGIHL | SEQ ID No: 232 | A_0101, A_0201 |
| 174 | 935 | GIHLPSTTI | SEQ ID No: 233 | A_0101, A_0301 |
| 175 | 937 | HLPSTTIGA | SEQ ID No: 234 | A2 |
| 176 | 938 | LPSTTIGAF | SEQ ID No: 235 | B7, B8, B_3501 |
| 177 | 946 | FAIPGGPGY | SEQ ID No: 236 | A_0101, A_0301, B_3501 |
| 178 | 958 | STAPSSGFF | SEQ ID No: 237 | A1, A_0101, A24 |
| 179 | 986 | WFNTNPAGL | SEQ ID No: 238 | A24 |
| 180 | 1002 | NFGGLSSGF | SEQ ID No: 239 | A24 |
| 181 | 1005 | GLSSGFNSL | SEQ ID No: 240 | A_0101, A2, A_0201 |
| 182 | 1012 | NLGSVSGVF | SEQ ID No: 241 | A_0201 |
| 183 | 1020 | FANRGILPF | SEQ ID No: 242 | B8, B_3501 |
| 184 | 1022 | NRGILPFSV | SEQ ID No: 243 | A2, A24, B51 |
| 185 | 1025 | ILPFSVASV | SEQ ID No: 244 | A2, A_0201 |
| 186 | 1026 | LPFVASVV | SEQ ID No: 245 | B7, B51 |
| 187 | 1029 | SVASVSGVF | SEQ ID No: 246 | A24, B7 |
| 188 | 1036 | GFSANIGTNL | SEQ ID No: 247 | A24, Cw_0401, Cw_0602 |

[0655]

[0656]

표 2 및 3에서 확인될 수 있는 바와 같이, Rv1753c는 다수의 예측 CD4+ 및 CD8 T 세포 에피토프를 함유한다. 또한, 이러한 정보는 단백질이 세계적으로 발생하는 HLA(즉, 카프카스, 아프리카, 아시아 또는 라틴-아메리카 개체로부터의 HLA - 웹사이트 www.allelefrequencies.net 참조)에 의해 인지될 수 있는 에피토프를 갖는 것을 암시한다.

[0657]

실시예 3 - H37Rv 동족체

[0658]

다수의 *M. 투베르쿨로시스* 균주 및 BCG로부터의 Rv1753c 서열을 GenBank의 BLASTP 검색을 이용하여 확인하였다 (H37Rv 참조 서열 등록 번호 YP_177877.1).

| 균주 | 수탁 번호 | 동일성 % |
|---------|----------------|-------|
| CDC1551 | NP_336255.1 | 95 |
| F11 | YP_001287714.1 | 80 |
| Haarlem | ZP_02247061.1 | 82 |
| C | ZP_00878894.1 | 96 |
| BCG | YP_977884.1 | 83 |

[0659]

[0660]

상동 서열의 정렬은 N-말단 및 C-말단 영역에서의 높은 수준의 동일성을 제시하는데, 대부분의 변이가 중심 연결 영역에서 생성된다.

[0661]

생물학적 검정

[0662]

Rv1753c에 대한 T 세포 반응의 정량화

- [0663] 폴리펩티드를 감염(예를 들어, 잠복 감염)된 개체로부터의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 전체 혈액 제조물에서 T-세포를 활성화(증식의 유도 및/또는 사이토카인의 생성)시키는 능력에 대해 스크리닝하였다.
- [0664] 잠재적으로 감염된 개체는 보통 10mm를 초과하는 직경을 갖는 피부 시험에 의해 확인되며, 상기 잠재적으로 감염된 개체는 증상이 없고, Mtb 양성 배양이 없고, 음성 담(sputum) 음성이고, 병변이 없다(흉부 X-선에 의해 검출됨).
- [0665] PBMC 샘플 또는 전체 혈액을 기초로 하여 다양한 시험관내 검정이 이용될 수 있고; 항원(또는 적절한 경우 이의 변이체/면역원성 단편)의 존재하에서의 재자극 후, 세포의 증식이 결정될 수 있거나(CFSE/유세포측정기에 의해 측정됨), 사이토카인의 생성이 정상화될 수 있다(배양된 세포의 상층액에 존재하고, ELISA에 의해 측정되거나, CD4 및 CD8 T 세포의 세포내 염색 및 유세포측정기에 의한 분석에 의해 측정될 수 있다).
- [0666] 예를 들어, PBMC 샘플은 표준 절차 후의 피콜-하이페크(Ficoll-Hypaque) 밀도 구배 원심분리에 의해 해파린 처리된 전체 혈액으로부터 수득될 수 있다. 이후, 세포는 세척되고, 시험때까지 액체 질소에서 냉동보존될 수 있다(추가 세부사항은 문헌[Lalvani A et al. *J. Infect. Dis.* 1999 180:1656-1664] 참조).
- [0667] T 세포 증식
- [0668] 삼중수소 티미딘을 이용한 림프구 증식 분석을 수행함으로써 특정 면역 반응이 특성규명될 수 있다. 이러한 기술은 항원에 대한 시험관내 자극 후의 세포 팽창을 평가한다. 실제, 세포수의 근원적인 변화와 밀접하게 관련된 과정인 DNA로의 삼중수소-티미딘의 혼입을 평가함으로써 세포 증식이 결정된다.
- [0669] 더욱 적합하게는, 카르복시플루오르세인 디아세테이트(CFSE)의 숙신이미딜 에스테르를 이용하여 림프구 증식이 수행될 수 있다. CFSE는 리신 측쇄 및 다른 이용가능한 아민기와 반응에 의해 세포내 및 세포 표면 단백질들 모두에 자발적 및 비가역적으로 커플링된다. 림프구 세포가 분열하는 경우, CFSE 라벨링은 딸세포 사이에 동등하게 분배되고, 따라서 형광이 모(parent)의 절반이 된다. 결과적으로, 세포 형광 밀도의 이등분은 증식 세포 집단에서의 각각의 성공적인 생식을 나타내고, 이는 유세포측정기에 의해 용이하게 추적된다(추가 세부사항에 대해서는 문헌[Hodgkins, PD et al *J. Exp. Med.* 1996 184:277-281] 참조).
- [0670] 실제적으로, 해동 후, PMBC는 세척되고, CFSE로 염색되고, 배양 배지(글루타민, 비필수 아미노산, 피루베이트 및 열 비활성화된 인간 AB 혈청이 보충된 RPMI-1640) 중의 10 ug/ml의 항원과 함께 72시간 동안 배양(2×10^5 개의 세포)될 수 있다. 이후, 세포는 수거되고, 기억 CD8 및 CD4+ T-세포를 확인하기 위한 표면 염색을 이용하여 표현형이 특성규명될 수 있다. 이후, 각각의 항원에 대한 반응으로 림프구 증식의 정도(시험관내 자극 후에 감소된 CFSE 강도를 갖는 세포의 비율)를 나타내기 위해 유세포측정 분석이 사용될 수 있다.
- [0671] 사이토카인 생성
- [0672] IFN γ (감마)-생성(또는, 예를 들어, IL2, TNF-알파, IL5, IL12 등과 같은 다른 사이토카인의 생성)은 효소면역 측정법(ELISA)를 이용하여 측정될 수 있다. ELISA 플레이트가 실온에서 4시간 동안 PBS 중에서 인간 IFN- γ (PharMingen, San Diego, CA)에 특이적인 마우스 모노클로날 항체로 코팅될 수 있다. 이후, 웰은 실온에서 1시간 동안 5% (W/V) 건조 탈지유를 함유하는 PBS로 블로킹된다. 이후, 플레이트는, 예를 들어, PBS/0.2% TWEEN-20으로 6회 세척되고, ELISA 플레이트에서 배양 배지 중에서 1:2 희석된 샘플이 실온에서 밤새 인큐베이션된다. 플레이트는 다시 세척되고, 예를 들어, PBS/10% 정상 염소 혈청에 1:3000 희석된 폴리클로날 토끼 항-인간 IFN- γ 혈청이 각각의 웰에 첨가될 수 있다. 이후, 플레이트가 실온에서 2시간 동안 인큐베이션되고, 세척되고, 호스라디쉬 퍼옥시다아제 커플링된 항-토끼 IgG(Sigma Chemical So., St. Louis, MO)가, 예를 들어, PBS/5% 건조 탈지유 중에 1:2000 희석으로 첨가될 수 있다. 실온에서의 추가의 2시간의 인큐베이션 후, 플레이트가 세척되고, TMB 기질이 첨가된다. 반응은 1N 황산을 이용하여 20분 후에 중지될 수 있다. 이후, 참조 파장으로 570 nm를 이용하여 450 nm에서 광학 밀도가 결정될 수 있다. 통상적으로, 배지 단독에서 배양된 세포로부터의 평균 OD보다 2배를 초과하는 OD를 발생시키는 둘 모두의 레플리케이트에서 발생한 분획이 양성으로 간주될 수 있다.
- [0673] 실시예 4 - CB6F1 마우스에서의 면역원성
- [0674] 항원의 면역원성을 CB6F1 마우스(BALB/c 및 C57BL/6 마우스의 첫번째 세대 교배)에서 평가하였다.
- [0675] CB6F1 마우스를 애주버트 시스템 AS01E(3D-MPL 및 QS21을 포함하는 리포솜 애주버트 제형)과 조합된 0.5 ug 또는 2 ug의 단백질 항원으로 3회(0일, 14일 및 28일) 근내 면역화시켰다.

[0676] 실험 계획은 하기와 같았다:

| 그룹 | 0 일 | 14 일 | 28 일 |
|----|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 2 ug Rv1753c/AS01E | 2 ug Rv1753c/AS01E | 2 ug Rv1753c/AS01E |
| 2 | 0.5 ug Rv1753c/AS01E | 0.5 ug Rv1753c/AS01E | 0.5 ug Rv1753c/AS01E |

[0677] 각각의 프로토콜 그룹에서 전체 24마리의 마우스를 사용하였다.
 [0678]

[0679] 21일(즉, 두번째 면역화 후 7일) 및 35일(즉, 세번째 면역화 후 7일)에 말초 혈액 림프구(PBL)를 수거하고, 폴링시키고, 항원 특이적 CD4 & CD8 T 세포 반응(IL-2 및/또는 IFN-감마 및/또는 TNF-알파를 생성하는 CD4 또는 CD8 T 세포에 의해 결정됨)을 관심 서열을 포함하는 15머 펩티드의 풀을 이용한 밤새의 시험관내 재자극 후에 유세포측정에 의해 측정하였다. IL-2 및/또는 IFN-감마 및/또는 TNF-알파를 발현하는 마우스 T 세포의 검출을 사이토카인 발현의 단기 항원 유도 시험관내 증폭을 이용하여 수행하였다.

[0680] 간단히, 적혈구 세포를 용해시키기 위해 PharmLyse 용액(BD-Pharmingen)을 해파린 처리된 마우스 말초 혈액에 첨가하였다. 수득된 PBL(말초 혈액 림프구)을 세척한 후, 관심 항원의 서열을 포함하고, 11개 아미노산이 중첩하는 15-머 펩티드의 풀, 및 CD28 및 CD49d에 대한 1 ug/ml의 항체(BD-Pharmingen)의 존재하에서 인큐베이션시켰다. 각각의 15-머 펩티드를 1 ug/ml의 최종 농도로 사용하였다. 배지 대조군을 또한 CD28 및 CD49d에 대한 항체를 이용하여 자극시켰다.

[0681] 사이토카인 분비 차단 화합물 브레펠딘-A(brefeldin-A)(BD-Pharmingen)를 37°C, 5% CO₂에서의 배양 개시 2시간 후에 첨가하고, 세포를 추가 4시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 유지시킨 후, +4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0682] 이후, 세포를 수거하고, 퍼시픽 블루(Pacific Blue) 커플링된 항-CD4(BD - 클론 RM4-5, BD-Pharmingen) 및 페리딘인 클로로필 A 단백질(PerCp) 시아닌5.5(Cy5.5) 커플링된 항-CD8 알파(클론 53-6.7, BD-Pharmingen) 항체로 염색하였다.

[0683] 이후, 세포를 세척하고, 고정시키고, 투과화시키고(Cytofix-cytoperm kit, BD-Pharmingen), 알로피코시아닌 커플링된 항-IFN-g 항체(clone XMG1.2, BDPharmingen), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 커플링된 항-IL-2 항체(clone JES 6-5H4, Beckman Coulter) 및 피코에리트린(PE) 커플링된 항-TNF 알파 항체(clone MP6-XT22, BDPharmingen)로 염색시켰다. 최종 세척 후, 염색된 세포를 LSR II 유세포측정기(Beckton-Dickinson)에서 분석하였다. CD8+ 서브셋에서 10,000 세포의 최소수가 획득되었다.

[0684] 추가의 배경지식을 위해 문헌[Walzer T et al *Cell Immunol.* 2000 206(1):16-25 및 Maecker HT et al *J. Immunol. Methods* 2001 255(1-2):27-40]을 참조하라.

[0685] 음성 대조군으로서, 일부 세포를 또한 배양 배지(자극되지 않음) 중에서 시험관내에서 밤새 배양하였다. 펩티드 자극된 세포에 의해 생성된 평균 사이토카인 반응으로부터 자극되지 않은 세포에 의해 생성된 평균 사이토카인 반응을 공제함으로써 항원 특이적 반응을 계산하였다.

[0686] 각각의 시점에서, 및 각각의 군에 대해, 데이터를 6마리 각각의 4개의 풀로부터 수거하였다. 하기 데이터는 IL-2 및/또는 IFN-감마 및/또는 TNF-알파를 생성하는 CD4 또는 CD8 T 세포의 %로 제시된다. 마우스의 각각의 개별적 풀(삼각형) 뿐만 아니라 군의 평균 값(막대)을 플로팅하였다.

[0687] 도 1은 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서 Rv1753c-특이적 CD4 및 CD8 T 세포 반응이 Rv1753c/AS01E의 어느 하나의 용량으로 면역화된 마우스에서 검출되는 것을 나타낸다. Rv1753c-특이적 T 세포 반응의 수준은 0.5 ug Rv1753c/AS01E로 면역화된 마우스에서 보다 2 ug Rv1753c/AS01E로 면역화된 마우스에서 더 높다.

[0688] 도 2는 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서의 Rv1753c 펩티드 풀로 자극된 PBL(배지가 제거되지 않음)로부터의 CD4 T 세포 반응의 사이토카인 프로파일을 나타낸다.

[0689] 도 3은 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서의 Rv1753c 펩티드 풀로 자극된 PBL(배지가 제거되지 않음)로부터의 CD8 T 세포 반응의 사이토카인 프로파일을 나타낸다.

[0690] 도 4는 35일(즉, 세번째 면역화 7일 후)에서 Rv1753c-특이적 CD4 및 CD8 T 세포 반응이 Rv1753c/AS01E의 어느 하나의 용량으로 면역화된 마우스에서 검출되는 것을 나타낸다. Rv1753c-특이적 T 세포 반응의 수준은 0.5 ug Rv1753c/AS01E로 면역화된 마우스에서 보다 2 ug Rv1753c/AS01E로 면역화된 마우스에서 더 높다. 세번째 주입은 21일째에 관찰된 CD4 T 세포 반응을 0.5 ug의 낮은 용량에서 증가시켰으나, 2 ug의 더 높은 항원 용량에서

증가시키지 않았다. 항원-특이적 CD8 T 세포 반응은 21일째 보다 35일째에 더 낮다.

[0691] 도 5는 35일(즉, 세번째 면역화 7일 후)에서의 Rv1753c 펩티드 풀로 자극된 PBL(배지가 제거되지 않음)로부터의 CD4 T 세포 반응의 사이토카인 프로파일을 나타낸다. 기술적인 어려움 때문에, 2 ug 용량에서의 세포의 세번째 풀은 이용할 수 없었다.

[0692] 도 6은 35일(즉, 세번째 면역화 7일 후)에서의 Rv1753c 펩티드 풀로 자극된 PBL(배지가 제거되지 않음)로부터의 CD8 T 세포 반응의 사이토카인 프로파일을 나타낸다. 기술적인 어려움 때문에, 2 ug 용량에서의 세포의 세번째 풀은 이용할 수 없었다.

[0693] **실시예 5 - C57BL/6 마우스에서의 면역원성**

[0694] 항원의 면역원성을 또한 C57BL/6 마우스에서 평가하였다.

[0695] C57BL/6 마우스를 애쥬번트 시스템 AS01E(3D-MPL 및 QS21을 포함하는 리포솜 애쥬번트 제형)과 조합된 1 ug 또는 4 ug의 단백질 항원으로 3회(0일, 14일 및 28일) 근내 면역화시켰다.

[0696] 실험 계획은 하기와 같았다:

| 그룹 | 0 일 | 14 일 | 28 일 |
|----|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 4 ug Rv1753c/AS01E | 4 ug Rv1753c/AS01E | 4 ug Rv1753c/AS01E |
| 2 | 1 ug Rv1753c/AS01E | 1 ug Rv1753c/AS01E | 1 ug Rv1753c/AS01E |

[0697] 21일(즉, 두번째 면역화 후 7일) 및 35일(즉, 세번째 면역화 후 7일)에 말초 혈액 림프구(PBL)를 수거하고, 플링시키고, 항원 특이적 CD4 & CD8 T 세포 반응(IL-2 및/또는 IFN-감마 및/또는 TNF-알파를 생성하는 CD4 또는 CD8 T 세포에 의해 결정됨)을 관심 서열을 포함하는 15머 펩티드의 풀을 이용한 밤새의 시험관내 재자극 후에 유세포측정에 의해 측정하였다. 하기 절차를 상기 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0699] 음성 대조군으로서, 일부 세포를 또한 배양 배지(자극되지 않음) 중에서 시험관내에서 밤새 배양하였다. 펩티드 자극된 세포에 의해 생성된 평균 사이토카인 반응으로부터 자극되지 않은 세포에 의해 생성된 평균 사이토카인 반응을 공제함으로써 항원 특이적 반응을 계산하였다.

[0700] 각각의 시점에서, 및 각각의 군에 대해, 데이터를 6마리 각각의 4개의 풀로부터 수거하였다. 하기 데이터는 IL-2 및/또는 IFN-감마 및/또는 TNF-알파를 생성하는 CD4 또는 CD8 T 세포의 %로 제시된다. 마우스의 각각의 개별적 풀(삼각형) 뿐만 아니라 군의 평균 값(막대)을 플로팅하였다.

[0701] 도 7은 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서 Rv1753c-특이적 CD4 및 CD8 T 세포 반응이 Rv1753c/AS01E의 어느 하나의 용량으로 면역화된 마우스에서 검출되는 것을 나타낸다. Rv1753c-특이적 CD4 T 세포 반응의 수준은 Rv1753c의 면역화 용량에 관계없이 유사하다. 대조적으로, 1 ug의 Rv1753c/AS01E로 면역화된 마우스는 1 ug의 Rv1753c/AS01E로 면역화된 마우스보다 높은 Rv1753c-특이적 CD8 T 세포 반응을 나타내었다.

[0702] 도 8은 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서의 Rv1753c 펩티드 풀로 자극된 PBL(배지가 제거되지 않음)로부터의 CD4 T 세포 반응의 사이토카인 프로파일을 나타낸다. 기술적 난점으로 인해, 1 ug 용량의 세포의 첫번째 풀에 대한 데이터는 이용가능하지 않았다.

[0703] 도 9는 21일(즉, 두번째 면역화 7일 후)에서의 Rv1753c 펩티드 풀로 자극된 PBL(배지가 제거되지 않음)로부터의 CD8 T 세포 반응의 사이토카인 프로파일을 나타낸다. 기술적 난점으로 인해, 4 ug 용량의 세포의 세번째 및 네번째 풀에 대한 데이터는 이용가능하지 않았다.

[0704] 35일에 대한 면역학적 데이터는 본 출원이 준비된 시점에서 아직 이용가능하지 않았다.

[0705] **실시예 6 - 잠복기 TB를 지니는 인간으로부터의 PBMC에 의한 시험관내 인지**

[0706] 남아프리카 출신의 4명의 TB 무경험 건강한 성인(PPD 피부 시험 = 0 mm) 및 8명의 TB 잠복성 감염 건강한 성인(PPD 피부 시험 = 15 mm 이상)에서 본 발명의 항원에 특이적인 말초 T 세포 반응을 평가하기 위해 당해 실험을 수행하였다.

PPD 피부 시험 데이터

| 개별 번호 | ID | 경결 직경 (mm) |
|----------|----|------------------|
| 4 | | 0 |
| 5 | | 0 |
| 33 | | 0 |
| 38 | | 0 |
| 36 | | 15 |
| 46 | | 15 |
| 13 | | 15 |
| 7 | | 16 |
| 58 | | 25 |
| 74 | | 26 |
| 8 | | 53 |
| 60 | | 55 |

[0707]

[0708]

세포 매개 면역(cell-mediated immune, CMI) 반응을 세포내 사이토카인 염색(intracellular cytokine staining, ICS) 분석에 의해 분리된 말초혈단핵구(PBMCs) 상의 사이토카인을 측정함으로써 평가하였다.

[0709]

수행한 ICS는 앞에서 기술한 방법학을 변형한 것이었다(다음 문헌 참조: Von Eschen et al, Hum. Vaccin. 2009 5(7)). PBMCs를 한 폴의 15-머 펩티드로 시험관내에서 자극시켰다 - 11개 아미노산에 의해 중첩됨 - 관심 대상 항원의 전체 서열을 커버함. 세포를 2시간 동안 펩티드로 자극하고, Brefeldin A의 존재하에서 밤새 추가로 배양하고, ICS를 위해 가공하고, 유세포분석기를 사용하여 분석하였다. IFN-감마 및/또는 TNF-알파 및/또는 IL-17을 발현하는 항원-특이적 CD3+CD4+ 또는 CD3+CD8+ T 세포의 빈도를 측정하였다. 매질로 자극된 세포 반응을 펩티드 풀로 자극된 세포에서 얻어진 반응에서 제외하였다.

[0710]

ICS: 항체

[0711]

항-CD3 PO (Invitrogen - cat CD0330)

[0712]

항-CD4 PB (BD - cat 558116)

[0713]

항--CD8 APC-H7 (BD - cat 641400)

[0714]

항-IFNg AF700 (BD-Pharmingen - cat 557995)

[0715]

항-TNF PE-Cy7 (BD-Pharmingen - cat 557647)

[0716]

항-IL17 AF647 (BD-Pharmingen - cat 51-7178-71)

[0717]

이 결과는 100만개의 CD3+CD4+ T 세포 당 TNF-알파와 IFN-감마를 발현하는 항원-특이적 CD3+CD4+ T 세포의 개수를 제시하는데, 그 이유는 이러한 세포들이 주요한 항원-특이적 CD4 T 세포 집단이기 때문이다(매질에 기인한 백그라운드 반응 수준은 제거됨). 항원-특이적 CD3+CD8+ T 세포는 검출되지 않았다. 도 10은 항원-특이적 CD4 T 세포 반응이 무경험 개체들에서 측정된 비특이적 CD4 T 세포 반응과 비교할 때 8명의 잠복성 감염된 개체들(개체의 수 60에서가 아님) 중 7명에서 측정되었음을 제시한다.

[0718]

결론적으로, Rv1753c 항원이 CB6F1 및 C57BL/6 마우스 둘 모두에서 면역 반응을 유발할 수 있는 것이 인지될 수 있다. 또한, 사이토카인 생성의 프로파일은 항원 특이적 T 세포의 많은 부분이 다수의 Th1 관련 사이토카인을 발현(즉, 다기능성 T 세포 반응이 유발됨)하는 것을 나타낸다. 중요하게는, CD4 및 CD8 항원 특이적 T 세포 둘 모두가 면역화 후에 존재하고, CD8 세포가 잠복성 TB 시나리오에서 특히 중요할 수 있다. 인간 감염에 대한 Rv1753c의 관련성(relevance)은 남 아프리카 출신의 잠복성 감염된 개체들에서의 높은 수준의 인지 및 무경험

피검체들에서의 반응의 부재에 의해 확정된다. 따라서, Rv1753c는 잠복성 결핵 감염의 예방, 치료 및 진단에서 충분히 가치있는 것으로 예상될 수 있다.

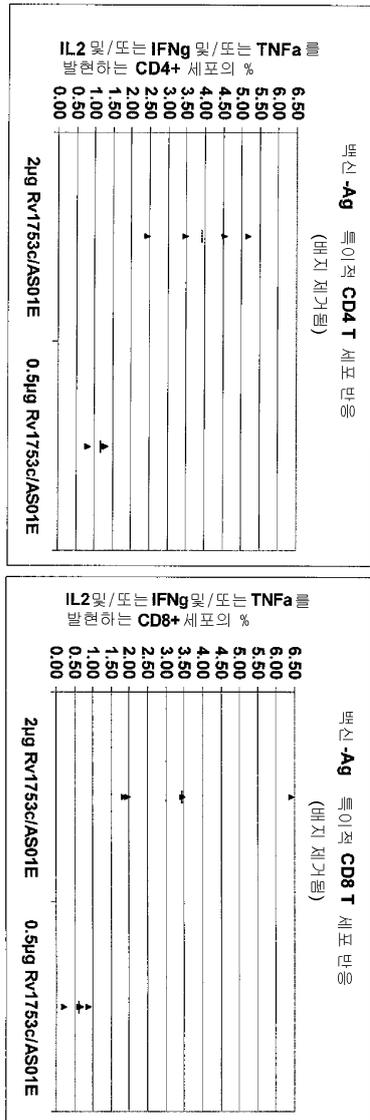
[0719] 전술된 본 발명은 이해의 명료함을 위해 예시 및 실시예의 방식으로 일부 상세히 기재되었으나, 첨부된 청구항의 사상 또는 범위로 부터 벗어남이 없이 상기 예시 및 실시예에 대해 특정한 변경 및 변형이 이루어질 수 있음이 본 발명의 교시에 비추어 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0720] 특허 및 특허 출원을 포함하는 본 출원에 언급된 모든 참고문헌은, 각각의 개별적 출원 또는 특허 출원이 참조로서 포함되는 것으로 특별하고 개별적으로 지정되는 것과 동일하게 가능한 한 최대한의 범위로 참조로서 본원에 포함된다.

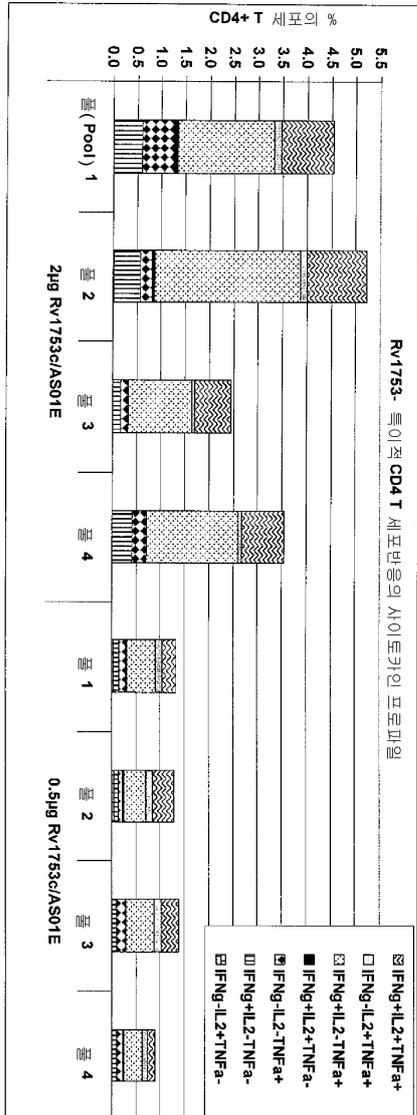
[0721] 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 명세서 및 청구항 전체에 걸쳐, 용어 "-을 포함하다", 및 "-들을 포함하다" 및 '포함하는'과 같은 이의 변형이 언급된 정수, 단계, 정수군 또는 단계군을 언급하나, 임의의 다른 정수, 단계, 정수군 또는 단계군을 배제하는 것이 아님을 의미하는 것이 이해될 것이다.

도면

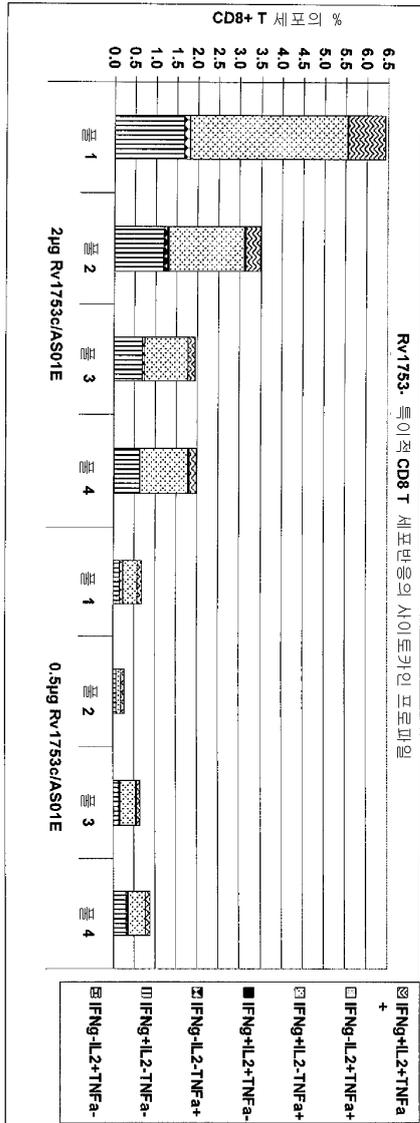
도면1



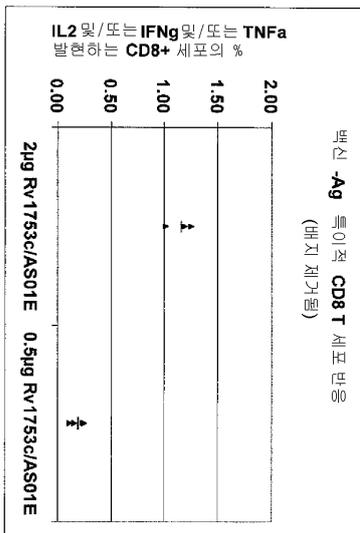
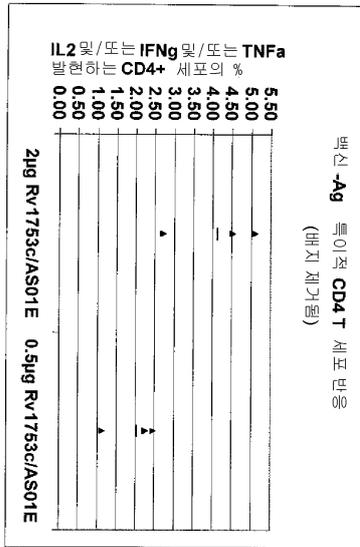
도면2



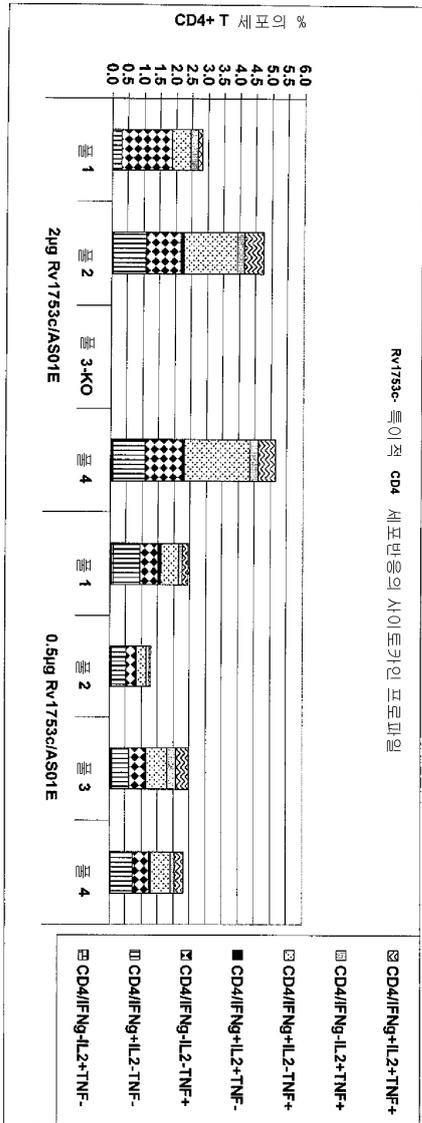
도면3



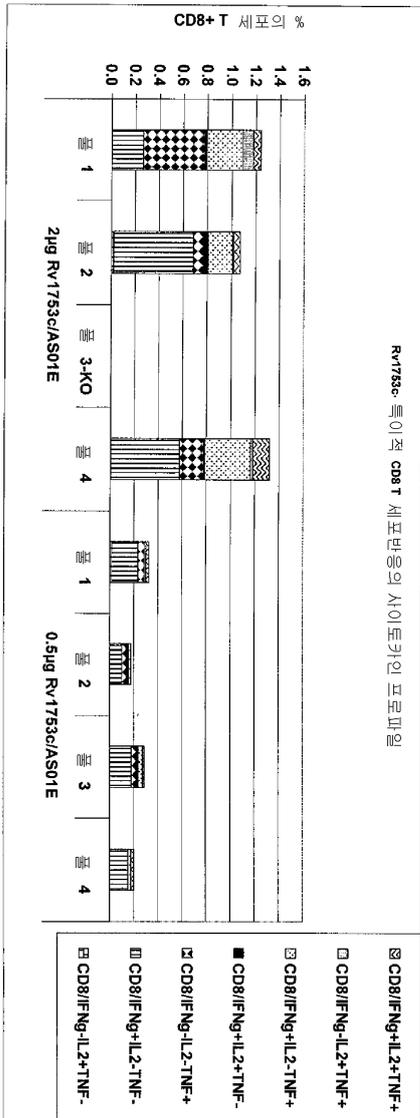
도면4



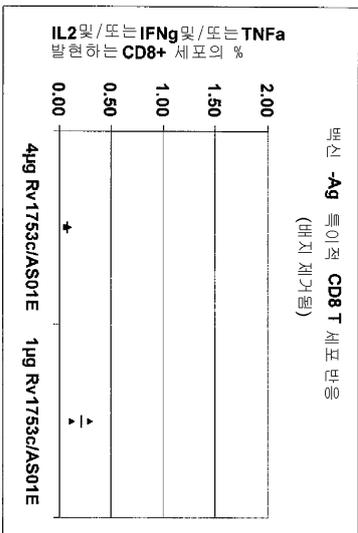
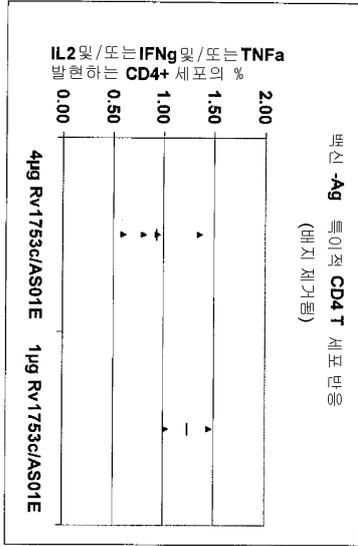
도면5



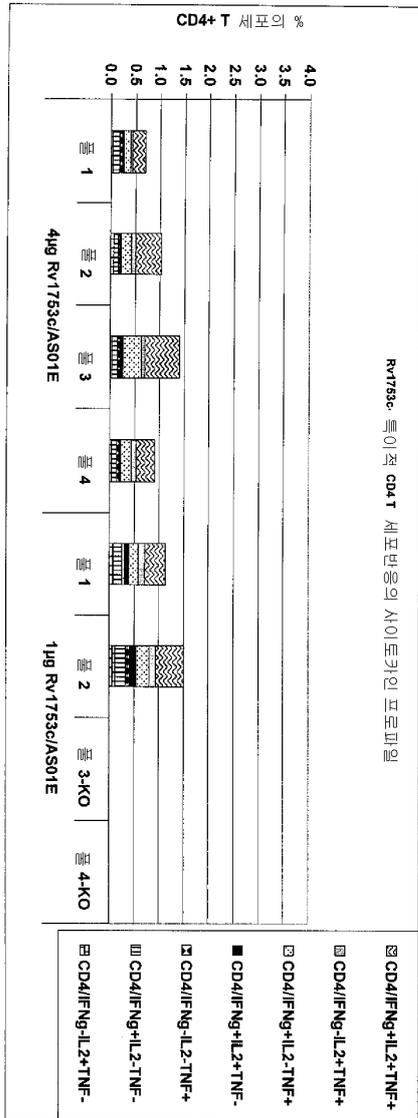
도면6



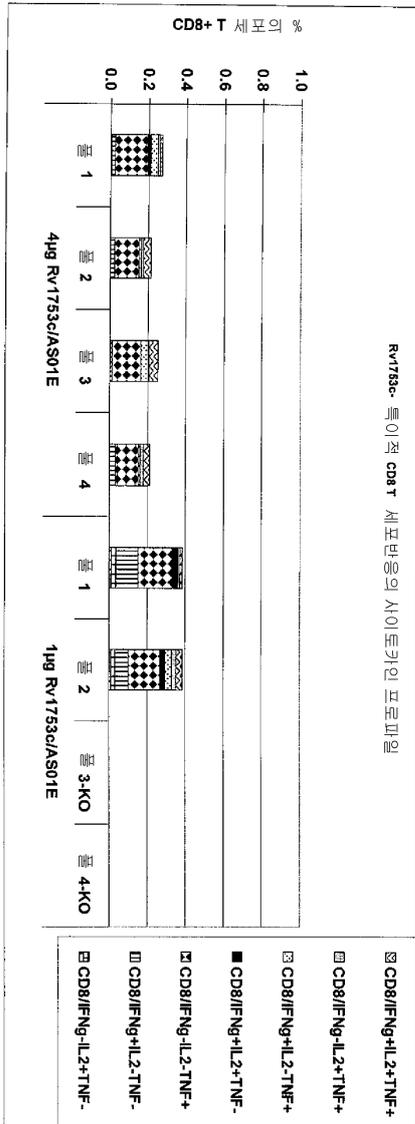
도면7



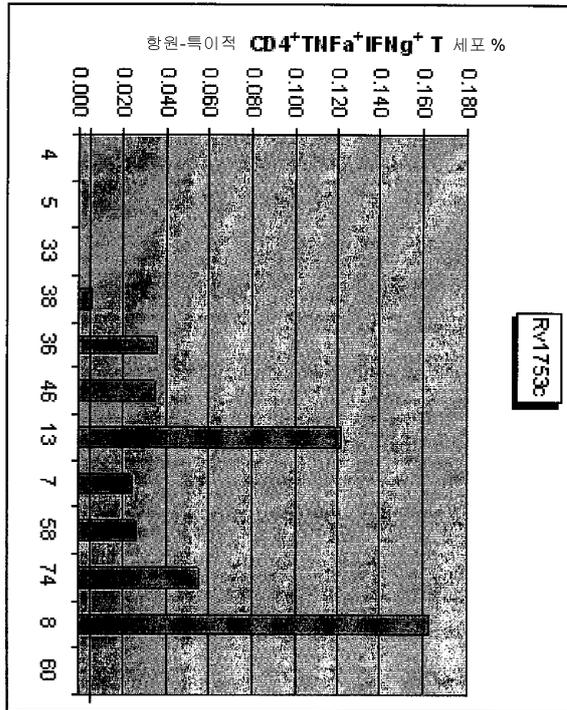
도면8



도면9



도면10



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.

Glaxo Group Limited

Mettens, Pascal

Brown, James

Murphy, Dennis

<120> NOVEL COMPOSITIONS AND METHODS

<130> VB63087PCT

<150> US61/083692

<151> 2008-07-25

<160> 249

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1053

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Strain H37Rv

<400> 1

Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe

1 5 10 15
Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp

 20 25 30
Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val

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

 50 55 60
Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala

65 70 75 80
Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile Ala Glu

 85 90 95
Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala

 100 105 110
Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln

 115 120 125
Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp

 130 135 140
Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala

145 150 155 160
Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala

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

 180 185 190
Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn

 195 200 205
Leu Gly Ile Ala Asn Val Gly Gly Gly Asn Val Gly Asn Ala Asn Asn

 210 215 220
Gly Leu Ala Asn Ile Gly Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe Gly

225 230 235 240
 Ser Gly Asn Phe Gly Asn Ser Asn Ile Gly Ser Ala Ser Leu Gly Asn
 245 250 255
 Asn Asn Ile Gly Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val Gly
 260 265 270
 Asn Leu Gly Asn Leu Asn Thr Gly Phe Ala Asn Thr Gly Leu Gly Asn
 275 280 285
 Phe Gly Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr
 290 295 300
 Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn
 305 310 315 320
 Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser
 325 330 335
 Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly
 340 345 350
 Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser
 355 360 365
 Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380
 Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn

 385 390 395 400
 Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415
 Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 420 425 430
 Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445
 Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu

 450 455 460
 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480

Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510

Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525

Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
 530 535 540

Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu
 545 550 555 560

Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile
 565 570 575

Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn
 580 585 590

Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser
 595 600 605

Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr
 610 615 620

Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Ser Ile
 625 630 635 640

Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr Val Gly
 645 650 655

Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln
 660 665 670

Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu Pro Ala
 675 680 685

Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe
 690 695 700

Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile
 705 710 715 720

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

725 730 735
 Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe Thr Asn
 740 745 750
 Gly Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val Val His
 755 760 765
 Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu Pro

 770 775 780
 Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly
 785 790 795 800
 Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe
 805 810 815
 Ala Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr
 820 825 830
 Thr Gln Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val

 835 840 845
 Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro
 850 855 860
 Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln
 865 870 875 880
 Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile
 885 890 895
 Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr

 900 905 910
 Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Thr
 915 920 925
 Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly
 930 935 940
 Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala
 945 950 955 960
 Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ser Gly Phe

 965 970 975

Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala
 980 985 990
 Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser
 995 1000 1005
 Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg
 1010 1015 1020
 Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala

1025 1030 1035
 Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
 1040 1045 1050

<210> 2

<211> 3162

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220><221> misc_feature

<223> Strain H37Rv

<400> 2

atgaattttt ctgtactgcc gccggagatc aattcagcgc tgatattcgc cggggcaggg 60
 ccggaaccga tggcggcggc cgcgacggcc tgggacgggt tggccatgga attggcctcg 120
 gccgcagcct ctttcggctc agtgacatcc ggactcgtgg gcggggcgtg gcagggcgcg 180

 tcgtcgtcgg cgatggcggc agcggcagcc ccctatgcgg cgtggcttgc cgcgccggcg 240
 gtccaggccg agcagacggc cgctcaggct gcggcgatga tagccgagtt tgaagcggtc 300
 aagacggcgg tggtcgagcc gatgctgggt gcggccaacc gtgccgacct ggtgtcgtg 360
 gtgatgtcga acctgtttgg acagaacgct ccggcgatcg ctgccattga agccacgtac 420
 gagcaaatgt gggctgccga tgtgtcggcg atgtctgcct accatgccgg ggcacggcg 480
 atgcctcgg cgctgtcccc gttcagtaaa ccgctgcaga acctggctgg cttgccggct 540
 tggttggcca gcggcgcgcc tgcggccgcc atgaccgcag ccgcaggcat accggcgctt 600

 gcgggaggac ccaccgcat caacctgggc atagccaacg tcggcgggtg caacgtcggc 660
 aacccaaca acggccttgc caacatcggc aacccaacc ttggcaacta caatttcggg 720
 tccggaatt tcgtaactc caatcggc tcagcaagcc tgggtaataa caacatcggc 780
 ttcgggaacc tcggcagcaa caatgtcggc gtgggaaacc ttggcaatct caacaccggg 840
 tttgccaaca ccggcttggg caacttcggc tttggcaaca ctggcaaaa caacatcggc 900

atcggcttta ccggaacaa ccagatcggg atcggcgggc tcaactcggg caccgggaat 960
 ttcggattgt tcaactcggg cagcggaaac gtcggcttct tcaactccgg caatggaaac 1020

 tttggcatcg gaaactcggg taatttcaac accggtggct ggaattctgg acacgggaac 1080
 accggcttct tcaatgcggg ctcttttaac accggtatgt tggacgtcgg caacgcgaac 1140
 acaggcagcc tgaacaccgg cagtataaac atgggcgact tcaatccggg gtcgtccaac 1200
 accggcacgt tcaacacggg aaatgctaac accgggttcc tcaacgccgg aatatcaac 1260
 actggtgtct tcaatattgg ccacatgaat aatgggctgt tcaacacggg tgacatgaac 1320
 aatggcgtct tctaccgggg cgtggggcag ggcagcctgc agttcagtat tacgacacct 1380
 gatctgactc tgcccggct gcaaataccg gggatatcgg ttcgccctt cagtctgccg 1440

 gcaataacgc tgccgtcgt gaacatccc gcccacca caccggcaa catcaccgtc 1500
 ggcgccttca gcctgccgg gttgacgtt ccgtcgttga acatcccggc cgccaccaca 1560
 ccagcaaca tcaccgtggg tgccttcagc ctgcccgggt tgacgttgcc gtcgttgaac 1620
 atcccggcgg ccaccacacc agccaacatc accgtcggcg ccttcagcct gcccggttg 1680
 acgttgccgt cgttgaacat cccggccc accacaccag ccaacatcac cgtcggcgcc 1740
 ttcagcctgc ccgggttgac gttgccgtc ttgaacatcc cgccgccac cacaccagcc 1800
 aacatcaccg tcggcgctt cagcctgcc gggttgacgt tgccgtcgtt gaacatcccg 1860

 gccgccacca caccggcaa catcaccgta agcggcttcc agttgcctcc gctgagtatt 1920
 ccttccgtag ccattccgcc ggtgacggtc ccgccatta cggtggtgtc ttttaatttg 1980
 ccgccattgc agattccgga agtaactatt ccgcagctga cgataccgc gggtatcaca 2040
 atcggtggct ttagtctacc tgcgatacat actcaaccga taacggtcgg ccagattggc 2100
 gtgggccaat ttggcctgcc ctccataggc tgggatgttt tcctaagcac acctaggata 2160
 acagtaccgg cttttggaat accctttacc ctacaattcc agaccaatgt gcctgcgctt 2220
 cagccgcccg gcggcgggct tagtactttc accaatggcg ccctcatctt cggtgagttt 2280

 gacttaccac aattgggtgt tcaccatac acattgaccg gccctattgt catcggttca 2340
 ttctttctgc ccgccttcaa cataccggg atcgatgtcc ccgctatcaa cgtcgatggc 2400
 ttcaccctgc cgcagatcac caccagct atcaccacc cggagttcgc gatccctccg 2460
 atcggcgtgg gcggcttca cctgccgag atcaccacc aggaaatcat caccgggag 2520
 ctaaccatca actcgatcgg cgtcggcggg ttcaccctgc cgaaatcac caccacc 2580
 atcaccacc caccgtgac catgacccc atcaacctca ccggcttca cctcccaca 2640

atcaccaccc caccatcac caccaccg ctgaccatcg accccatcaa cctcaccggc 2700

ttcaccctcc cccaatcac caccacccc atcaccaccc caccgctcac catcgagcgg 2760

atcggcgtgg ggggcttcac cacgccccg ctcaccgttc cggcatcca cctgcccagc 2820

accacgatcg gggccttcgc gatccccggg gggccgggct acttcaactc gagcaccgcg 2880

ccttcgtcgg gcttcttcaa ttccgggtcg ggcggcaact cgggcttcgg caacaacggc 2940

tcgggctct cgggttggtt caacaccaac ccggccgggc tgttgggcgg ctcgggctat 3000

cagaacttcg gcgggctatc ctcgggcttt tccaaccttg gcagcggcgt ctcaggcttc 3060

gccaacaggg gcatcctgcc gttctcggtg gccagcgtcg tttccggctt tgccaatata 3120

ggcaccaacc tggcgggttt cttccaaggc accacgtect aa 3162

<210> 3

<211> 1105

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Strain CDC1551

<400> 3

Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe

1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp

20 25 30

Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val

35 40 45

Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala

50 55 60

Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala

65 70 75 80

Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile Ala Glu

85 90 95

Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala

100 105 110

Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln

Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380
 Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn
 385 390 395 400
 Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415
 Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 420 425 430
 Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445
 Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460
 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480
 Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Thr Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525
 Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
 530 535 540
 Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu
 545 550 555 560
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile
 565 570 575
 Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn
 580 585 590
 Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser
 595 600 605
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr

610 615 620
 Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu
 625 630 635 640
 Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val
 645 650 655
 Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro
 660 665 670
 Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro

 675 680 685
 Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro
 690 695 700
 Ile Thr Val Gly Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val
 705 710 715 720
 Thr Ile Pro Gln Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe
 725 730 735
 Ser Leu Pro Ala Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly

 740 745 750
 Val Gly Gln Phe Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser
 755 760 765
 Thr Pro Arg Ile Thr Val Pro Ala Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln
 770 775 780
 Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser
 785 790 795 800
 Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln

 805 810 815
 Leu Val Val His Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser
 820 825 830
 Phe Phe Leu Pro Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile
 835 840 845
 Asn Val Asp Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr
 850 855 860

1100 1105
<210> 4
<211> 975
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<220><221> MISC_FEATURE
<223> Strain F11

<400> 4
Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
1 5 10 15
Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
 20 25 30
Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val
 35 40 45
Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala
50 55 60

Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala
65 70 75 80
Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile Ala Glu
 85 90 95
Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala
 100 105 110
Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
 115 120 125

Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp
130 135 140
Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala
145 150 155 160
Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala
 165 170 175
Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr

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

Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445

Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460

Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480

Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Thr Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510

Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525

Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
 530 535 540

Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu
 545 550 555 560

Ser Ile Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr
 565 570 575

Val Gly Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile
 580 585 590

Pro Gln Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu
 595 600 605

Pro Ala Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly
 610 615 620

Gln Phe Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro
 625 630 635 640

Arg Ile Thr Val Pro Ala Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln
 645 650 655

Thr Asn Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe
 660 665 670

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

Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn
 930 935 940

Arg Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala
 945 950 955 960

Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
 965 970 975

<210> 5

<211> 1050

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Strain Haarlem A

<400> 5

Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
 20 25 30

Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val
 35 40 45

Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala
 50 55 60

Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala
 65 70 75 80

Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile Ala Glu
 85 90 95

Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala
 100 105 110

Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
 115 120 125

Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp
 130 135 140

Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala

145 150 155 160
 Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala
 165 170 175
 Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr
 180 185 190
 Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn
 195 200 205
 Leu Gly Ile Ala Asn Val Gly Gly Gly Asn Val Gly Asn Ala Asn Asn
 210 215 220

 Gly Leu Ala Asn Ile Gly Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Asn Phe Gly Asn Ser Asn Ile Gly Ser Ala Ser Leu Gly Asn
 245 250 255
 Asn Asn Ile Gly Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val Gly
 260 265 270
 Asn Leu Gly Asn Leu Asn Thr Gly Phe Ala Asn Thr Gly Leu Gly Asn
 275 280 285

 Phe Gly Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr
 290 295 300
 Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn
 305 310 315 320
 Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser
 325 330 335
 Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly
 340 345 350

 Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser
 355 360 365
 Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380
 Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn
 385 390 395 400

Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415

Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 420 425 430

Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445

Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460

Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480

Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Thr Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510

Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525

Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
 530 535 540

Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu
 545 550 555 560

Ser Ile Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr
 565 570 575

Val Gly Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile
 580 585 590

Pro Gln Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu
 595 600 605

Pro Ala Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly
 610 615 620

Gln Phe Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro
 625 630 635 640

Arg Ile Thr Val Pro Ala Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 645 | | 650 | | 655 | | | | | | | | | | |
| Thr | Asn | Val | Pro | Ala | Leu | Gln | Pro | Pro | Gly | Gly | Gly | Leu | Ser | Thr | Phe |
| | | 660 | | | | | | 665 | | | | | | 670 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Asn | Gly | Ala | Leu | Ile | Phe | Gly | Glu | Phe | Asp | Leu | Pro | Gln | Leu | Val |
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | | | 685 | |
| Val | His | Pro | Tyr | Thr | Leu | Thr | Gly | Pro | Ile | Val | Ile | Gly | Ser | Phe | Phe |
| | | 690 | | | | | 695 | | | | | | | 700 | |
| Leu | Pro | Ala | Phe | Asn | Ile | Pro | Gly | Ile | Asp | Val | Pro | Ala | Ile | Asn | Val |
| 705 | | | | | 710 | | | | | | | 715 | | | 720 |
| Asp | Gly | Phe | Thr | Leu | Pro | Gln | Ile | Thr | Thr | Pro | Ala | Ile | Thr | Thr | Pro |
| | | | | | 725 | | | | | | | 730 | | | 735 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Phe | Ala | Ile | Pro | Pro | Ile | Gly | Val | Gly | Gly | Phe | Thr | Leu | Pro | Gln |
| | | | | | 740 | | | | | | | | | | 750 |
| Ile | Thr | Thr | Gln | Glu | Ile | Ile | Thr | Pro | Glu | Leu | Thr | Ile | Asn | Ser | Ile |
| | | | | | 755 | | | | | | | | | | 765 |
| Gly | Val | Gly | Gly | Phe | Thr | Leu | Pro | Gln | Ile | Thr | Thr | Pro | Pro | Ile | Thr |
| | | | | | 770 | | | | | | | | | | 780 |
| Thr | Pro | Pro | Leu | Thr | Ile | Asp | Pro | Ile | Asn | Leu | Thr | Gly | Phe | Thr | Leu |
| 785 | | | | | 790 | | | | | | | | | | 800 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Gln | Ile | Thr | Thr | Pro | Pro | Ile | Thr | Thr | Pro | Pro | Leu | Thr | Ile | Asp |
| | | | | | 805 | | | | | | | | | | 815 |
| Pro | Ile | Asn | Leu | Thr | Gly | Phe | Thr | Leu | Pro | Gln | Ile | Thr | Thr | Pro | Pro |
| | | | | | 820 | | | | | | | | | | 830 |
| Ile | Thr | Thr | Pro | Pro | Leu | Thr | Ile | Asp | Pro | Ile | Asn | Leu | Thr | Gly | Phe |
| | | | | | 835 | | | | | | | | | | 845 |
| Thr | Leu | Pro | Gln | Ile | Thr | Thr | Pro | Pro | Ile | Thr | Thr | Pro | Pro | Leu | Thr |
| | | | | | 850 | | | | | | | | | | 860 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | Asp | Pro | Ile | Asn | Leu | Thr | Gly | Phe | Thr | Leu | Pro | Gln | Ile | Thr | Thr |
| 865 | | | | | 870 | | | | | | | | | | 880 |
| Pro | Pro | Ile | Thr | Thr | Pro | Pro | Leu | Thr | Ile | Asp | Pro | Ile | Asn | Leu | Thr |
| | | | | | 885 | | | | | | | | | | 895 |

Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro
 900 905 910

Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Thr Pro Pro Leu
 915 920 925

Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala Phe Ala
 930 935 940

Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser
 945 950 955 960

Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ser Gly Phe Gly Asn Asn
 965 970 975

Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu Leu
 980 985 990

Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser
 995 1000 1005

Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu
 1010 1015 1020

Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala Asn Ile Gly
 1025 1030 1035

Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
 1040 1045 1050

<210> 6

<211> 1078

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Strain C

<400> 6

Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
 20 25 30

Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val

Phe Gly Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr
 290 295 300

Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn
 305 310 315 320

Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser
 325 330 335

Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly
 340 345 350

Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser
 355 360 365

Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380

Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn
 385 390 395 400

Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415

Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 420 425 430

Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445

Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460

Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480

Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510

Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525

Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala

530 535 540
 Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu
 545 550 555 560

 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile
 565 570 575
 Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn
 580 585 590
 Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser
 595 600 605
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr
 610 615 620

 Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Ser Ile
 625 630 635 640
 Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr Val Gly
 645 650 655
 Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln
 660 665 670
 Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu Pro Ala
 675 680 685

 Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe
 690 695 700
 Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile
 705 710 715 720
 Thr Val Pro Ala Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn
 725 730 735
 Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe Thr Asn
 740 745 750

 Gly Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val Val His
 755 760 765
 Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu Pro
 770 775 780

1025 1030 1035
 Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe
 1040 1045 1050
 Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn
 1055 1060 1065

 Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
 1070 1075
 <210> 7
 <211> 1026
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis
 <220><221> MISC_FEATURE
 <223> Strain BCG
 <400> 7
 Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
 20 25 30
 Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val

 35 40 45
 Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala
 50 55 60
 Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile Ala Glu
 85 90 95
 Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala

 100 105 110
 Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
 115 120 125
 Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp
 130 135 140

Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala
 145 150 155 160
 Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala
 165 170 175
 Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr
 180 185 190
 Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn
 195 200 205
 Leu Gly Ile Ala Asn Val Gly Gly Gly Asn Val Gly Asn Ala Asn Asn
 210 215 220
 Gly Leu Ala Asn Ile Gly Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Asn Phe Gly Asn Ser Asn Ile Gly Ser Ala Ser Leu Gly Asn
 245 250 255
 Asn Asn Ile Gly Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val Gly
 260 265 270
 Asn Leu Gly Asn Leu Asn Thr Gly Phe Ala Asn Thr Gly Leu Gly Asn
 275 280 285
 Phe Gly Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr
 290 295 300
 Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn
 305 310 315 320
 Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser
 325 330 335
 Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly
 340 345 350
 Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser
 355 360 365
 Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380
 Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn

385 390 395 400
 Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415
 Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 420 425 430
 Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445
 Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460
 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480
 Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Thr Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525
 Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
 530 535 540
 Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu
 545 550 555 560
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile
 565 570 575
 Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val Ala
 580 585 590
 Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr Val Gly Ala Phe Asn Leu
 595 600 605
 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln Leu Thr Ile Pro
 610 615 620
 Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu Pro Ala Ile His Thr Gln
 625 630 635 640

Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe Gly Leu Pro Ser
 645 650 655
 Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile Thr Val Pro Ala
 660 665 670
 Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala Leu
 675 680 685
 Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile
 690 695 700
 Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val Val His Pro Tyr Thr Leu
 705 710 715 720
 Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu Pro Ala Phe Asn Ile
 725 730 735
 Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly Phe Thr Leu Pro
 740 745 750
 Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe Ala Ile Pro Pro
 755 760 765
 Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Gln Glu Ile
 770 775 780
 Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr
 785 790 795 800
 Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile
 805 810 815
 Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro
 820 825 830
 Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly
 835 840 845
 Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu
 850 855 860
 Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr
 865 870 875 880
 Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val

885 890 895
 Gly Gly Phe Thr Thr Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro
 900 905 910
 Ser Thr Thr Ile Gly Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe
 915 920 925
 Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly

 930 935 940
 Gly Asn Ser Gly Phe Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe
 945 950 955 960
 Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe
 965 970 975
 Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly
 980 985 990
 Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser

 995 1000 1005
 Gly Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly
 1010 1015 1020
 Thr Thr Ser
 1025
 <210> 8
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220><221> mat_peptide
 <222> (29)..(110)
 <400> 8
 Met Arg Leu Ser Leu Thr Ala Leu Ser Ala Gly Val Gly Ala Val Ala
 -25 -20 -15
 Met Ser Leu Thr Val Gly Ala Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Val Asp

 -10 -5 -1 1
 Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val Val Ala Ala Leu
 5 10 15 20

Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala Gln Phe Asn Ala Ser Pro Val
 25 30 35

Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu Ala Ala Pro Pro Pro Gln Arg
 40 45 50

Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala Val Pro Gly Ala Ala Gln Tyr
 55 60 65

Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly Ser Cys Asn Asn Tyr
 70 75 80

<210> 9

<211> 97

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu Val Ala Ser Gln Ser
 1 5 10 15

Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His Thr Ile Gly Gln Ala
 20 25 30

Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His Gln Gly Glu Ser Ser
 35 40 45

Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val Ala Ala Ala Ala Lys
 50 55 60

Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn Leu Gly Glu Ala Ala
 65 70 75 80

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

Phe

<210> 10

<211> 94

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 10

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

 50 55 60
 Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn
 65 70 75 80
 Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala
 85 90
 <210> 11
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 11
 Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe
 1 5 10 15

 Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly
 35 40 45
 Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val
 50 55 60
 Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val
 65 70 75 80

 Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala
 85 90 95
 Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp
 100 105 110
 Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu

Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
 1 5 10 15
 Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu
 20 25 30

 Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala
 35 40 45
 Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala
 50 55 60
 Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln
 85 90 95

 Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val
 100 105 110
 Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala
 115 120 125
 Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val
 130 135 140
 Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala
 145 150 155 160

 Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala
 165 170 175
 Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Ile
 180 185 190
 Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys
 195 200 205
 Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg
 210 215 220

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

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
 65 70 75
 Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 80 85 90
 <210> 17
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220><221> mat_peptide
 <222> (43)..(338)
 <400> 17
 Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg
 -40 -35 -30
 Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val
 -25 -20 -15
 Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly
 -10 -5 -1 1 5
 Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp
 10 15 20
 Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr
 25 30 35
 Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile
 40 45 50
 Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val
 55 60 65 70
 Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro
 75 80 85
 Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu
 90 95 100
 Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro
 105 110 115

Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu

120 125 130

Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met

135 140 145 150

Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly

155 160 165

Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly

170 175 180

Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val

185 190 195

Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn

200 205 210

Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu

215 220 225 230

Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn

235 240 245

Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr

250 255 260

His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp

265 270 275

Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln

280 285 290

Gly Ala

295

<210> 18

<211> 325

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220><221> mat_peptide

<222> (41)..(325)

<400> 18

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met

-40 -35 -30 -25

Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala

 -20 -15 -10

Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val

 -5 -1 1 5

Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val

 10 15 20

Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp

25 30 35 40

Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro

 45 50 55

Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val

 60 65 70

Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly

 75 80 85

Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu

90 95 100

Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser

105 110 115 120

Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala

 125 130 135

Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu

 140 145 150

Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met

155 160 165

Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser

 170 175 180

Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu

185 190 195 200

Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro

Ser Phe Val Arg Thr Val Ser Leu Pro Val Gly Ala Asp Glu Asp Asp
 100 105 110

Ile Lys Ala Thr Tyr Asp Lys Gly Ile Leu Thr Val Ser Val Ala Val
 115 120 125

Ser Glu Gly Lys Pro Thr Glu Lys His Ile Gln Ile Arg Ser Thr Asn
 130 135 140

<210> 20

<211> 228

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220><221> mat_peptide

<222> (24)..(228)

<400> 20

Met Arg Ile Lys Ile Phe Met Leu Val Thr Ala Val Val Leu Leu Cys
 -20 -15 -10

Cys Ser Gly Val Ala Thr Ala Ala Pro Lys Thr Tyr Cys Glu Glu Leu
 -5 -1 1 5

Lys Gly Thr Asp Thr Gly Gln Ala Cys Gln Ile Gln Met Ser Asp Pro
 10 15 20 25

Ala Tyr Asn Ile Asn Ile Ser Leu Pro Ser Tyr Tyr Pro Asp Gln Lys
 30 35 40

Ser Leu Glu Asn Tyr Ile Ala Gln Thr Arg Asp Lys Phe Leu Ser Ala
 45 50 55

Ala Thr Ser Ser Thr Pro Arg Glu Ala Pro Tyr Glu Leu Asn Ile Thr
 60 65 70

Ser Ala Thr Tyr Gln Ser Ala Ile Pro Pro Arg Gly Thr Gln Ala Val
 75 80 85

Val Leu Lys Val Tyr Gln Asn Ala Gly Gly Thr His Pro Thr Thr Thr
 90 95 100 105

Tyr Lys Ala Phe Asp Trp Asp Gln Ala Tyr Arg Lys Pro Ile Thr Tyr
 110 115 120

Asp Thr Leu Trp Gln Ala Asp Thr Asp Pro Leu Pro Val Val Phe Pro
 125 130 135
 Ile Val Gln Gly Glu Leu Ser Lys Gln Thr Gly Gln Gln Val Ser Ile
 140 145 150
 Ala Pro Asn Ala Gly Leu Asp Pro Val Asn Tyr Gln Asn Phe Ala Val
 155 160 165
 Thr Asn Asp Gly Val Ile Phe Phe Phe Asn Pro Gly Glu Leu Leu Pro
 170 175 180 185

Glu Ala Ala Gly Pro Thr Gln Val Leu Val Pro Arg Ser Ala Ile Asp
 190 195 200

Ser Met Leu Ala
 205

<210> 21

<211> 355

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220><221> mat_peptide

<222> (33)..(355)

<400> 21

Met Ser Asn Ser Arg Arg Arg Ser Leu Arg Trp Ser Trp Leu Leu Ser
 -30 -25 -20
 Val Leu Ala Ala Val Gly Leu Gly Leu Ala Thr Ala Pro Ala Gln Ala
 -15 -10 -5 -1

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

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln

Pro Pro Ala

<210> 22

<211> 323

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ser/Ala mutant of mature Mtb32A

<400> 22

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu

1 5 10 15

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val

20 25 30

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr

35 40 45

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val

50 55 60

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln

65 70 75 80

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala

85 90 95

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly

100 105 110

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr

145 150 155 160

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala

165 170 175

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr

180 185 190

Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala
 195 200 205

Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly
 210 215 220

Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu
 225 230 235 240

Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val
 245 250 255

Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile
 260 265 270

Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp
 275 280 285

Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln
 290 295 300

Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly
 305 310 315 320

Pro Pro Ala

<210> 23

<211> 96

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 23

Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile
 20 25 30

Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly
 35 40 45

Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp
 50 55 60

Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr

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

Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445

Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460

Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480

Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495

Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510

Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 515 520 525

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 530 535 540

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 565 570 575

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 595 600 605

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 625 630 635 640

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 645 650 655

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670

Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr

145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220

 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285

 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350

 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400

Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415

Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430

Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445

Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460

Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480

Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495

Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510

Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 515 520 525

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 530 535 540

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 565 570 575

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 595 600 605

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 625 630 635 640

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly

Ala Arg Ala Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Ala Phe Ala Met Thr Val
 370 375 380

Pro Pro Ser Leu Val Ala Ala Asn Arg Ser Arg Leu Met Ser Leu Val
 385 390 395 400

Ala Ala Asn Ile Leu Gly Gln Asn Ser Ala Ala Ile Ala Ala Thr Gln
 405 410 415

Ala Glu Tyr Ala Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Val Met Tyr Ser
 420 425 430

Tyr Glu Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Leu Pro Pro Phe Thr Pro
 435 440 445

Pro Val Gln Gly Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 450 455 460

Thr Gln Ala Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Asp Ala Gln Ala Thr Leu
 465 470 475 480

Ala Gln Leu Pro Pro Gly Ile Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala
 485 490 495

Ala Asn Ala Asp Pro Leu Thr Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr
 500 505 510

Leu Asn Pro Gln Val Gly Ser Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro
 515 520 525

Ile Gly Glu Leu Asp Val Ile Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr
 530 535 540

Gly Ser Ile Ala Leu Ala Ile Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile
 545 550 555 560

Gly Leu Tyr Gly Asn Ala Gly Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro
 565 570 575

Leu Ser Ser Ala Thr Asp Glu Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly
 580 585 590

Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val Gly
 595 600 605

Ala Leu Ser Val Pro His Ser Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu Ile Gln

610 615 620
 Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro Thr Phe Ser Ser Ser Ala Gly Ala Asp
 625 630 635 640

 Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met Pro Ala Gly Leu Leu Ser Gly Met Ala
 645 650 655
 Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Gly Thr Thr Gly Gly Gly Gly Thr Arg
 660 665 670
 Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly Gln Glu Asp Gly Arg Lys Pro Pro Val
 675 680 685
 Val Val Ile Arg Glu Gln Pro Pro Pro Gly Asn Pro Pro Arg
 690 695 700

<210> 27

<211> 920

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M72-Mtb9.9-Mtb9.8

<400> 27

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

50 55 60
 Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
 65 70 75 80
 Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
 85 90 95
 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
 100 105 110

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

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly

 625 630 635 640
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 645 650 655
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 675 680 685
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala

 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 705 710 715 720
 Ala Ala Ser Ser Thr Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp
 725 730 735
 Ala His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu
 740 745 750
 His Gln Ala Ile Val Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly

 755 760 765
 Gly Ala Gly Ser Val Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg
 770 775 780
 Asn Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val
 785 790 795 800
 Gln Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser
 805 810 815
 Ser Trp Ala Thr Ser Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu

 820 825 830
 Val Ala Ser Gln Ser Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His
 835 840 845
 Thr Ile Gly Gln Ala Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His

850 855 860
 Gln Gly Glu Ser Ser Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val
 865 870 875 880
 Ala Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn

 885 890 895
 Leu Gly Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala
 900 905 910
 Ser Thr Tyr Thr Gly Phe Pro Trp
 915 920
 <210> 28
 <211> 1010
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> M103
 <400> 28
 Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg

 20 25 30
 Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
 35 40 45
 Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
 50 55 60
 Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
 65 70 75 80
 Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met

 85 90 95
 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
 100 105 110
 Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
 115 120 125
 Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro

130 135 140
 Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu

 145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser

 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser

 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr

 195 200 205
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala

 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr

 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu

 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn

 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe

 275 280 285
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe

 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala

 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met

 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly

 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro

 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met

 370 375 380

Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala
 885 890 895

Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala
 900 905 910

Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn
 915 920 925

Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu
 930 935 940

Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser
 945 950 955 960

Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn
 965 970 975

Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp
 980 985 990

Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly
 995 1000 1005

Ala Gly
 1010

<210> 29

<211> 1148

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M114

<400> 29

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
 1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
 20 25 30

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

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
 50 55 60

305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser

 465 470 475 480
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu

 530 535 540
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560

805 810 815
 Ala Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Ala Phe Ala Met Thr Val Pro Pro
 820 825 830
 Ser Leu Val Ala Ala Asn Arg Ser Arg Leu Met Ser Leu Val Ala Ala
 835 840 845
 Asn Ile Leu Gly Gln Asn Ser Ala Ala Ile Ala Ala Thr Gln Ala Glu

 850 855 860
 Tyr Ala Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Val Met Tyr Ser Tyr Glu
 865 870 875 880
 Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Leu Pro Pro Phe Thr Pro Pro Val
 885 890 895
 Gln Gly Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gln
 900 905 910
 Ala Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Asp Ala Gln Ala Thr Leu Ala Gln

 915 920 925
 Leu Pro Pro Gly Ile Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala Ala Asn
 930 935 940
 Ala Asp Pro Leu Thr Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr Leu Asn
 945 950 955 960
 Pro Gln Val Gly Ser Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro Ile Gly
 965 970 975
 Glu Leu Asp Val Ile Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr Gly Ser

 980 985 990
 Ile Ala Leu Ala Ile Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile Gly Leu
 995 1000 1005
 Tyr Gly Asn Ala Gly Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro Leu
 1010 1015 1020
 Ser Ser Ala Thr Asp Glu Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly
 1025 1030 1035
 Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val

 1040 1045 1050

Gly Ala Leu Ser Val Pro His Ser Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu
 1055 1060 1065

Ile Gln Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro Thr Phe Ser Ser Ser Ala
 1070 1075 1080

Gly Ala Asp Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met Pro Ala Gly Leu Leu
 1085 1090 1095

Ser Gly Met Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Gly Thr Thr Gly
 1100 1105 1110

Gly Gly Gly Thr Arg Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly Gln Glu Asp
 1115 1120 1125

Gly Arg Lys Pro Pro Val Val Val Ile Arg Glu Gln Pro Pro Pro
 1130 1135 1140

Gly Asn Pro Pro Arg
 1145

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 30

Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala Met

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 31

Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 32

Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33

Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala Asn

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 34

Leu Val Ala Ala Asn Arg Ala Asp Leu

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 35

Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 36

Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 37

Tyr Glu Gln Met Trp Ala Ala Asp Val

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 38

Trp Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 39

Leu Gln Asn Leu Ala Gly Leu Pro Ala

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 40

Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 41

Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 42

Phe Leu Asn Ala Gly Asn Ile Asn Thr

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 43

Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 44

Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 45

Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 46

Leu Gln Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 47

Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala Leu Gln

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 48

Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 49

Phe Leu Pro Ala Phe Asn Ile Pro Gly

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 50

Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 51

Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 52

Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 53

Phe Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 54

Phe Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 55

Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 56

Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 57

Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 58

Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 59

Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 60

Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 61

Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 62

Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 63

Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 64

Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe Ala

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 65

Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 66

Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 67

Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 68

Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp Gly Leu

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 69

Ala Thr Ala Trp Asp Gly Leu Ala Met

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 70

Ala Trp Asp Gly Leu Ala Met Glu Leu

1 5
<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 71

Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala

1 5
<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 72

Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala

1 5
<210> 73
<211> 9
<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 73

Val Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala

1 5
<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 74

Ala Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr

1 5
<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 75

Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 76

Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 77

Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 78

Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 79

Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 80

Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala Val

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 81

Trp Leu Ala Ala Ala Ala Val Gln Ala

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 82

Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 83

Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 84

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 85

Ala Ala Met Ile Ala Glu Phe Glu Ala

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 86

Ala Met Ile Ala Glu Phe Glu Ala Val

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 87

Ala Glu Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala

1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 88

Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val

1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 89

Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 90

Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 91

Gln Pro Met Leu Val Ala Ala Asn Arg

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 92

Pro Met Leu Val Ala Ala Asn Arg Ala

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 93

Leu Val Ala Ala Asn Arg Ala Asp Leu

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 94

Ala Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu

1 5
<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 95
Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 96
Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 97
Asn Leu Phe Gly Gln Asn Ala Pro Ala
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 98
Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 99

Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 100

Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp Ala Ala

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 101

Gln Met Trp Ala Ala Asp Val Ser Ala

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 102

Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 103

Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala

1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 104

Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala Ile

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 105

Gly Ala Ser Ala Ile Ala Ser Ala Leu

1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 106

Ala Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe

1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 107

Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 108

Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu

1 5

<210> 109

<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 109
Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala Gly Leu
1 5
<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 110
Asn Leu Ala Gly Leu Pro Ala Trp Leu
1 5
<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 111
Leu Ala Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala
1 5
<210> 112
<211> 9

<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 112
Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala
1 5
<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 113
Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala
1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 114

Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr Ala

1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 115

Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr Ala Ala

1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 116

Ala Ala Met Thr Ala Ala Ala Gly Ile

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 117

Thr Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu

1 5

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 118

Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala

1 5

<210> 119

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 119

Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile

1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 120

Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn Leu

1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 121

Gly Pro Thr Ala Ile Asn Leu Gly Ile

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 122

Ala Ile Asn Leu Gly Ile Ala Asn Val

1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 123

Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe

1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 124

Asn Tyr Asn Phe Gly Ser Gly Asn Phe

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 125

Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 126

Ser Leu Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met

1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 127

Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala

1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 128

Phe Leu Asn Ala Gly Asn Ile Asn Thr

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 129

Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile

1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 130

Gly Val Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe

1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 131

Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 132

Thr Pro Asp Leu Thr Leu Pro Pro Leu

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 133

Asp Leu Thr Leu Pro Pro Leu Gln Ile

1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 134

Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 135

Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 136

Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 137

Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro Ala Ile

1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 138

Ala Phe Ser Leu Pro Ala Ile Thr Leu

1 5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 139

Leu Pro Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 140

Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile

1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 141

Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala

1 5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 142

Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala

1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 143

Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val

1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 144

Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 145

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu

1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 146

Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu

1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 147

Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu

1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 148

Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala

1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 149

Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val

1 5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 150

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu

1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 151

Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu

1 5

<210> 152

<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 152
Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu
1 5
<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 153
Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala
1 5
<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 154
Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val
1 5
<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 155
Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu
1 5
<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 156
Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu
1 5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 157

Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu

1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 158

Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala

1 5

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 159

Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val

1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 160

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu

1 5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 161

Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu

1 5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 162

Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu

1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 163

Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala

1 5

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 164

Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val

1 5

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 165

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu

1 5

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 166

Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu

1 5

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 167

Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val

1 5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 168

Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe

1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 169

Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu

1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 170

Leu Pro Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val

1 5

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 171

Pro Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val Ala

1 5

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 172

Ile Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val

1 5

<210> 173

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 173

Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile

1 5

<210> 174

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 174

Val Pro Pro Ile Thr Val Gly Ala Phe

1 5

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 175

Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile

1 5

<210> 176

<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 176
Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln Leu
1 5

<210> 177
<211> 9

<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 177
Thr Ile Pro Gln Leu Thr Ile Pro Ala
1 5

<210> 178
<211> 9

<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 178
Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile
1 5

<210> 179
<211> 9

<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 179
Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu
1 5

<210> 180
<211> 9

<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 180
Leu Pro Ala Ile His Thr Gln Pro Ile

1 5
<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 181

Ala Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val

1 5
<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 182

Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val

1 5
<210> 183
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 183

Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe Gly Leu

1 5
<210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 184

Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val

1 5
<210> 185
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 185

Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe

1 5

<210> 186

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 186

Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile

1 5

<210> 187

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 187

Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile Thr Val

1 5

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 188

Thr Pro Arg Ile Thr Val Pro Ala Phe

1 5

<210> 189

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 189

Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe

1 5

<210> 190

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 190

Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn Val

1 5

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 191

Gln Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala Leu

1 5

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 192

Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu

1 5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 193

Leu Ser Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu

1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 194

Ser Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile

1 5

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 195

Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile Phe

1 5

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 196

Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu

1 5

<210> 197

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 197

Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val

1 5

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 198

Leu Pro Gln Leu Val Val His Pro Tyr

1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 199

Gln Leu Val Val His Pro Tyr Thr Leu

1 5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 200

His Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile

1 5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 201

Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile

1 5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 202

Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe

1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 203

Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu

1 5

<210> 204

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 204

Ser Phe Phe Leu Pro Ala Phe Asn Ile

1 5
<210> 205
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 205

Leu Pro Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile

1 5
<210> 206
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 206

Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile

1 5
<210> 207
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 207

Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val

1 5
<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 208

Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly Phe

1 5
<210> 209
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 209

Ala Ile Asn Val Asp Gly Phe Thr Leu

1 5

<210> 210

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 210

Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala

1 5

<210> 211

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 211

Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile

1 5

<210> 212

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 212

Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe

1 5

<210> 213

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 213

Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe Ala Ile

1 5

<210> 214

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 214

Thr Pro Glu Phe Ala Ile Pro Pro Ile

1 5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 215

Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe

1 5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 216

Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu

1 5

<210> 217

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 217

Leu Pro Gln Ile Thr Thr Gln Glu Ile

1 5

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 218

Pro Gln Ile Thr Thr Gln Glu Ile Ile

1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 219

Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile

1 5

<210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 220

Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile

1 5

<210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 221

Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val

1 5

<210> 222

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 222

Ser Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu

1 5

<210> 223

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 223

Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile

1 5

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 224

Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu

1 5

<210> 225

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 225

Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile

1 5

<210> 226

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 226

Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile

1 5

<210> 227

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 227

Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu

1 5

<210> 228

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 228

Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile

1 5

<210> 229

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 229

Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val

1 5

<210> 230

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 230

Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe

1 5

<210> 231

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 231

Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His

1 5

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 232

Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu

1 5

<210> 233

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 233

Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile

1 5

<210> 234

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 234

His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala

1 5

<210> 235

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 235

Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala Phe

1 5

<210> 236

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 236

Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr

1 5

<210> 237

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 237

Ser Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe

1 5

<210> 238

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 238
Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 239
Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe
1 5

<210> 240
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 240
Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu
1 5

<210> 241
<211> 9
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 241
Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe
1 5

<210> 242
<211> 9

<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis
<400> 242
Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe
1 5

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 243

Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val

1 5

<210> 244

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 244

Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val

1 5

<210> 245

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 245

Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val

1 5

<210> 246

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 246

Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe

1 5

<210> 247

<211> 9

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 247

Gly Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn Leu

1 5

<210> 248

<211> 450

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 248

Met Ser Glu Leu Ser Val Ala Thr Gly Ala Val Ser Thr Ala Ser Ser

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

 20 25 30
Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Ser Val Asp Glu Asp Tyr Leu Leu Tyr

 35 40 45
Glu Cys Asp Gly Gln Trp Val Leu Ala Ala Gly Val Gln Ala Met Val

 50 55 60
Glu Leu Asp Ser Asp Glu Leu Arg Val Ile Arg Asp Gly Val Thr Arg

65 70 75 80
Arg Gln Gln Trp Ser Gly Arg Pro Gly Ala Ala Leu Gly Glu Ala Val

 85 90 95
Asp Arg Leu Leu Leu Glu Thr Asp Gln Ala Phe Gly Trp Val Ala Phe

 100 105 110
Glu Phe Gly Val His Arg Tyr Gly Leu Gln Gln Arg Leu Ala Pro His

 115 120 125
Thr Pro Leu Ala Arg Val Phe Ser Pro Arg Thr Arg Ile Met Val Ser

 130 135 140
Glu Lys Glu Ile Arg Leu Phe Asp Ala Gly Ile Arg His Arg Glu Ala

145 150 155 160
Ile Asp Arg Leu Leu Ala Thr Gly Val Arg Glu Val Pro Gln Ser Arg

 165 170 175
Ser Val Asp Val Ser Asp Asp Pro Ser Gly Phe Arg Arg Arg Val Ala

 180 185 190
Val Ala Val Asp Glu Ile Ala Ala Gly Arg Tyr His Lys Val Ile Leu

 195 200 205

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

<210> 249

<211> 324

<212>

> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 249

Met Ser Asp Gln Val Pro Lys Pro His Arg His His Ile Trp Arg Ile

1 5 10 15

Thr Arg Arg Thr Leu Ser Lys Ser Trp Asp Asp Ser Ile Phe Ser Glu

 20 25 30

Ser Ala Gln Ala Ala Phe Trp Ser Ala Leu Ser Leu Pro Pro Leu Leu

 35 40 45

Leu Gly Met Leu Gly Ser Leu Ala Tyr Val Ala Pro Leu Phe Gly Pro

 50 55 60

Asp Thr Leu Pro Ala Ile Glu Lys Ser Ala Leu Ser Thr Ala His Ser

65 70 75 80

Phe Phe Ser Pro Ser Val Val Asn Glu Ile Ile Glu Pro Thr Ile Gly

 85 90 95

Asp Ile Thr Asn Asn Ala Arg Gly Glu Val Ala Ser Leu Gly Phe Leu

 100 105 110

Ile Ser Leu Trp Ala Gly Ser Ser Ala Ile Ser Ala Phe Val Asp Ala

 115 120 125

Val Val Glu Ala His Asp Gln Thr Pro Leu Arg His Pro Val Arg Gln

 130 135 140

Arg Phe Phe Ala Leu Phe Leu Tyr Val Val Met Leu Val Phe Leu Val

145 150 155 160

Ala Thr Ala Pro Val Met Val Val Gly Pro Arg Lys Val Ser Glu His

 165 170 175

Ile Pro Glu Ser Leu Ala Asn Leu Leu Arg Tyr Gly Tyr Tyr Pro Ala

 180 185 190

Leu Ile Leu Gly Leu Thr Val Gly Val Ile Leu Leu Tyr Arg Val Ala

 195 200 205

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