



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104640564 B

(45)授权公告日 2020.08.04

(21)申请号 201380046981.7

(22)申请日 2013.07.10

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104640564 A

(43)申请公布日 2015.05.20

(30)优先权数据
12305825.7 2012.07.10 EP
12306539.3 2012.12.07 EP
13305737.2 2013.06.03 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.03.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/064624 2013.07.10

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/009438 EN 2014.01.16

(73)专利权人 特兰斯吉恩股份有限公司
地址 法国伊克什格拉芬斯特丹

(72)发明人 E·蒂潘 R·米科 C·A·库佩
G·安邵普斯 M·顾昂维
N·西尔维斯特雷 J-B·马尔尚
C·贝尼

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 王健

(51)Int.Cl.
A61K 39/04(2006.01)

(56)对比文件
CN 101939419 A,2011.01.05,

审查员 张艳青

权利要求书3页 说明书59页
序列表78页 附图16页

(54)发明名称

分枝杆菌抗原疫苗

(57)摘要

本发明大体涉及包括至少5种分枝杆菌种抗原及其融合物的免疫原性组合和编码这种组合抗原和融合物的核酸分子。本发明还涉及包括或编码所述分枝杆菌抗原组合和融合多肽的核酸分子、载体、宿主细胞和组合物,以及用于重组生产它们的方法。本发明还涉及使用所述分枝杆菌抗原组合、融合多肽、载体、宿主细胞、组合物尤其用于诱导或刺激免疫应答的方法,所述免疫应答针对分枝杆菌感染或由分枝杆菌感染引起或与其有关的任意疾病。本发明还涉及针对这种分枝杆菌抗原和融合多肽的抗体(可用于分枝杆菌感染的诊断),以及包括所述分枝杆菌抗原组合、融合多肽、载体、宿主细胞、组合物或抗体的检测方法和试剂盒。

1. 一种痘病毒载体,或两种或多种痘病毒载体的组合,包括一或多种编码至少6种独立地获自分枝杆菌种的分枝杆菌抗原的核酸分子,其中所述核酸分子:

-至少编码来自活跃期的ESAT-6 (Rv3875)、Ag85B (Rv1886) 和TB10.4 (Rv0288);

-编码选自Rv0111、Rv0569、Rv1733c、Rv1807、Rv1813、Rv2029c、Rv2626和Rv3407的至少一种来自潜伏感染期的抗原;和

-至少编码复苏感染期的RpfB和RpfD。

2. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其包含编码8-14种独立地获自分枝杆菌种的分枝杆菌抗原的一或多种核酸分子。

3. 权利要求2的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述分枝杆菌抗原选自ESAT-6 (Rv3875)、Ag85B (Rv1886)、TB10.4 (Rv0288)、RpfB、RpfD、Rv0111、Rv0569、Rv1733c、Rv1807、Rv1813、Rv2029c、Rv2626、Rv3407和Rv3478。

4. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述潜伏期抗原选自Rv0111、Rv1733c、Rv2029c和Rv2626。

5. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述分枝杆菌抗原获自结核复合物的分枝杆菌种,所述分枝杆菌种选自结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) (Mtb)、牛分枝杆菌 (*M. bovis*)、牛分枝杆菌BCG、非洲分枝杆菌 (*M. africanum*)、卡氏分枝杆菌 (*M. canetti*)、山羊分枝杆菌 (*M. caprae*) 和田鼠分枝杆菌 (*M. microti*)。

6. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述枝杆菌抗原获自结核分枝杆菌 (Mtb)、牛分枝杆菌、牛分枝杆菌BCG和山羊分枝杆菌。

7. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述枝杆菌抗原获自结核分枝杆菌 (Mtb)。

8. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述核酸分子编码另外的分枝杆菌抗原。

9. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述核酸分子编码分离多肽的形式或一或多种融合多肽的形式分枝杆菌抗原,或分离抗原和融合物形式的分枝杆菌抗原。

10. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其包含选自SEQ ID NO: 40-51的一或多种核酸分子。

11. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述痘病毒载体选自鸡痘、金丝雀痘和牛痘病毒载体。

12. 权利要求11的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合,其中所述牛痘病毒载体是哥本哈根株、惠氏株、NYVAC株和修饰的安卡拉 (MVA) 株。

13. 权利要求1的痘病毒载体,选自:

i. 一种痘病毒载体,编码包括Rv2029c、Rv2626、Rv1733c和Rv0111的融合多肽以及包括RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT-6的融合多肽;

ii. 一种痘病毒载体,编码包括Rv2029c、Rv2626、Rv1733c和Rv0111的融合多肽、包括RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT-6的融合多肽以及包括Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽;

iii. 一种痘病毒载体,编码包括Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD和Rv1733c的融合多肽以及

包括Rv2029c、TB10.4、ESAT-6和Rv0111的融合多肽；

iv. 一种痘病毒载体，编码包括Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD和Rv1733c的融合多肽、包括Rv2029c、TB10.4、ESAT-6和Rv0111的融合多肽以及包括Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽；和

v. 一种痘病毒载体，编码包括RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT-6的融合多肽以及包括Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽。

14. 权利要求1的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合，其采用感染性病毒颗粒的形式。

15. 一种痘病毒载体，或两种或多种痘病毒载体的组合，包括一或多种编码包含5种结核分枝杆菌抗原的融合多肽的核酸分子，所述5种抗原是RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT6。

16. 权利要求15的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合，其中所述融合多肽选自包含选自以下的氨基酸序列的多肽：

●SEQ ID NO:32中从第32位到第855位所示的氨基酸序列；和

●SEQ ID NO:33中从第10位到第833位所示的氨基酸序列；

其中所述氨基酸序列还包括起始氨基酸Met。

17. 权利要求15的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合，其中所述融合多肽还包含合适的靶向肽。

18. 权利要求17的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合，其中所述合适的靶向肽是信号肽和/或跨膜肽。

19. 权利要求15的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合，其中所述痘病毒载体选自鸡痘、金丝雀痘和牛痘病毒载体。

20. 权利要求19的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合，其中所述牛痘病毒载体是哥本哈根株、惠氏株、NYVAC株和修饰的安卡拉(MVA)株。

21. 权利要求15的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合，其采用感染性病毒颗粒的形式。

22. 一种产生感染性病毒颗粒的方法，包括以下步骤：(i) 将权利要求1-21任一项的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合导入合适的细胞系，(ii) 在合适条件下培养所述细胞系以允许产生所述感染性病毒颗粒，和(iii) 从所述细胞系的培养物回收产生的病毒颗粒。

23. 权利要求22的方法，进一步包括步骤(iv) 纯化所述回收的病毒颗粒。

24. 一种宿主细胞，包括权利要求1-21任一项的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合。

25. 一种组合物，包括：

权利要求1-21任一项的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合，或

权利要求24的宿主细胞，或

其任意组合的至少一种。

26. 权利要求25的组合物，还包括药学上可接受的载体。

27. 权利要求1-21任一项的痘病毒载体或两种或多种痘病毒载体的组合、权利要求24

的宿主细胞或权利要求25和26任一项的组合物在制备用于预防或治疗分枝杆菌感染或由这类分枝杆菌感染引起或与其有关的任意疾病和病理性状况的药物中的用途。

28. 权利要求27的用途,其中所述药物用于在需要其的受试者中预防分枝杆菌感染或延迟分枝杆菌感染的风险。

29. 权利要求28的用途,其中所述药物用于在已经与患有活跃疾病的感染个体有过密切接触的受试者中预防分枝杆菌感染或延迟分枝杆菌感染的风险。

30. 权利要求27的用途,其中所述药物用于治疗感染分枝杆菌种的受试者的活跃疾病。

31. 权利要求30的用途,其中所述药物用于治疗感染结核分枝杆菌的受试者的活跃疾病。

32. 权利要求27的用途,其中所述药物用于预防或治疗潜伏性感染分枝杆菌种的受试者的再活化。

33. 权利要求32的用途,其中所述药物用于预防或治疗潜伏性感染结核分枝杆菌的受试者的再活化。

34. 权利要求27的用途,其中所述药物用作BCG增强剂。

35. 权利要求27的用途,其中所述药物用于与一或多种有效抗分枝杆菌感染的化疗药物联用。

36. 权利要求35的用途,其中所述药物用于与一或多种抗生素化疗法联用。

37. 权利要求27的用途,其中所述药物用于诱导或增强被施用受试者的免疫应答。

38. 权利要求37的用途,其中所述诱导或刺激的免疫应答是针对分枝杆菌抗原/表位的CD4⁺和/或CD8⁺介导的T细胞应答。

分枝杆菌抗原疫苗

技术领域

[0001] 本发明大体涉及新的免疫原性组合,包括分枝杆菌种的至少5种抗原及其融合物,以及编码所述组合抗原和融合物的核酸分子,其中所述抗原来自于分枝杆菌种,尤其是肺结核复合体的分枝杆菌,诸如结核分枝杆菌(Mtb)。本发明还涉及包括或编码分枝杆菌抗原和融合多肽的所述组合的载体、宿主细胞和组合物,以及用于表达和生产它们的方法。本发明还涉及使用所述分枝杆菌抗原、融合多肽的组合、载体、宿主细胞、组合物尤其用于诱导或刺激免疫应答的方法,目标是提供抗分枝杆菌感染或由分枝杆菌感染引起或与其有关的任意疾病的保护性应答。本发明还涉及针对本发明使用的分枝杆菌抗原和融合多肽的抗体(可用于分枝杆菌感染的诊断),以及包括所述分枝杆菌抗原、融合多肽的组合、载体、宿主细胞和组合物的诊断试剂盒。

背景技术

[0002] 据估算有三分之一的世界人口曾感染结核分枝杆菌(Mtb)(即超过二十亿个体)并且每年有900万到1000万新增病例和200万死亡病例,肺结核(TB)是全球和世界范围内的健康问题。结核分枝杆菌(Mtb)芽胞杆菌,TB的病原体,具有4,411,529个碱基对(bp)的环状基因组,其在1998年被完全测序(Cole等,1998,Nature 393:537-44)。Mtb编码大约4000个基因;但是,这些基因中的大多数在Mtb生命周期和发病机理中的功能和作用仍未阐明。长久以来人们猜想不同组的基因在不同和连续的感染期表达,即活跃期后是潜伏状态,当条件聚集时,由复苏期过渡至新的活跃期。最近的证据动摇了这个经典理论,本领域现在承认发生某种“渗漏”,即基因表达可以采用不依赖阶段的方式发生,尽管达到不同阈值。此外,Mtb的潜伏性质也存在争议:细菌主要是休眠、非复制的,或它们继续复制并且有时甚至从感染细胞逃脱至相邻气管,从而诱导复发的免疫应答?(Ehlers等,2009,Infection 37:87-95)。

[0003] 通常,通过患有肺部TB(活跃疾病)的人产生的雾化液滴发生人和人之间的传播。在感染者(据估算30%的暴露个体)中,只有5-10%将在接触后2年内发展为活跃TB疾病(称为原发TB)。但是,大多数感染个体发展为潜伏感染(LTBI),其可能持续数十年而无临床症状或病症。LTBI代表一种平衡状态,其中受感染的受试者能够控制感染,但不能完全清除细菌。在后期,尤其在老年人或受HIV感染并用TNF抑制剂治疗情况下的免疫受损个体中,可能发生再活化(很久之前感染之后的活化TB)。TB再活化的风险在一生中据估算为10%,而受损的免疫力使风险增加到每年10%。

[0004] 有数个系列证据表明细胞免疫系统的刺激在控制TB疾病中起作用(Rook等2007,J Infect Dis 196:191-8)。CD4 T淋巴细胞在控制病原体和预防疾病进展中的核心作用(大约90%的Mtb感染受试者)已得到确证。例如,具有低CD4⁺T细胞计数的HIV/AIDS患者对TB疾病进展更敏感,而提高CD4⁺T细胞的抗病毒治疗减缓TB疾病进展。但是,CD4 T细胞单独不起作用,需要CD8 T细胞及其他T细胞亚型的支持。在这方面,有关肿瘤坏死因子- α (TNF α)阻断剂以及遗传多态性诸如干扰素- γ (IFN γ)和其他受体缺陷的经验证明特异性细胞因子和细胞因子网络在控制疾病,参与人体内TB控制的细胞免疫性质中的重要性(Cooper

等,2009,Annu Rev Immunol 27:393-422)。

[0005] 考虑到疫苗(卡介苗(Bacille-Calmette-Guerin (BCG)))和抗生素的存在和广泛使用,每年Mtb引起的百万死亡病例非常惊人。但是,尽管BCG看起来在新生儿和婴儿中有效预防疾病,但是它不保护成人,也不能在潜伏感染者中阻止Mtb再活化。另一方面,利用各种抗生素组合治疗活跃TB看似有效,但要求患者对长达数月的每天施用不同药物的较高顺应性。此外,尽管正确服用时抗生素能够非常有效的抵抗野生型Mtb菌株,但是抗药Mtb菌株(例如“多抗药性”(MDR)、“广泛抗药性”(XDR)和“全抗药性”(TDR)菌株)以惊人的速度出现,主要是由于不当遵守这种长期和昂贵的药物治疗方式。因此在这种令人担忧的背景下需要优先发展有效的TB疫苗,近十年来正在研究两种主要方法:BCG替代和BCG加强剂。十多种疫苗候选物正在临床试验中(综述可参见Ottenhoff and Kaufmann,2012,PLoS 8(5):e1002607)。此外,近期本领域还考虑使用新的疫苗制剂以辅助治疗Mtb感染,称为“治疗性疫苗”,其用作新的独立疗法或可选地辅助标准疗法,尤其用于抗药菌株的治疗。

[0006] BCG替代候选物旨在改善BCG的效力和安全性,主要基于活的减毒细菌诸如遗传修饰的BCG或Mtb菌株,其被改造来表达BCG缺失的新的抗原组,或过表达BCG虽然表达但是水平可能不足的Mtb抗原,或仍然缺失致病基因及其调控因子。各种重组BCG构建体已经进入临床试验以检验它们取代BCG的能力。目前处于II期试验的进展最快的VPM1002是一种脲酶缺陷rBCG,其表达来自单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的硫醇激活的结合胆固醇的李斯特菌溶胞素(hly),已经证明在免疫受损动物中比BCG更安全,并在小鼠中提供抵抗Mtb攻击的优异防护(Grode等,2005,J Clin Invest 115:2472-9)。还有两种rBCG最近已进入临床评价,分别是表达Ag85B的rBCG30,和表达Ag85A、Ag85B和Rv3407以及产气荚膜梭菌细胞溶素(perfringolysin)的AERAS422。

[0007] BCG加强剂旨在诱导细胞和/或体液免疫应答,通常依赖于设计用于提供TB抗原的重组疫苗,作为蛋白组合物通常与有效的Th1活化佐剂混合或通过病毒表达载体(综述参见Thaissa等,2010,Yale J.of Biol.and Medicine 83:209-15;Andersen,2007,Nature 5:484和Kaufman,2012,Trend in Immunology 241:1-7)。在4000种潜在的TB抗原中,许多在临床前模型中显示免疫原性。

[0008] 进展最快的基于蛋白的候选物之一是杂种1(H1)蛋白,其由与ESAT-6融合的Ag85B组成(Langermans等,2005,Vaccine 23:2740-50;Dietrich等,2007,J. Immunol.178:3721-30)。当与IC31佐剂一起施用,在人中观察到强CD4+Th1 IFN γ -介导的应答(Van Dissel等,2010,Vaccine 28:3571-81)。最近发现这种疫苗加强由BCG或潜伏Mtb感染先前诱导的免疫应答(Van Dissel,2011,Vaccine 29:2100-9)。另一种融合蛋白Hyvac 4(H4)由与TB10.4融合的Ag85B组成(Aagaard等,PLoS One 4:1-8),正处于平行开发计划中。当与不同的合成佐剂施用,就安全性和免疫原性来说,由插入丝氨酸蛋白酶Rv0125中间的Rv1196制备的GSK的M72融合蛋白显示有利的临床特点(Von Eschen等,2009,Hum Vaccine 5:475-82)。还可以例举所谓的ID融合蛋白(WO2008/124647),诸如由Rv1813、Rv3620和Rv2608制备的ID83(Baldwin等,2009,Vaccine 27:3063-71),以及包括与3个ID83抗原融合的Rv3619的ID93(Bertholet等,2010,Sci Transl Med 2(53):53ra74)。

[0009] 正在临床试验中测试的以病毒为载体的TB疫苗包括修饰的表达Ag85A抗原的安卡拉牛痘病毒(MVA)(MVA85A/Aeras-485;WO2006/72787),以及表达Ag85A、Ag85B和TB10.4抗

原的复制缺陷腺病毒(Ad) 35 (Cruce11 Ad35/Aeras-402;W02006/053871)。MVA85A已经在未免疫以及BCG预处理的个体中显示免疫原性,诱导高CD4+T细胞应答(Mc Shane等,2004,Nat Med 10:1240-4;Scriba等,2010,Eur J Immunol 40:279-90),而Aeras-402似乎倾向于CD8 T细胞和IFN γ 应答(Radosevic等,2007,Infect Immunol 75:4105-15;Magalhaes等,2008,PLoS One 3,e3790;Abel等,2010 Am J Respir Crit Care Med 181:1407-17)。

[0010] 更近的研究现在专注于多相(multi-phasic)组合物(参见例如W02008/124647和W02011/144951)。这些疫苗候选物中的一些已经在临床前和临床研究中发挥作用,证明具有诱导稳健的针对Mtb的细胞介导免疫应答的能力(Thaissa等,2010,Yale J.of Biol.and Medicine 83:209-15;Delogu等,2009,J Infect Developing Countries 3:5-15)。例如,组合潜伏Mtb Rv2660以及活跃Ag85B和ESAT-6抗原的H56融合蛋白显示可能有希望的BCG加强剂活性,尽管它还没有进入临床试验(Aagaard et al,2011,Nature Med 17:189-94;Lin等,2012,J Clin Invest 122:303-14)。但是,这些研究突出了各种因素对T细胞应答和保护效力的影响,诸如抗原剂量(例如Aagaard等,PLoS One 4:1-8)和施用途径(Goonetilleke等,2003,J.Immunol.171:1602-9)。

[0011] 因为以下各种原因,肺结核远未得到控制:患者对资源有限地区指定护理标准较差的顺应性,HIV共感染引起的TB流行的加重,不能有效保护成人的BCG接种的较差性能。考虑到世界范围内增加的TB威胁以及Mtb感染和抗分枝杆菌免疫应答固有的复杂性,仍然需要用于诊断、预防和治疗肺结核的改进的疫苗策略,尤其是在疾病流行区域。

[0012] 通过提供Mtb抗原的免疫原性组合,所述组合针对感染天然过程的所有阶段制作,本发明满足这种及其他需要。

[0013] 该技术问题通过提供如权利要求所述的实施方案来解决。

[0014] 根据对本发明优选实施方案的下列说明,本发明的其他和另外方面、特征及优点将显而易见。给出这些实施方案用于说明。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明总体涉及一种免疫原性组合,包括至少5种不同的抗原或编码至少5种抗原的核酸分子,其中所述抗原独立的获自于分枝杆菌种,尤其是肺结核复合体的分枝杆菌种,诸如结核分枝杆菌(Mtb)。开发一种数据挖掘评分系统,用于根据其免疫原性和保护特性对一组Mtb抗原进行分类。根据序列比对、生化和生物信息学预测研究,选择14种Mtb抗原,并组合为抗原/载体组合和融合多肽。

[0017] 在本发明的一个方面,本发明的抗原组合是多相的,其中至少5种分枝杆菌抗原来自于分枝杆菌感染天然过程的两个或三个期,即活跃期、潜伏期和复苏期。可以采用如本文描述的混合物形式或一或多种融合多肽来使用/表达分枝杆菌抗原。

[0018] 本发明还涉及特定分枝杆菌抗原的融合多肽、编码/表达这类融合多肽的核酸分子和载体,和包括或编码所述融合多肽的组合物,以及制备所述融合物、载体和组合物的方法。本发明还涉及针对该分枝杆菌抗原和融合多肽的抗体。它还涉及该免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、组合物或抗体用于诊断、预防或治疗分枝杆菌感染或改善与分枝杆菌感染有关状况的用途。

[0019] 本发明的另一方面包括在需要其的受试者中治疗、预防或抑制分枝杆菌感染或改善与分枝杆菌感染有关状况的方法,包括提供或施用这种免疫原性组合、融合多肽、核酸分

子、载体或组合物。

[0020] 本发明的另一方面涉及在需要其的受试者中引发免疫应答的方法,包括提供或施用这种免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体或组合物,以便在该受试者中诱导或刺激免疫应答或预防或治疗分枝杆菌感染。

[0021] 本发明的另一方面提供一种部件试剂盒,包括用于给受试者提供或施用这种免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体或组合物的多个容器和说明书。

[0022] 本发明的另一方面提供用于诊断分枝杆菌感染(例如肺结核)的抗体测定的试剂的试剂盒,包括这种免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体或组合物。

[0023] 与单个抗原相比,本发明提供的抗原组合提供改进和预料不到的免疫原性特性(例如,免疫原性应答的水平、质量和/或范围)。

[0024] 本发明尤其可用于免疫治疗,单独或作为BCG加强剂用于分枝杆菌感染领域的预防或治疗目的,例如预防Mtb感染和/或预防原发性TB和/或预防潜伏感染受试者的再活化。它还可以与标准的(例如抗生素疗法)或当前开发的任意其他新型疗法(例如小的直接或间接抑制剂分子;抗体或免疫治疗,等等)联用。本发明还可用于兽医领域,例如在动物中降低或消除分枝杆菌感染和/或活化疾病的风险,特别是在牛和山羊繁殖中。

[0025] 发明详述

[0026] 本发明大体涉及包括至少5种分枝杆菌种抗原或编码所述至少5种抗原的核酸分子的免疫原性组合。

[0027] 定义

[0028] 如在整个申请中使用的,术语“一个(a)”和“一个(an)”用于表示“至少一个”、“至少第一个”、“一或多个”或“多个”参考化合物或步骤,除非上下文另外规定。

[0029] 本文使用的术语“和/或”包括“和”、“或”以及“所述术语相关元件的所有或任意其他组合”的含义。

[0030] 本文使用的“约”或“大约”表示在给定值或范围的10%以内,优选8%以内,更优选5%以内。

[0031] 术语“氨基酸”、“残基”和“氨基酸残基”是同义词,包括天然氨基酸以及氨基酸类似物(例如非天然的、合成和修饰的氨基酸,包括D或L旋光异构体)。

[0032] 术语“多肽”是指包括通过共价肽键键合的至少9个或更多个氨基酸的氨基酸残基的多聚体。多肽可以是线性的、分枝的或环状的,并且可以包括天然存在的和/或氨基酸类似物。它可以是化学修饰的,通过糖基化、脂化、乙酰化、切割、通过二硫键交联和/或磷酸化,或仍然通过包含附加的氨基酸诸如标签(组氨酸、myc、Flag,等等)或靶向肽(信号肽、跨膜结构域,等等)。应理解术语“多肽”包括蛋白(通常用于包括50个或更多个氨基酸残基的多肽)、寡肽和肽(通常用于包括少于50个氨基酸残基的多肽)。因此每种多肽的特征在于特定氨基酸,并由特定核酸序列编码。

[0033] 如本文使用的,当用于限定产品、组合物和方法时,术语“包括(comprising)”(和“包括(comprising)”的任意形式,诸如“包括(comprise)”和“包括(comprises)”),“具有(having)”(和具有(having)的任意形式,诸如“具有(have)”和“具有(has)”),“包括(including)”(和包括(including)的任意形式,诸如“包括(includes)”和“包括(include)”)或“包含(containing)”(和包含(containing)的任意形式,诸如“包含

(contains)”和“包含(contain)”)是开放式的,不排除另外的、未提及的元件或方法步骤。因此,当所述氨基酸序列是所述多肽的最终氨基酸序列的一部分时,多肽“包括”氨基酸序列。这样的多肽可以具有最多数百个附加的氨基酸残基(例如本文提及的标签和靶向肽)。“基本上由…组成”表示排除具有任何实质显著性的其他组分或步骤。因此,基本上由所述组分组成的组合物不会排除痕量染污物和药学上可接受的载体。当氨基酸序列最终只存在一点点附加的氨基酸残基时,多肽基本上由氨基酸序列组成。“由…组成”表示排除多于痕量成分的其他组分或步骤。例如,当多肽不包含除了所述氨基酸序列之外的任意氨基酸时,多肽由氨基酸序列组成。

[0034] 术语“相同性”是指两种多肽或核酸序列之间氨基酸与氨基酸或核苷酸与核苷酸的对应性。两条序列之间的相同性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数,需要考虑为了最佳比对需要引入的缺口数目和每个缺口的长度。本领域有多种用于确定氨基酸序列之间相同性百分比的计算机程序和数学算法,例如NCBI提供的Blast程序和蛋白质序列和结构地图集(Atlas of Protein Sequence and Structure)的ALIGN(Dayhoffed,1981, Suppl.,3:482-9)。专业数据库也提供用于确定核苷酸序列之间相同性的程序(例如Genbank,Wisconsin Sequence Analysis Package,BESTFIT,FASTA和GAP程序)。出于说明目的,“至少80%相同性”表示80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或者100%。

[0035] 如本文使用的,“可操作连接的”表示被连接的元件按照使它们符合预期目的起作用的方式排列。例如,如果启动子引起从转录起始到终止子转录,导致在允许的宿主细胞中的核酸分子中存在的编码序列的表达,启动子可操作地连接到核酸分子。

[0036] 如本文使用的,术语“分枝杆菌”、“分枝杆菌种”和“分枝杆菌的”可以互换使用以指代属于分枝杆菌科家族的放线菌(Actinobacteria)属的任意成员。所述术语包括实验室菌株以及临床分离物。

[0037] “分枝杆菌感染”是指受试者暴露于分枝杆菌种,然后细菌定居于受试者或受试者的组织。定居可以引起严重的疾病(例如肺结核、麻疯病、Bureli溃疡等等,取决于分枝杆菌),或不产生不良症状(无症状的或潜伏感染)。

[0038] 如本文使用的术语“组合”是指各种组分(例如分枝杆菌抗原和/或编码核酸分子)的任意可能排列。这类排列包括分枝杆菌抗原的混合物(例如单个抗原的混合物和/或抗原的融合物)或核酸分子的混合物(例如由一或多个载体携带),以及多肽和核酸分子的混合物。本发明包括:包含等摩尔浓度每种组分的组合以及具有相差很大浓度的组合。应理解本领域技术人员可以确定每种分枝杆菌组分的最佳浓度。

[0039] 术语“免疫原性”是指在引入具有免疫原性的组分的受试者中诱导或刺激可测量的T和/或B细胞介导的免疫应答的能力。例如,从能够诱导或刺激受试者的免疫应答的意义上说,本发明的抗原性组合是免疫原性的,所述免疫应答可以是先天性和/或特异性的(即抗所述免疫原性组合包含或表达的至少一种分枝杆菌抗原/表位),体液和/或细胞的(例如抗体和/或细胞因子的产生和/或以下细胞的活化:细胞毒性T细胞,B、T淋巴细胞,抗原呈递细胞,辅助T细胞,树突状细胞,NK细胞,等等),并通常在施用受试者中产生保护性应答。本领域有多种直接或间接的生物测定法,以如本文所述体内(动物或人类)或体外(例如在生物学样品中)评价组分的免疫原性特征。

[0040] 如本文使用的,术语“分枝杆菌抗原”是指存在于分枝杆菌种或获自分枝杆菌种的多肽或其片段(例如表位),其能够被抗体或T细胞受体结合。通常,这类抗原包含一或多个B和/或T表位,尤其是CTL或T_H表位或上述两种,参与在主要组织相容性复合体(MHC)背景下被特定抗体或T细胞受体的识别。在本发明的上下文中,该术语包括天然分枝杆菌多肽以及下文描述的其片段和修饰形式(即变体)。

[0041] “表位”对应于最小肽基序(通常是一组8-25个氨基酸残基),其形成被抗体、T细胞受体或HLA分子识别的位点。所述残基可以是连续的(线性表位)或非连续的(包括彼此不是紧密相邻的残基的构象表位)。

[0042] 如本文使用的术语“治疗(treating)”(和治疗(treating)的任意形式,诸如“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”)包括预防(例如受试者感染分枝杆菌风险的预防)和/或治疗(例如诊断为感染分枝杆菌的受试者)。治疗需要给受试者外部或内部施用活性剂(例如本文描述的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体和/或组合物),最终与常规疗法,尤其是当前用于治疗活跃分枝杆菌病原(例如TB)的疗法联用。

[0043] 术语“受试者”泛指将受益于诱导或刺激抗分枝杆菌种免疫应答的脊椎动物,尤其是选自家畜、农畜、竞赛动物(sport animals)和灵长类动物的哺乳动物。优选地,受试者是已经确诊或有感染分枝杆菌(特别是Mtb)的风险,因此容易罹患或有患分枝杆菌感染(例如活跃或潜伏性结核)引起的或与其有关的疾病或状况的风险的人。

[0044] “保护性应答”具有其通常含义,即与未接受治疗的受试者的反应相比,所述治疗为接受治疗的受试者提供益处;例如,诱导或刺激免疫应答,防止分枝杆菌感染,或增加对活跃疾病的抗性,或防止潜伏性分枝杆菌感染的再活化或甚至在活跃疾病发展后治愈。

[0045] 如本文使用的,术语“分离的”是指从其自然环境移出(即与其天然相关的至少一种其他组分分离)的组分(例如多肽、核酸分子、载体,等等)。

[0046] 术语“获自”、“来源于”或“源于”用于标示组分(例如多肽、核酸分子)的原始来源,但不是用于限制组分的制备方法,所述方法例如可以通过化学合成或重组方式。

[0047] 分枝杆菌种(Mycobacterium species)

[0048] 如上所定义的,本发明的免疫原性组合所包括/编码的分枝杆菌抗原可以独立的获自当前所鉴定的分枝杆菌(M.)种的任意成员。本领域描述了可用于本发明情况的大量分枝杆菌。示例性的分枝杆菌种包括但不限于草分枝杆菌(M. phlei)、耻垢分枝杆菌(M. smegmatis)、非洲分枝杆菌(M. africanum)、卡氏分枝杆菌(M. canetti)、偶发分枝杆菌(M. fortuitum)、海分枝杆菌(M. marinum)、溃疡分枝杆菌(M. ulcerans)、结核分枝杆菌(M. Tuberculosis) (Mtb)、副结核分枝杆菌(M. paratuberculosis)、牛分枝杆菌(M. bovis)、田鼠分枝杆菌(M. microti)、隐藏分枝杆菌(M. Celatum)、鸟分枝杆菌(M. avium)、麻风分枝杆菌(M. leprae)、鼠麻风分枝杆菌(M. lepraemurium)、胞内分枝杆菌(M. intracellulare)、瘰癧分枝杆菌(M. scrofulaceum)、蟾分枝杆菌(M. xenopi)、日内瓦分枝杆菌(M. genavense)、堪萨斯分枝杆菌(M. kansasii)、猿分枝杆菌(M. simiae)、斯氏分枝杆菌(M. szulgai)、嗜血分枝杆菌(M. haemophilum)、亚洲分枝杆菌(M. asiaticum)、玛尔摩分枝杆菌(M. malmoense)、母牛分枝杆菌(M. vaccae)、山羊分枝杆菌(M. caprae)、海豹分枝杆菌(M. pinnipedii)和石氏分枝杆菌(M. Shimoidei)。

[0049] 在一个优选的实施方案中,本发明使用的分枝杆菌抗原获自结核复合物的分枝杆

菌种,其包括通常被认为引起肺结核病的那些种,以及在免疫受损受试者(例如HIV感染患者中)引起肺结核和肺病的分枝杆菌环境和机会种。用于本文的结核复合物的示例性种包括但不限于结核分枝杆菌(Mtb)、牛分枝杆菌、牛分枝杆菌BCG、非洲分枝杆菌、卡氏分枝杆菌、山羊分枝杆菌和田鼠分枝杆菌。优选的实施方案涉及Mtb,包括Mtb实验室菌株诸如H37Rv和H37Ra和临床分离物诸如KZN4207、T85、CDC1551(在美国分离)、F11(在南非分离)、C、K85(在荷兰分离)、CPHL-A,以及MDR或XDR分离物诸如TN5904、Haarlem、KZN1435、Beijing和KZN605。用作分枝杆菌抗原来源的其他优选的种是牛分枝杆菌、牛分枝杆菌BCG和羊分枝杆菌,尤其是用于兽医。但是,考虑到分枝杆菌种之间在氨基酸和核苷酸水平上存在的高同源性百分比,事实上人们会预期交叉反应性。例如,Mtb和牛分枝杆菌的Rv1733c抗原是100%相同的,而非洲分枝杆菌与Mtb的Rv1733c在210个氨基酸中有209个氨基酸相同。因此,Mtb抗原的组合可能能用于治疗Mtb感染的(人用途)、牛分枝杆菌和羊分枝杆菌(兽医用途)感染的受试者。

[0050] 适合的分枝杆菌抗原的氨基酸序列和编码核苷酸序列可以方便的获自专业数据库(以及文献中。例如,Mtb序列可见于Cole等(1998,Nature 393:537)或例如由Wellcome Trust Sanger Institute,Institut Pasteur等等维护的站点(例如TB数据库(@tbdb.org)和tuberculist(@tuberculist.epfl.ch))。但是,本发明不限于这些示例性分枝杆菌种。实际上核苷酸和氨基酸序列可以在不同的分离物和菌株之间变化,这种天然遗传变异以及诸如下文描述的那些非天然修饰包括在本发明的范围内。

[0051] 免疫原性组合

[0052] 如本文使用的,“至少5种”是包括从5到50范围内的数字(即5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35,等等),希望从5到33,优选从7到20,更优选从8到18,特别优选10到15(例如12、13或14)。优选地,本发明的组合包括大约10到15种Mtb抗原或对应的核酸分子。

[0053] 在本发明的上下文中,“至少5种分枝杆菌抗原”彼此不同(例如可以使用相同分枝杆菌抗原的多个拷贝,条件是所述组合包括/编码至少5种不同的分枝杆菌抗原)。

[0054] 可选地或另外,至少5种分枝杆菌抗原的每一种可以是天然分枝杆菌抗原(例如全长抗原)或其修饰形式(片段或变体)。

[0055] 可以从自然界的分枝杆菌来源发现、分离、获得“天然的”分枝杆菌抗原。这种来源包括从已经感染或已经暴露于分枝杆菌的受试者收集的生物学样品(例如血液、血浆、血清、唾液、痰、组织切片、活检标本等等),由保藏机构(例如ATCC或TB机构)、文库提供或记载于文献中的培养细胞和重组材料(例如分枝杆菌分离物、分枝杆菌基因组、基因组片段、基因组RNA或cDNA以及本领域已知的包括所述元件的任意质粒和载体)。

[0056] 修饰的分枝杆菌抗原(例如变体)通常在一或多个位置不同于本文具体公开的多肽或天然多肽。可以预期任意修饰,包括取代、插入、添加和/或缺失一或多个氨基酸残基,非天然的排列以及这些可能性的任意组合。氨基酸取代可以是保守的或不保守的。当预期有数种修饰时,它们可以涉及连续的残基和/或不连续的残基。可以通过本领域技术人员已知的多种方式产生修饰,诸如定向诱变(例如利用Sculptor™体外诱变系统,Amersham,Les Ulis,France)、PCR诱变、DNA改组(shuffling)以及通过合成技术(例如产生编码所需多肽变体的合成核酸分子)。

[0057] 无论它们来源于何物(天然或修饰的),优选地本发明免疫原性组合包含或编码的每种分枝杆菌抗原保留对应天然抗原(包括B和/或T细胞表位)的一或多个免疫原性部分。用于鉴定这类相关免疫原性部分的方法是本领域公知的。例如,可以通过实施生物学测定(例如使用合成重叠寡肽库的IFN γ 测定)或现有的预测程序来鉴定T细胞表位。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合包括或编码来自至少2个不同感染期(例如活跃和复苏期,活跃和潜伏期或复苏和潜伏期)的分枝杆菌抗原,所述感染期选自活跃期、复苏期和潜伏期。优选地组合是“多期的”,包括或编码来自3个感染期的分枝杆菌抗原,尤其是Mtb抗原,其中至少一种抗原来自活跃感染期,至少一种抗原来自复苏感染期,至少一种抗原来自潜伏感染期。

[0059] “活跃期的抗原”通常是主要在分枝杆菌在体内活跃生长和复制时表达的一组蛋白。可用于本发明的多种活跃分枝杆菌抗原记载于文献中(例如Bertholet等,2008, *J. Immunol.* 181:7948-57;Bertholet等,2010, *Sci Transl Med* 2:53ra74)。特别合适的活跃期抗原选自ESAT-6 (Rv3875)、CFP-10 (Rv3874)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85A (Rv3804)、Ag85B (Rv1886)、Rv3619、Rv3620以及PPE家族蛋白Rv3478和Rv2608,及其任意组合。优选地免疫原性组合包括或编码至少ESAT-6 (Rv3875)、Ag85B (Rv1886)和TB10.4 (Rv0288)。

[0060] “潜伏期抗原”主要在分枝杆菌感染的休眠(或潜伏)期表达,这是低代谢活性的可逆状态,其中分枝杆菌可以维持较长时段。可用于本发明的多种潜伏分枝杆菌抗原记载于文献中。示例性的Mtb潜伏抗原是由DosR调节子(regulon)编码的那些抗原,所述DosR调节子介导针对在营养物耗竭时上调的缺氧和饥饿抗原的细菌应答(Voskuil等,2003, *J. Exp Med* 198:705-13;Leyten等,2006, *Microbes Inf.* 8:2052-60;Roupie等,2007, *Infection and Immunity* 75:941-9;Black等,2009, *Clin Vaccine Immunol* 16:1203-12;Schuck等,2009, *PLoS One* 4:e5590;Vipond等,2006, *Vaccine* 24:6340-50;Vipond等,2007, *Tuberculosis* 86:218-24;Bertholet等,2008, *J. Immunol.* 181:7948-57;Bertholet等,2010, *Sci Transl Med* 2:53ra74;Mollenkopf等,2004, *Infect Immun* 72:6471-9);W003/000721;W003/004520;W003/035681;W02004/006952和W02006/104389)。特别合适的潜伏期抗原选自Rv0081、Rv0111、Rv0198、Rv0569、Rv1733c、Rv1735、Rv1737、Rv1806、Rv1807、Rv1813、Rv2005c、Rv2029c、Rv2032、Rv2626、Rv2627、Rv2628、Rv2660c、Rv3407、Rv3812和Rv3478及其任意组合;更优选地选自Rv0111、Rv1733c、Rv2029c和Rv2626,或选自Rv0569、Rv1807、Rv1813、Rv3407和Rv3478,或选自Rv0111、Rv1733c、Rv2029c、Rv2626、Rv0569、Rv1807、Rv1813、Rv3407和Rv3478。

[0061] “复苏期的抗原”是指主要在休眠状态与活跃生长和复制(分枝杆菌感染的活跃状态)之间转换时表达或参与其中的任意抗原。可用于本发明的复苏抗原记载于文献中(例如Mukamolova等,2002, *Mol Microbiol* 46:623-35;Yeremeev等,2003, *Infection and Immunity* 71:4789-94;Mukamolova等,2006, *Mol Microbiol* 59:84-98;Tufariello等,2006, *Infect Immun* 74:2985-95;Biketov等,2007, *MMC Infect Dis* 7:146;Kana等,2008, *Mol Microbiol* 67:672-84;Kana等,2009, *FEMS Immunol Med Microbiol* 58:39-50;Russel-Goldman等,2008, *Infect Immun* 76:4269-81;Gupta等,2010, *Microbiol* 156:2714-22和Commandeur等,2011, *Clin Vaccine Immunol.* 18:676-83)。特别合适的复苏期抗原选自RpfA、RpfB、RpfC、RpfD和RpfE及其任意组合。优选地免疫原性组合物至少包括或编

码RpfB和RpfD(例如其免疫原性片段)。

[0062] 在一个优选的实施方案中,本发明的免疫原性组合包括或编码至少5种分枝杆菌抗原,所述分枝杆菌抗原选自ESAT-6 (Rv3875)、CFP-10 (Rv3874)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85A (Rv3804)、Ag85B (Rv1886)、Rv3619、Rv3620、RpfA、RpfB、RpfC、RpfD、RpfE、Rv0081、Rv0111、Rv0198、Rv0569、Rv1733c、Rv1735、Rv1737、Rv1806、Rv1807、Rv1813、Rv2005c、Rv2029c、Rv2032、Rv2626、Rv2627、Rv2628、Rv2660c、Rv3407Rv3478和Rv3812;优选选自ESAT-6 (Rv3875)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85B (Rv1886)、RpfB、RpfD、Rv0111、Rv0569、Rv1733c、Rv1807、Rv1813、Rv2029c、Rv2626、Rv3407和Rv3478;更优选选自包括SEQ ID NO:1-14所示氨基酸序列的多肽或其任意变体或片段。

[0063] 为了进行说明,SEQ ID NO:1代表Rv0111的氨基酸序列;SEQ ID NO:2代表TB10.4的氨基酸序列;SEQ ID NO:3代表Rv0569的氨基酸序列;SEQ ID NO:4代表RpfB的氨基酸序列;SEQ ID NO:5代表Rv1733c的氨基酸序列;SEQ ID NO:6代表Rv1807的氨基酸序列;SEQ ID NO:7代表Rv1813的氨基酸序列;SEQ ID NO:8代表Ag85B的氨基酸序列;SEQ ID NO:9代表Rv2029c的氨基酸序列;SEQ ID NO:10代表Rv2626的氨基酸序列;SEQ ID NO:11代表RV2839c的氨基酸序列;SEQ ID NO:12代表Rv3407的氨基酸序列;SEQ ID NO:13显示Rv3478的氨基酸序列,SEQ ID NO:14代表ESAT-6的氨基酸序列。

[0064] 本发明上下文可以预期的每种修饰的分枝杆菌抗原包括相对于天然对应物的一或多种修饰,尤其是有利于所获多肽的合成、加工、稳定性和/或溶解性和/或其免疫原性的一或多种修饰。合适修饰的典型实例包括但不限于(a)内部高度疏水区域的缺失,(b)N末端信号肽的缺失(如果需要用异源信号肽替换)和/或(c)可能对稳定性、免疫原性和重组表达产生有害干扰的未折叠(unfolded)区域的缺失,和/或(d)催化域的缺失或突变以消除生物学活性。

[0065] 尤其合适的免疫原性组合物包括或编码分枝杆菌抗原,所述分枝杆菌抗原选自包括SEQ ID NO:15-24所示氨基酸序列的多肽。更具体地,SEQ ID NO:15代表相对于天然对应物,通过缺失疏水N末端部分(从第一个残基到约第393位)进行修饰的Rv0111抗原(Rv0111*)。SEQ ID NO:16代表相对于天然对应物,通过缺失信号肽(从第1位残基到大约第29位残基,并通过缺失催化域,从而保留RpfB的大约第30位到第283位)进行修饰的RpfB抗原。SEQ ID NO:17代表相对于天然对应物,通过缺失N末端预测的TM域(从第1位残基到约第61位)进行修饰的Rv1733c抗原(Rv1733c*)。SEQ ID NO:18代表相对于天然对应物,通过缺失未折叠的C末端部分(大约最后60个残基)进行修饰的Rv1807抗原(Rv1807*)。SEQ ID NO:19代表相对于天然对应物,通过缺失N末端信号肽(从第1位残基到约第34位)进行修饰的Rv1813抗原(Rv1813*)。SEQ ID NO:20代表相对于天然对应物,通过缺失N末端信号肽(从第1位残基到约第39位)进行修饰的Ag85B(Ag85B*)。SEQ ID NO:21代表相对于天然对应物,通过缺失C末端部分(大约最后25个残基)并在第265位突变以消除Rv2029c酶活性(例如D265N;Cabrera等,2010,Arch Biochem Biophys 502:23-30)进行修饰的Rv2029c抗原(Rv2029c*)。SEQ ID NO:22代表相对于天然对应物,进行修饰以保留具有为了消除相关酶活性的3个突变(例如E292K、T315A和Q347A)和最后7个残基缺失的催化域(也称为LD(溶菌酶域, Lysozyme Domain))的RpfD抗原。SEQ ID NO:23代表相对于天然对应物,通过缺失未折叠的C末端部分(大约最后33个残基)进行修饰的Rv3407抗原(Rv3407*)。SEQ ID NO:24代

表相对于天然对应物,通过缺失未折叠的C末端部分(大约最后40个残基)进行修饰的Rv3478抗原(Rv3478*)。

[0066] 在一个优选的实施方案中,本发明的免疫原性组合包括或编码与本文所示的氨基酸序列在全长多肽或其片段(例如50个连续氨基酸残基或更多个诸如60、75、80或90个氨基酸残基的片段)中显示至少80%相同性(例如80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性)的至少5种分枝杆菌抗原,尤其是选自包括与SEQ ID NO:1-24(有或没有起始密码子Met)的任一项至少80%同源或相同的氨基酸序列的多肽的至少5种Mtb抗原。

[0067] 在一个更优选的实施方案中,本发明的免疫原性组合包括或表达至少Rv0111,特别优选如SEQ ID NO:15所示的Rv0111*。

[0068] 在更优选的实施方案中,本发明的免疫原性组合包括或表达至少Rv0111、Rv2626、RpfB、RpfD、TB10.4和Ag85B,特别优选如SEQ ID NO:15所示的Rv0111*,如SEQ ID NO:10所示的Rv262,如SEQ ID NO:16所示的RpfB,如SEQ ID NO:22所示的RpfD,如SEQ ID NO:2所示的TB10.4,和如SEQ ID NO:20所示的Ag85B。

[0069] 如上所述,本发明的免疫原性组合包括其组成性分枝杆菌抗原和/或编码核酸分子的任意排列。因此本发明的免疫原性组合可以包括或编码分枝杆菌抗原,其采用分离多肽的形式(例如重组产生的Mtb抗原的混合物)或一或多种融合多肽的形式(至少两种分枝杆菌抗原的共价键合)或分离抗原和融合物两种形式。

[0070] 同样地,核酸分子的组合包括分离的核酸分子或共价连接的核酸分子(例如融合编码核酸)或分离和融合核酸分子两者(其可以被一或多种载体携带)。考虑到分枝杆菌抗原的数目(从5最多至50),优选地组合包括如下所述的编码抗原融合物的一或多种载体。载体组合可以使用相同类型的载体(例如两个MVA)或不同类型的载体(例如质粒DNA和MVA)来表达本文描述的各种分枝杆菌抗原或融合物。

[0071] 融合多肽

[0072] 根据另一个方面,本发明还提供分离的融合多肽以及包括这种融合多肽的组合物,所述融合多肽包括本发明的免疫原性组合包括或编码的两种或更多种分枝杆菌抗原。

[0073] 如本文使用的术语“融合物”或“融合多肽”是指两个或更多个多肽的单个多肽链的共价键合,其通过遗传方式进行,即通过编码每种所述多肽的核酸分子的框内(in frame)融合。通过“框内融合”,它表示融合编码序列的表达产生在各融合多肽间没有任何翻译终止子的单个多肽。融合可以是直接的(即之间没有任何额外的氨基酸残基)或间接的(例如通过融合多肽之间的接头),可以发生在多肽的N末端或C末端或内部。接头的存在有利于融合多肽的正确折叠和/或发挥功能。本发明不受所用接头序列的形式、大小或数目的限制。为了示例性目的,典型接头的长度为3到30个氨基酸,并由重复的氨基酸残基诸如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、丙氨酸和/或脯氨酸组成。

[0074] 如前所述,组成本发明融合多肽的分枝杆菌抗原可以是天然的,和/或如上所述的其修饰的(变体)和/或片段。与采用分离抗原(或表达载体)混合物形式的相同抗原组合相比,采用融合多肽形式的分枝杆菌抗原这种组合可以提供改善的免疫原性。

[0075] 优选地,本发明的融合多肽包括至少两种(例如2、3、4、5、6,等等)本文所述的分枝杆菌抗原,并且优选至少2种多肽选自包括与SEQ ID NO:1-24的任一项至少80%(例如98或

100%)相同的氨基酸序列的多肽。

[0076] 在一个实施方案中,本发明的融合多肽包括相同感染期的分枝杆菌抗原。潜伏Mtb抗原的示例性融合物包括Rv2029c、Rv2626、Rv1733c和Rv0111;活跃Mtb抗原的示例性融合物包括Ag85B、TB10.4和ESAT6;复苏Mtb抗原的示例性融合物包括RpfB和RpfD抗原。

[0077] 在另一个实施方案中,本发明的融合多肽包括来自2个不同感染期或甚至来自活跃期、复苏期和潜伏期的分枝杆菌抗原。这种类型的示例性融合物包括但不限于潜伏和活跃Mtb抗原的融合物(包括Rv2029c、TB10.4、ESAT-6和Rv0111);复苏和活跃Mtb抗原的融合物(包括RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT-6);以及潜伏、复苏和活跃Mtb抗原的融合物(包括Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD和Rv1733c)。

[0078] 在一个优选的实施方案中,本发明的融合多肽选自以下组:

[0079] • 包括Mtb抗原Rv0111的融合多肽(特别优选SEQ ID NO:15所示的Rv0111);

[0080] • 包括Mtb抗原Rv2029c、Rv2626、Rv1733c和Rv0111的融合多肽;

[0081] • 包括Mtb抗原Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽;

[0082] • 包括Mtb抗原Ag85B、TB10.4和ESAT6的融合多肽;

[0083] • 包括Mtb抗原RpfB和RpfD的融合多肽(例如如所谓的RPFB-Dhyb所示,其是缺失LD的RpfB抗原和具有去除酶活性突变的RpfD的LD域之间的融合物);

[0084] • 包括Mtb抗原RpfB、RpfD(例如RPFB-Dhyb)、Ag85B、TB10.4和ESAT6的融合多肽;

[0085] • 包括Mtb抗原Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD(例如RPFB-Dhyb)和Rv1733c的融合多肽;

[0086] • 包括Mtb抗原Rv2029c、TB10.4、ESAT6和Rv0111的融合多肽;和

[0087] • 包括Mtb抗原Ag85B、Rv2626和Rv1733c的融合多肽。

[0088] 在本发明的上下文中,在示例性融合多肽中显示的分枝杆菌抗原可以从N末端到C末端的任意顺序,不必按照所述顺序。因此,包括Ag85B、Rv2626和Rv1733c的融合物除了所述的Ag85B-Rv2626-Rv1733c融合物,还包括Ag85B-Rv1733c-Rv2626;Rv1733c-Rv2626-Ag85B;Rv1733c-Ag85B-Rv2626;Rv2626-Ag85B-Rv1733c;Rv2626-Rv1733c-Ag85B和Ag85B-TB10.4-Rv2626-Ag85B等融合物。

[0089] 对于分枝杆菌抗原,本发明的免疫原性组合和/或融合多肽可以任选的包括衍生自分枝杆菌种(例如其他的分枝杆菌抗原)或是异源的(即来自不同于分枝杆菌的来源)其他组分。这种额外的组分可以是免疫原性的或非免疫原性的。典型的额外组分包括但不限于标签肽、靶向肽、寡聚域、免疫激活肽/多肽和编码所述元件的核酸分子等等。

[0090] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合或融合多肽呈递或编码的任意分枝杆菌抗原可以可操作地连接诸如信号肽和/或跨膜肽的靶向肽。这种靶向肽是本领域公知的(参见例如W099/03885)。简单来说,信号肽(SS)通常存在于膜呈递或分泌多肽的N末端,启动它们进入内质网(ER)。它们包括15个或更多个基本上疏水的氨基酸,其继而被特异性的定位于内质网的内肽酶切除以产生成熟多肽。跨膜肽(TM)实质上通常高度疏水,用于将多肽锚定在细胞膜。可用于本发明范围的跨膜肽和/或信号肽的选择是非常广的。它们可以获自任意膜锚定和/或分泌的多肽(例如细胞或病毒多肽),诸如免疫球蛋白、组织纤溶酶原激活物(tPA)、胰岛素、狂犬病糖蛋白、HIV病毒包膜糖蛋白或麻疹病毒F蛋白的膜锚定和/或分泌的多肽,或可以是合成的。优选地信号肽插入位点位于用于起始翻译的密码子的N末端下

游,而优选地跨膜肽插入位点位于例如紧挨着终止密码子上游的C末端。

[0091] 可选地或另外,本发明的免疫原性组合或融合蛋白呈递或编码的任意分枝杆菌抗原可以可操作地连接标签肽,以便于其分离和检测或便于鉴定表达这种抗原或融合物的宿主细胞。多种标签肽可用于本发明的上下文中,包括但不限于PK标签、FLAG标签(SEQ ID NO:25)、MYC标签(SEQ ID NO:26)、多聚组氨酸标签(通常是5到10个组氨酸残基的序列段(stretch);例如SEQ ID NO:27)。使用所附实施例所述的抗标签抗体,通过免疫检测测定可以检测标签肽。标签肽可以独立的位于分枝杆菌抗原或融合物(标签-多肽)的N末端,或可选地位于其C末端(多肽-标签),或当使用数个标签时可以位于内部或任何位置。

[0092] 可选地或另外,本发明的免疫原性组合或融合多肽呈递或编码的任意分枝杆菌抗原可以可操作地连接能够增强免疫原性特性的一或多种免疫激活肽/多肽。可以引用例如钙网织蛋白(calreticulin)(Cheng等,2001,J.Clin.Invest.108:669),Mtb热休克蛋白70(HSP70)(Chen等,2000,Cancer Res.60:1035),泛素(Rodriguez等,1997,J.Virol.71:8497),和T辅助表位诸如Pan-Dr肽(Sidney等,1994,Immunity 1:751),pstS1GCG表位(Vordermeier等,1992,Eur.J.Immunol.22:2631),破伤风类毒素肽P2TT(Panina-Bordignon等,1989,Eur.J.Immunol.19:2237),P30TT(Demotz等,1993,Eur.J.Immunol.23:425),血凝素表位(Rothbard等,1989,Int.Immunol.1:479)和C4bp寡聚域(Spencer等,2012,PLoS One 7:e33555)。

[0093] 有赖于分枝杆菌抗原,当与不表达这种肽的组合或融合物相比时,这种肽的存在可能有利于增强所获组合或融合多肽的表达和/或免疫原性。可以通过常规技术诸如蛋白印迹法来确定增强的表达。可以使用常规测定诸如ELISpot测定来确定增强的免疫原性。

[0094] 在一个优选的实施方案中,本发明的融合多肽可操作地连接靶向和/或标签肽。例如,所附实施例部分例示的融合物n°2、3、4和5可操作地连接信号肽和Flag标签(位于紧临着起始密码子Met之后的N末端),以及myc标签、跨膜肽和His标签(在紧临着终止密码子之前的C末端),而融合物n°9、10、11和12可操作地连接Flag标签(位于紧临着起始密码子Met之后的N末端),以及myc标签和随后的His标签(在紧临着终止密码子之前的C末端)。另一方面,融合物n°6、8、13和14可操作地连接信号肽和Flag标签(位于紧临着起始密码子Met之后的N末端),以及myc标签和His标签(位于紧临着终止密码子之前的C末端)。

[0095] 融合多肽的优选实例选自包括以下氨基酸序列,或可选地基本上由以下氨基酸序列组成,或可选地由以下氨基酸序列组成的多肽:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:28-39所示的任一项氨基酸序列显示至少80%相同性,有利地至少85%相同性,期望地至少90%相同性,优选地至少95%相同性,更优选地98%相同性和甚至更优选地100%相同性。更具体地,SEQ ID NO:28和29包括包含Ag85B、TB10.4和ESAT6的融合多肽,分别具有和不具有靶向肽(如所附实施例中的融合物n°2和10所示)。SEQ ID NO:30和31包括包含RpfB和RpfD的所谓的RPFB-Dhyb融合多肽,分别具有和不具有靶向肽(如所附实施例中的融合物n°3和12所示)。SEQ ID NO:32和33包括包含RPFB-Dhyb、Ag85B、TB10.4和ESAT6的融合多肽,分别具有和不具有靶向肽(如所附实施例中的融合物n°4和11所示)。SEQ ID NO:34和35包括包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽,分别具有和不具有靶向肽(如所附实施例中的融合物n°5和9所示)。SEQ ID NO:36包括包含Ag85B、Rv2626、RPFB-Dhyb和Rv1733c的融合多肽,具有信号肽(如所附实施例转的融合物n°6所示)。SEQ ID NO:37包括包含

Ag85B、Rv2626和Rv1733c的融合多肽,具有信号肽(如所附实施例中的融合物n°8所示)。SEQ ID NO:38包括包含Rv2029c、Rv2626、Rv1733c和Rv0111的融合多肽,具有信号肽(如所附实施例中的融合物n°13所示)。SEQ ID NO:39包括包含Rv2029c、TB10.4、ESAT-6和Rv0111的融合多肽,具有信号肽(如所附实施例中的融合物n°14所示)。

[0096] 融合多肽的更优选实例选自包括以下氨基酸序列,或可选地基本上由以下氨基酸序列组成,或可选地由以下氨基酸序列组成的多肽:所述氨基酸序列与下列氨基酸序列的任一项显示至少80%相同性,有利地至少85%相同性,期望的至少90%相同性,优选地至少95%相同性,更优选地98%相同性和甚至更优选地100%相同性:

[0097] • SEQ ID NO:28中从大约第32位到大约第506位所示的氨基酸序列(融合物Ag85B*-TB10.4-ESAT-6,如所附实施例中的融合物n°2或10所示);

[0098] • SEQ ID NO:29中从大约第10位到大约第484位所示的氨基酸序列(融合物Ag85B*-TB10.4-ESAT-6,如所附实施例中的融合物n°2或10所示);

[0099] • SEQ ID NO:30中从大约第32位到大约第380位所示的氨基酸序列(融合物RPFb-Dhyb,如所附实施例中的融合物n°3和12所示);

[0100] • SEQ ID NO:31中从大约第10位到大约第358位所示的氨基酸序列(融合物RPFb-Dhyb,如所附实施例中的融合物n°3和12所示);

[0101] • SEQ ID NO:32中从大约第32位到大约第855位所示的氨基酸序列(融合物RPFb-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT-6,如所附实施例中的融合物n°4和11所示);

[0102] • SEQ ID NO:33中从大约第10位到大约第833位所示的氨基酸序列(融合物RPFb-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT-6,如所附实施例中的融合物n°4和11所示);

[0103] • SEQ ID NO:34中从大约第32位到大约第1115位所示的氨基酸序列(融合物Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807,如所附实施例中的融合物n°5和9所示);

[0104] • SEQ ID NO:35中从大约第10位到大约第1093位所示的氨基酸序列(融合物Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807,如所附实施例中的融合物n°5和9所示);

[0105] • SEQ ID NO:36中从大约第32位到大约第956位所示的氨基酸序列(融合物Ag85B*-Rv2626-RPFb-Dhyb-Rv1733c*,如所附实施例中的融合物n°6所示);

[0106] • SEQ ID NO:37中从大约第32位到大约第607位所示的氨基酸序列(融合物Ag85B*-Rv2626-Rv1733c*,如所附实施例中的融合物n°8所示);

[0107] • SEQ ID NO:38中从大约第37位到大约第932位所示的氨基酸序列(融合物Rv2029c-Rv2626-Rv1733c*-Rv0111*,如所附实施例中的融合物n°13所示);和

[0108] • SEQ ID NO:39中从大约第37位到大约第831位所示的氨基酸序列(融合物Rv2029c*-TB10.4-ESAT-6-Rv0111*)。

[0109] 当然,这些氨基酸序列可以具备起始密码子Met。

[0110] 在一个优选的实施方案中,本发明的融合多肽还包括合适的靶向肽诸如信号和/或跨膜肽,以允许其在细胞膜呈递。更优选地融合多肽选自包括以下氨基酸序列,或可选地基本上由以下氨基酸序列组成,或可选地由以下氨基酸序列组成的多肽:所述氨基酸序列与下列氨基酸序列的任一项显示至少80%相同性,有利地至少85%相同性,期望的至少90%相同性,优选地至少95%相同性,更优选地98%相同性和甚至更优选地100%相同性:

[0111] • SEQ ID NO:28中从第1位(起始密码子Met)到大约第23位和从大约第32位到大

约第506位和从大约第517位到大约第583位所示的氨基酸序列(融合物SS-Ag85B*-TB10.4-ESAT-6-TM,如所附实施例中的融合物n°2所示);

[0112] • SEQ ID NO:30中从第1位(起始密码子Met)到大约第23位和从大约第32位到大约第380位和从大约第391位到大约第457位所示的氨基酸序列(融合物SS-RPFB-Dhyb-TM,如所附实施例中的融合物n°3所示);

[0113] • SEQ ID NO:32中从第1位(起始密码子Met)到大约第23位和从大约第32位到大约第855位和从大约第866位到大约第932位所示的氨基酸序列(融合物SS-RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT-6-TM,如所附实施例中的融合物n°4所示);

[0114] • SEQ ID NO:34中从第1位(起始密码子Met)到大约第23位和从大约第32位到大约第1115位和从大约第1126位到大约第1192位所示的氨基酸序列(融合物SS-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TM,如所附实施例中的融合物n°5所示);

[0115] • SEQ ID NO:36中从第1位(起始密码子Met)到大约第23位和从大约第32位到大约第956位所示的氨基酸序列(融合物SS-Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733c*,如所附实施例中的融合物n°6所示);

[0116] • SEQ ID NO:37中从第1位(起始密码子Met)到大约第23位和从大约第32位到大约第607位所示的氨基酸序列(融合物SS-Ag85B*-Rv2626-Rv1733c*,如所附实施例中的融合物n°8所示);

[0117] • SEQ ID NO:38中从第1位(起始密码子Met)到大约第28位和从大约第37位到大约第932位所示的氨基酸序列(融合物SS-Rv2029c-Rv2626-Rv1733c*-Rv0111*,如所附实施例中的融合物n°13所示);和

[0118] • SEQ ID NO:39中从第1位(起始密码子Met)到大约第28位和从大约第37位到大约第831位所示的氨基酸序列(融合物SS-Rv2029c*-TB10.4-ESAT-6-Rv0111*,如所附实施例中的融合物n°14所示)。

[0119] 通常,可以使用标准技术分离或制备分枝杆菌抗原以及编码本发明的免疫原性组合和融合多肽包括的所述抗原的核酸分子。它们可以从例如细菌培养物纯化,或使用本领域可用的任意表达系统在宿主细胞中重组产生,或通过施用诸如本文描述的那些合适的表达载体提供给受试者。

[0120] 核酸分子和核酸组合

[0121] 本发明还提供编码至少5种本发明的免疫原性组合和融合多肽包括的分枝杆菌抗原的分离的核酸分子,以及包括这种核酸分子的组合物。

[0122] 在本发明的上下文中,术语“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”和“核苷酸序列”可以互换使用,定义任意长度的多脱氧核糖核苷酸(DNA)(例如,cDNA、基因组DNA、质粒、载体、病毒基因组、分离的DNA、探针、引物及其任意混合物)或多核糖核苷酸(RNA)(例如,mRNA、反义RNA)或混合多核糖核苷酸-多脱氧核糖核苷酸的多聚体。它们包括单链或双链、线性或环状、天然或合成的核酸。

[0123] 如之前所限定,本发明的核酸分子可以是天然核酸(例如分离自分枝杆菌的基因组或基因组片段),或可以被人工修饰以包括一或多个核苷酸的取代、缺失、添加和/或插入。本发明包括目的在于改善克隆、表达、稳定性的任意修饰(例如导入合适的限制性酶切位点,核苷酸序列的简并和/或优化以优化在指定宿主细胞中的翻译,和/或潜在负面元件

(其使核酸分子或其转录物不稳定)的抑制)。当预期有数种修饰时,它们可以涉及连续的和/或不连续的核苷酸残基。本发明预期的修饰包括沉默修饰(其不改变被编码分枝杆菌抗原和融合多肽的氨基酸序列),以及被翻译为被编码分枝杆菌多肽的修饰。优选地,修饰相对于未修饰不降低被编码分枝杆菌抗原和融合多肽的免疫原性潜能。

[0124] 在一个实施方案中,本发明的核酸分子可以在其全长核苷酸序列或其部分范围内进行密码子简并,以降低本发明背景或宿主细胞中使用的核酸分子之间的序列同源性。实际上建议对显示高度核苷酸序列相同性的核酸序列部分进行简并,本领域技术人员能够通过序列比对鉴定所述部分,并简并同源部分的核酸分子以避免生产过程中的稳定性问题。

[0125] 可选地或另外,可以优化本发明的核酸分子以在特定的宿主细胞或受试者中提供高水平表达,例如鸟类(例如W02010/130756和W02012/001075描述的鸡胚胎成纤维细胞,疣鼻栖鸭(*Cairina moschata*)细胞系),哺乳动物,酵母(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Saccharomyces pombe*)或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))或细菌(例如大肠杆菌、BCG或李斯特氏菌)。实际上已经注意到,当有不止一个密码子编码一个指定氨基酸时,有机体的密码子使用模式是高度不随机的,不同宿主间的密码子使用可能明显不同。由于用于本发明的核苷酸序列主要是细菌来源的,对于在宿主细胞诸如高等真核细胞中的有效表达它们可能具有不合适的密码子使用模式。通常,通过用更经常使用的编码相同氨基酸的一或多种密码子取代对应于目标宿主细胞中不常使用的密码子的一或多种“天然”(分枝杆菌)密码子进行密码子优化。不必取代对应于不常使用的密码子的全部天然密码子,因为即使部分取代也可以实现表达的增加。此外,对于严格执行优化密码子的使用可以有一些偏差,以适应在所获核酸分子中引入限制酶切位点。

[0126] 对于密码子使用的优化,通过对核苷酸序列的额外修饰可以进一步改善在宿主细胞或受试者中的表达。例如,可以对本发明的核酸分子进行修饰以阻止存在于集中区域的罕见、非优化密码子的聚集和/或抑制或改变预期负面影响表达水平的“负面”序列元件。这种负面序列元件包括但不限于,具有极高(>80%)或极低(<30%)GC含量的区域;AT富集或GC富集序列段;不稳定的正向或反向重复序列;RNA二级结构;和/或内部隐藏调控元件诸如内部TATA盒/chi位点/核糖体进入位点和/或剪接供体/受体位点。

[0127] 本发明包括编码选自如SEQ ID NO:1-24中任一项所示的多肽的任意分枝杆菌抗原的核酸分子。

[0128] 特别感兴趣的是编码融合多肽的核酸分子或其任意变体和片段(例如编码如上引用的SEQ ID NO:28-39的示例性部分的片段),所述融合多肽包括与SEQ ID NO:28-39所示任意氨基酸序列显示至少80%相同性(例如80%,85%,90%,95%,98%,100%)的氨基酸序列。

[0129] 本发明尤其优选的实施方案涉及一种核酸分子或其任意变体和片段(例如编码如上引用的SEQ ID NO:28-39的示例性部分),所述核酸分子包括以下核苷酸序列,可选地基本上由以下核苷酸序列组成,或可选地由以下核苷酸序列组成:所述核苷酸序列与SEQ ID NO:40-51中任一项所示核苷酸序列显示至少80%的相同性(即在严谨条件下与所述核酸分子杂交的核酸分子),有利地至少85%的相同性,优选地至少90%的相同性,更优选地至少95%的相同性,并且更优选地100%的相同性。

[0130] 利用本领域可获得的序列数据和本文提供的序列信息,可以产生本发明的核酸分

子。例如,它们可以使用本领域公知的常规技术进行分离,例如通过常规分子生物学技术从特定种的分枝杆菌基因组或其基因组片段、cDNA和基因组文库或已知包括其的任意现有技术载体中利用PCR分离和/或克隆。可选地,还可以通过自动化过程的化学合成(例如从重叠合成的寡核苷酸组装)产生本发明的核酸分子。

[0131] 本发明的另一个实施方案涉及本发明的核酸分子片段,例如限制性核酸内切酶和PCR产生的片段。这种片段可以用做探针、引物或编码相关免疫原性部分的片段。

[0132] 载体

[0133] 本发明还涉及包括一或多种本发明核酸分子的载体,以及包括这种载体的组合物。

[0134] 如本文使用的术语“载体”是指载体(vehicle),优选地包含在宿主细胞或受试者中允许本文所述任意核酸分子的递送、增殖(propagation)和/或表达所需的元件的核酸分子或病毒颗粒。该术语包括用于维持的载体(克隆载体)或用于在各种宿主细胞或受试者中表达的载体(表达载体),染色体外载体(例如多拷贝质粒)或整合载体(例如设计为整合入宿主细胞基因组,并且当宿主细胞复制时产生额外拷贝的核酸分子),以及穿梭载体(例如在原核和/或真核宿主中均起作用)和转移载体(例如用于转移病毒基因组的核酸分子)。为了本发明的目的,载体可以是天然存在的遗传来源、合成或人工的、或天然和人工遗传元件的一些组合。

[0135] 在本发明的上下文中,术语“载体”应被宽泛理解为包括质粒和病毒载体。如本文使用的“质粒载体”是指可复制的DNA构建体。通常质粒载体包含可选择的标记基因,允许携带该质粒载体的宿主细胞在存在相应选择性药物的条件下被选择或不选择。各种阳性和阴性可选择的标记基因是本领域已知的。为了说明,可以使用抗生素抗性基因作为阳性可选择的标记基因,其允许宿主细胞在存在相应抗生素的条件下被选择。

[0136] 如本文使用的术语“病毒载体”是指一种核酸载体,其包括至少一个病毒基因组元件,并可以包装入病毒颗粒或包装为病毒颗粒。术语“病毒”,“病毒粒子”,“病毒颗粒”和“病毒载体颗粒”可以互换使用来表示病毒颗粒,当根据允许产生病毒颗粒的合适条件将核酸载体转入合适的细胞或细胞系时形成所述病毒颗粒。在本发明的上下文中,术语“病毒载体”应被宽泛理解为包括核酸载体(例如DNA病毒载体)以及其产生的病毒颗粒。术语“感染性的”是指病毒载体感染并进入宿主细胞或受试者的能力。病毒载体可以是有复制能力或复制选择性的(例如,被改造为在特定宿主细胞中更好复制或选择性复制),或可以是遗传上失去能力的从而是复制缺陷或复制受损的。

[0137] 在本发明的上下文中适合的载体包括,但不限于,用于在原核宿主细胞诸如细菌(例如大肠杆菌、BCG或李斯特氏菌)中表达的噬菌体、质粒或粘粒载体;用于在酵母(例如酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、巴斯德毕赤酵母)中表达的载体;用于在昆虫细胞系统(例如Sf 9细胞)中表达的杆状病毒载体;用于在植物细胞系统中表达的病毒和质粒载体(例如Ti质粒、花椰菜花叶病毒CaMV、烟草花叶病毒TMV),以及用于在高等真核细胞或受试者中表达的质粒和病毒载体。通常,这种载体是商品化供应的(例如Invitrogen, Stratagene, Amersham Biosciences, Promega, 等等)或可获自保藏机构诸如美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rockville, Md.)或已经是众多出版物的主题,所述出版物描述了它们的序列、结构和制备方法,允许技术人员应用它们。

[0138] 合适质粒载体的典型实例包括,但不限于,pREP4、pCEP4 (Invitrogen)、pCI (Promega)、pVAX (Invitrogen) 和pGWiz (Gene Therapy System Inc)。

[0139] 合适病毒载体的典型实例从各种不同的病毒(例如逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)、痘病毒、疱疹病毒、麻疹病毒、泡沫病毒、甲病毒、水疱性口炎病毒,等等)产生。如上所述,术语“病毒载体”包括载体DNA、基因组DNA及其产生的病毒颗粒,尤其是感染性病毒颗粒。

[0140] 在一个实施方案中,本发明使用的病毒载体是复制缺陷或复制受损的,其表示在正常细胞(例如正常人细胞)或其施用的受试者中无法复制达到任意显著的程度(复制功能的损伤或缺陷可以通过常规方式评价--例如通过测量在非允许细胞中的DNA合成和/或病毒滴度)。这种复制缺陷或受损的载体通常要求增殖、带来或补充缺失/受损的功能的允许细胞系。

[0141] 可用于本发明上下文的病毒载体的实例包括腺病毒载体,其具有有关接种、免疫疗法、基因转移或重组生产的多种显而易见的优势(综述可参见“Adenoviral vectors for gene therapy”,2002,Ed D.Curiel and J.Douglas,Academic Press)。本发明的腺病毒载体可以来源于各种人或动物来源(例如犬、绵羊、猿腺病毒,等等)。可以使用任意血清型,特别优选人腺病毒和特别优选C亚属,诸如Ad2、Ad5、Ad6,以及B亚属,诸如Ad11、Ad34和Ad35。还可有利地使用动物Ad,特别优选黑猩猩Ad,诸如黑猩猩Ad3和Ad63。引用的腺病毒获自ATCC或已经是众多出版物的主题,所述出版物描述它们的序列、结构和制备方法,允许技术人员应用它们(参见例如US 6,136,594;US 6,133,028;W000/50573;W000/70071;W02004/083418;W02004/097016和W02005/071093)。

[0142] 优选的复制缺陷腺病毒载体是E1缺陷,从大约第459位延伸到第3328位或从大约第459位延伸到第3510位的E1缺失(参照GeneBank登录号M73260公开的Ad5序列)。还可通过缺失腺病毒基因组的额外部分(非必需E3区域的全部或部分(例如缺失大约第27867位到第30743位)或其他必需E2和/或E4区域的全部或部分,描述于W094/28152和Lusky等,1998, J.Virol 72:2022)进一步改善克隆能力。

[0143] 本发明的核酸分子可以独立地插入腺病毒基因组的任意位置,特别优选插入以取代E1和/或E3区域。相对于所述区域的天然转录方向,它们可以置于正义或反义方向。

[0144] 尤其适用于本发明上下文的病毒载体的其他实例包括痘病毒载体诸如鸡痘载体(例如FP9)、金丝雀痘载体(例如ALVAC)和牛痘病毒载体,后者是优选的。合适的牛痘病毒包括但不限于哥本哈根菌株、惠氏菌株、NYVAC菌株(US 5,494,807)和修饰的安卡拉(MVA)菌株(Antoine等,1998,Virol.244:365;W002/42480)。用于构建和产生重组痘病毒的常规条件是本领域公知的(参见例如W02010/130753;W003/008533;US 6,998,252;US 5,972,597和US 6,440,422)。本发明的核酸分子优选地插入痘病毒基因组的非必需基因座。胸苷激酶基因尤其适合于插入哥本哈根牛痘载体,以及缺失II或III用于插入MVA载体(W097/02355)。

[0145] 适用于本发明上下文的其他病毒载体是可获自副粘病毒科家族的麻疹病毒(morbillivirus),特别优选麻疹病毒(measles virus)。各种减毒菌株都是本领域可获得的(Brandler et al,2008,CIMID,31:271;Singh等,1999,J.virol.73(6):4823),诸如但不限于,Edmonston A和B菌株(Griffin等,2001,Field's in Virology,1401-1441),Schwarz

菌株 (Schwarz A, 1962, *Am J Dis Child*, 103:216), S-191 或 C-47 菌株 (Zhang 等, 2009, *J Med Virol*. 81 (8):1477)。P 和 M 基因之间或 H 和 L 基因之间的插入是尤其合适的。

[0146] 本发明使用的合适载体还包括细菌细胞, 其可以是野生型或突变的 (例如无毒性的)。这些细菌细胞的公知实例包括但不限于无毒性的分枝杆菌 (例如牛分枝杆菌 BCG)、乳杆菌 (例如乳酸乳球菌)、李斯特氏菌 (例如单核细胞增生李斯特氏菌) 和其他微生物诸如沙门氏菌和假单胞菌。一个优选的实施方案涉及 BCG 载体, 在其基因组中已经以允许 BCG 载体表达这类元件的方式掺入编码一或多种如上所述的分枝杆菌抗原或融合多肽的核酸分子。

[0147] 本发明还包括与脂质或多聚体复合的载体 (例如质粒 DNA), 以形成诸如脂质体、脂复合物或纳米颗粒的微粒结构。

[0148] 根据本发明, 本发明载体包含的核酸分子采用适于在宿主细胞或受试者中表达的形式, 这表示本文所示的每种核酸分子可操作地连接至合适的调控序列。如本文使用的, 术语“调控元件”或“调控序列”是指在给定宿主细胞或受试者中允许、有助于或调控核酸分子表达 (包括核酸或其衍生物 (即 mRNA) 的复制 (replication)、复制 (duplication)、转录、剪接、翻译、稳定性和/或输送) 的任意元件。

[0149] 本领域技术人员将理解, 调控序列的选择取决于以下因素: 载体自身、宿主细胞或受试者、所需表达水平, 等等。启动子是特别重要的。在本发明的上下文中, 它能够组成型指导许多类型的宿主细胞中的核酸分子的表达, 或特异于一些宿主细胞 (例如肺特异性调控序列), 或响应特定事件或外部因素 (例如温度、营养添加剂、激素, 等等) 或根据病毒周期的时期 (例如晚期或早期) 而受到调控。也可以使用在生产步骤响应特定事件或外部因素被抑制的启动子, 以便优化载体产生并防止表达多肽的潜在毒性。

[0150] 适合于在哺乳动物细胞中组成型表达的启动子包括但不限于巨细胞病毒 (CMV) 即时早期启动子 (US 5,168,062)、RSV 启动子、腺病毒主要晚期启动子、磷酸甘油激酶 (PGK) 启动子、单纯疱疹病毒 (HSV)-1 的胸苷激酶 (TK) 启动子以及 T7 聚合酶启动子。启动子诸如 trp、lac、噬菌体启动子、tRNA 启动子和糖酵解酶启动子可用于原核宿主。可用的酵母启动子包括金属硫蛋白、3-磷酸甘油激酶或其他糖酵解酶 (诸如烯醇化酶或甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、负责麦芽糖和半乳糖应用的酶的启动子区域。牛痘病毒启动子尤其适合在痘病毒载体中表达。典型实例包括但不限于牛痘 7.5K、H5R、11K7.5 (Erbs 等, 2008, *Cancer Gene Ther*. 15:18)、TK、p28、p11 和 K1L 启动子, 以及诸如 Chakrabarti 等描述的那些合成启动子 (1997, *Biotechniques* 23:1094-7; Hammond 等, 1997, *J. Virol Methods* 66:135-8; 以及 Kumar 和 Boyle, 1990, *Virology* 179:151-8) 以及早期/晚期嵌合启动子。适于麻疹介导表达的启动子包括但不限于指导麻疹转录单位表达的任意启动子 (Brandler and Tangy, 2008, *CIMID* 31:271)。

[0151] 本领域技术人员将理解, 控制本发明核酸分子表达的调控元件还可以进一步包括用于以下用途的其他元件: 转录的正确起始、调控和/或终止 (例如多聚 A 转录终止序列), mRNA 转运 (例如核定位信号序列)、加工 (例如剪接信号) 和稳定性 (例如内含子和非编码 5' 和 3' 序列), 宿主细胞或受试者中的翻译 (例如起始密码子 Met、三重前导序列、IRES 核糖体结合位点、Shine-Dalgarno 序列, 等等) 和纯化步骤 (例如本文描述的标签)。

[0152] 在一个实施方案中, 编码分枝杆菌抗原的核酸分子由单个载体携带, 所述分枝杆菌抗原存在于本发明的免疫原性组合和/或融合多肽中或由其编码。

[0153] 在可选的实施方案中,编码分枝杆菌抗原的核酸分子由两个或更多个载体携带,所述分枝杆菌抗原存在于本发明的免疫原性组合和/或融合多肽中或由其编码。每个载体编码上述引用的一或多种分枝杆菌抗原,或一或多种融合多肽。可以给受试者基本上同时或顺序施用两种或更多种载体。

[0154] 本发明尤其优选的实施方案涉及选自以下组的单个载体(或病毒颗粒):

[0155] i. 一种载体,编码包括Rv2029c、Rv2626、Rv1733c和Rv011的融合多肽以及包括RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT-6的融合多肽(示例性的载体,分别编码融合物13和4以及融合物13和11);

[0156] ii. 一种载体,编码包括Rv2029c、Rv2626、Rv1733c和Rv0111的融合多肽,包括RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT-6的融合多肽以及包括Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽(示例性的载体,分别编码融合物13、4和5,以及融合物13、11和9);

[0157] iii. 一种载体,编码包括Rv2029c、Rv2626、Rv1733c和Rv0111的融合多肽,包括RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT-6的融合多肽以及包括Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽(示例性的载体,分别编码融合物13、4和9,以及融合物13、11和5);

[0158] iv. 一种载体,编码包括Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD和Rv1733c的融合多肽以及包括Rv2029c、TB10.4、ESAT-6和Rv0111的融合多肽(示例性的载体,编码融合物6和14);

[0159] v. 一种载体,编码包括Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD和Rv1733c的融合多肽、包括Rv2029c、TB10.4、ESAT-6和Rv0111的融合多肽以及包括Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽(示例性的载体,分别编码融合物6、14和5,以及融合物6、14和9);

[0160] vi. 一种载体,编码包括RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4和ESAT-6的融合多肽以及包括Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807的融合多肽(示例性的载体,分别编码融合物9和11,以及融合物5和4)。

[0161] 更优选地,如上所述的载体是MVA载体。

[0162] 如果需要,本发明的免疫原性组合、融合多肽或载体还可以包括选择的分枝杆菌抗原的额外拷贝,或来自不同分枝杆菌种的额外抗原(诸如牛分枝杆菌或山羊分枝杆菌),和/或其他来源的额外多肽(即异源多肽),目的是改善抗分枝杆菌感染或分枝杆菌感染引起或与之相关的任意疾病或状况的治疗或保护活性。合适的额外多肽包括但不限于免疫调节剂诸如细胞因子和来源于可能共感染的有机体(例如HIV、HBV等等)的任何其他抗原。

[0163] 根据优选的实施方案,本发明的载体是感染性病毒颗粒的形式。通常,这种病毒颗粒通过包括以下步骤的方法产生:(i) 将本发明的病毒载体引入合适细胞系,(ii) 在合适条件下培养所述细胞系,从而允许产生所述感染性病毒颗粒,(iii) 从所述细胞系的培养物回收产生的病毒颗粒,和(iv) 任选地纯化所述回收的病毒颗粒。

[0164] 当病毒载体是复制缺陷或复制受损时,通常在允许细胞系或通过使用辅助病毒(其反向提供缺失/受损的功能)来产生颗粒。例如,用于弥补E1缺失的腺病毒载体的合适细胞系包括293细胞(Graham等,1997,J.Gen.Virol.36:59-72)以及HER-96和PER-C6细胞(例如Fallaux等,1998,Human Gene Ther.9:1909-17;W097/00326)或这些细胞系的任意衍生物。禽类细胞尤其适合于增殖痘病毒载体,包括但不限于从获自受精卵的鸡胚胎制备的原代鸡胚成纤维细胞(CEF),以及鸭细胞系(例如描述于W003/076601,W02009/004016,W02010/130756和US2011-008872)。

[0165] 可以从培养物上清液和/或裂解后的细胞回收感染性病毒颗粒。它们可以根据标准技术(层析、超速离心技术,等等)进一步纯化。

[0166] 本发明还包括已经被修饰以允许优先靶向特定宿主细胞的载体或病毒颗粒。靶向载体的特点是在其表面存在能够识别和结合细胞及表面暴露成分(诸如细胞特异性标记物(例如分枝杆菌感染细胞)、组织特异性标记物(例如肺特异性标记物)等等)的配体。合适配体的实例包括针对分枝杆菌抗原性结构域的抗体或其片段。可通过将配体遗传插入病毒表面存在的多肽(例如,腺病毒纤维、五邻体(penton)、pIX或牛痘p14基因产物)进行靶向作用。

[0167] 宿主细胞和产生方法

[0168] 在另一个方面,本发明还涉及包括本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子或载体(例如病毒颗粒)的宿主细胞,以及包括这类宿主细胞的组合物。

[0169] 如本文使用的,术语“宿主细胞”应当没有任何限制地宽泛理解为涉及组织的具体结构、器官或分离的细胞。这类细胞可以是唯一类型的细胞或一组不同类型的细胞诸如培养的细胞系、原代细胞和增殖细胞。在本发明的上下文中,术语“宿主细胞”包括原核细胞、低级真核细胞诸如酵母,以及其他真核细胞诸如昆虫细胞、植物和哺乳动物(例如人或非人)细胞和能够产生本发明载体的细胞(例如293、HER96、PERC.6细胞、CEF、鸭细胞系,等等)。该术语还包括可以是或已经是本文所述载体的受体(recipient)的细胞,以及这类细胞的后代。

[0170] 根据本发明的特定实施方案,宿主细胞可以进一步被包裹。细胞包裹技术是本领域已知的。

[0171] 本发明另一个方面是使用本发明的载体(或感染性病毒颗粒)和/或宿主细胞,重组产生本发明的免疫原性组合或融合多肽包括或编码的分枝杆菌抗原的方法。通常,所述方法包括步骤:(i)将载体导入合适的宿主细胞以产生转染或感染的宿主细胞,(ii)在适于宿主细胞生长的条件下体外培养所述转染或感染的宿主细胞,(iii)回收细胞培养物,和(iv)任选地,从回收的细胞和/或培养物上清液纯化分枝杆菌抗原或融合多肽。

[0172] 预期本领域技术人员了解本领域可获得的用于表达多肽的众多表达系统和用于将载体导入宿主细胞的方法。这类方法包括,但不限于显微注射、CaPO₄介导的转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、电穿孔、脂转染/脂质体融合、基因枪、转导、病毒感染以及通过各种方式直接引入宿主有机体。所述方法还可以与有助于将核酸导入宿主细胞的常规转染试剂联用,诸如聚阳离子多聚体(例如壳聚糖、聚甲基丙烯酸酯、PEI,等等)和阳离子脂质(例如DC-Chol/DOPE、transfectam、lipofectin,等等)。

[0173] 可以在常规发酵生物反应器、长颈瓶和陪替(petri)平皿中培养宿主细胞。可以在适合于给定宿主细胞的温度、pH和氧含量下进行培养。本文不是试图详细描述本领域可获得的用于所述目的的各种原核和真核表达系统。

[0174] 在一个优选的实施方案中,所述方法使用大肠杆菌宿主细胞,尤其是在其基因组中携带D13原噬菌体的大肠杆菌菌株,其允许利用乳糖或乳糖类似物(例如IPTG:异丙基b-D-1-硫代半乳糖苷)的T7聚合酶诱导型表达。多个制造商(例如Lucigen、Merck等等)都提供这类菌株。在导入质粒后,可以在适合于载体选择标记物(例如存在抗生素)和宿主菌株(例如存在诱导物诸如IPTG的条件下)的常规培养基中,在大约18°C至大约39°C(特别优选大约

30℃或大约37℃)的温度培养转化的大肠杆菌细胞6到48小时不等的时段(特别优选大约8到大约24小时)。回收细胞培养物并裂解(例如利用去污剂的化学裂解,超声处理,等等)。在离心细胞裂解物后,收集上清液和沉淀物进一步分析(例如通过SDS-PAGE)以评价表达水平以及表达材料的溶解性(例如,可以在细胞裂解物上清液中发现可溶性物质,而不溶性物质截留在包涵体中)。

[0175] 回收的分枝杆菌抗原或融合多肽任选地可以利用公知的纯化方法进行纯化,包括硫酸铵沉淀、酸萃取、凝胶电泳、过滤和层析法(例如反相、大小排除、离子交换、亲和、疏水相互作用、羟基磷灰石、高效液相层析法,等等)。使用的条件和技术取决于以下因素:诸如净电荷、分子量、疏水性、亲水性和本领域技术人员显而易见的那些因素。此外,纯化水平将取决于预期用途。例如蛋白浓度可以通过Bransford测定(Biorad)鉴定,内毒素水平可以通过诸如Portable Test System(Charles River Laboratories)的技术鉴定,纯化多肽的质量可以利用MALDI(基质辅助激光解吸/电离)或电喷射方法测量。

[0176] 组合物

[0177] 在另一个方面,本发明提供一种组合物,包括本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体(例如感染性病毒颗粒)或宿主细胞中的至少一种(本文中也称为“活性剂”)或其任意组合(例如不同多肽或载体/病毒颗粒的组合)。优选地,所述组合物是药物组合物,还包括治疗有效量的活性剂、一或多种药学上可接受的载体(vehicle)。

[0178] 如本文使用的,“药学上可接受的载体”旨在包括与给受试者(尤其是人)施用相容的任意和全部载体(carrier)溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂以及吸收延迟剂,等等。

[0179] 如本文使用的“治疗有效量”是足以实现预期用途的剂量。当涉及预防用途时,该术语表示足以预防或延迟分枝杆菌感染(例如Mtb感染)发生和/或定居的剂量。对于“治疗”用途,给已经感染分枝杆菌种的受试者施用组合物,目标是治疗活跃疾病或预防潜伏感染个体的再活化,最终与本文描述的一或多种常规治疗方式联用。具体来说,本发明组合物的治疗有效量可以是在施用的受试者中诱导或刺激免疫系统(例如导致先天性和/或特异性应答的产生)必需的量。

[0180] 待治疗的受试者可以是新生儿、婴儿、青年或成年人。受试者可以先前已接受过卡介苗(BCG)免疫,或用本文描述的活性剂治疗之前预先接受过针对分枝杆菌感染的治疗。它可以共感染或未共感染另一种病原有机体(例如人类免疫缺陷病毒HIV)。

[0181] 特别地,待治疗受试者被可能是抗药(例如MDR、XDR或TDR)菌株的毒性分枝杆菌种(例如Mtb)感染。感染分枝杆菌可以是与作为本发明所用活性剂包括或编码的抗原来源的任意分枝杆菌相同的菌株或分离物,或可以来自于不同的菌株或分离物。

[0182] 本发明的组合物被适当缓冲以便适合在生理或稍碱性pH(例如从大约pH 7到大约pH 9)的人或动物应用。合适的缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液(例如PBS)、碳酸氢盐缓冲液和/或Tris缓冲液。

[0183] 本发明的组合物还可以包括适合于人或动物应用的稀释剂。它优选是等渗的、低渗的或弱高渗的,并具有相对低的离子强度。典型的实例包括无菌水、生理盐水(例如氯化钠)、Ringer's溶液、葡萄糖、海藻糖或蔗糖溶液、Hank's溶液和其他水性生理平衡盐溶液(参见例如最新版Remington:The Science and Practice of Pharmacy,A.Gennaro,

Lippincott, Williams & Wilkins)。

[0184] 其他药学上可接受的赋形剂可以用于提供所希望的药物或药效特性,包括例如改变或维持制剂的pH、渗透压、黏性、澄清度、颜色、无菌性、稳定性、溶解率,改变或维持释放或吸收入人或动物有机体,促进输送穿过血液屏障或渗透入特定器官(例如肺)。

[0185] 此外,本发明的组合物可以包括适于人的全身性或粘膜应用的一或多种佐剂。优选地,所述佐剂能够刺激针对本发明组合物的免疫,尤其是T细胞介导的免疫,例如通过 toll 样受体 (TLR), 诸如 TLR-7、TLR-8 和 TLR-9。有效佐剂的典型实例包括但不限于明矾、矿物油乳液诸如弗氏完全佐剂和不完全佐剂 (IFA), 脂多糖或其衍生物 (Ribi 等, 1986, *Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419), 皂苷诸如 QS21 (WO 98/56415), 咪唑并喹啉化合物诸如咪唑莫特 (WO2007/147529), 胞嘧啶磷酸鸟苷寡聚脱氧核苷酸诸如 CpG 和阳离子肽诸如 IC-31 (Kritsch 等, 2005, *J. Chromatogr Anal. Technol Biomed Life Sci* 822:263) 或其任意衍生物。

[0186] 本发明组合物包括的药学上可接受的载体还必须允许在制备和冷冻(例如-70°C, -20°C)、冷藏(例如4°C)、环境温度的长期保存(即至少一个月,优选至少一年)条件下保持其稳定性。这类“长期”制剂是本领域已知的(例如 W098/02522; W003/053463)。可以参考 (a) 1M 蔗糖, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 54mg/l Tween 80, 10mM Tris pH 8.5, (b) 10mg/ml 甘露醇, 1mg/ml HSA, 20mM Tris, pH 7.2, 和 150mM NaCl, 以及 (c) 尤其适合于本发明组合物的生理盐水。

[0187] 本发明的组合物可以是各种形式,例如固体、液体或冷冻的。可以通过包括真空干燥和冷冻干燥的方法获得固体(例如干粉或冻干)组合物。在具体实施方案中,将本发明的组合物配制为以喷雾干燥(参见例如 W02010/135495)或液滴形式(特别优选具有 100-5000μm 平均直径的液滴)在呼吸道输送(例如通过吸入、鼻内或肺内途径)。

[0188] 本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物适合于各种施用方式。任意常规施用途径都适用于本发明背景,包括全身、局部或粘膜途径。

[0189] 全身性施用包括例如皮下、皮内、肌内、静脉内、腹腔内、血管内、动脉内注射以及破皮 (scarification)。可以利用常规注射器和针头,或本领域可用的任意其他合适装置(例如电穿孔)进行注射。粘膜施用包括但不限于口服/饮食、鼻内、气管内、肺内、叶鞘内或直肠内途径。可以通过液滴的雾化或气溶胶化、喷雾或使用合适散发器的干粉组合物进行呼吸道施用。局部施用还可以利用经皮方式(例如贴片等等)进行。在本发明的背景下尤其优选肌内、皮内和皮下途径,以及鼻内、气管内和肺内施用。

[0190] 合适剂量可以作为各种参数的函数而调整,尤其是组合物包括的活性剂、施用方式、受试者的年龄、健康和体重、症状的性质和程度、并发治疗的类型、治疗频率和/或预防或治疗的需求。确定治疗合适剂量所需的进一步精确计算通常由医师根据相关情况进行。

[0191] 作为一般性指导,包括病毒载体的组合物的适合剂量在约 10⁴ 到约 10¹³ vp (病毒颗粒)、iu (感染性单位) 或 pfu (噬斑形成单位) 之间变化,这取决于使用的载体和定量技术。可用的鉴定样品中存在的 vp、iu 和 pfu 数量的技术是本领域常规的。例如,通常通过测量 A260 吸光度或 HPLC 确定腺病毒颗粒 (vp) 的数目,通过定量 DBP 免疫荧光确定 iu 滴度,在允许细胞感染后计算噬斑数目确定 pfu。优选地, vp/iu 比例小于 100, 符合 FDA 指南。优选的剂量包含约 10⁵ 到约 10¹² vp 的腺病毒载体(例如约 5x10⁸, 约 10⁹, 约 5x10⁹, 约 10¹⁰, 约 5x10¹⁰ vp 或约

10^{11} vp)。对于基于牛痘(例如MVA)的组合物,优选的剂量是从约 5×10^5 到约 10^9 pfu,特别优选约 5×10^6 ,约 10^7 ,约 5×10^7 ,约 10^8 或约 5×10^8 pfu。对于基于麻疹的组合物,优选的剂量是约 5×10^4 到约 10^7 pfu,特别优选约 10^5 , 5×10^5 , 10^6 或 5×10^6 pfu。基于质粒载体的组合物可以以 $10 \mu\text{g}$ 到 20mg ,有利地 $100 \mu\text{g}$ 到 2mg 的剂量施用。对于组合物包括的每种分枝杆菌抗原,每kg体重施用 $10 \mu\text{g}$ 到 20mg 剂量的蛋白组合物,特别优选约 0.1mg 到约 2mg 剂量。可以采用单次剂量或某个时间间隔后的重复剂量进行施用。

[0192] 重复施用(2,3,4,5,6,7,8,9,10次等等)可以彼此相隔合适的时间段,并通过相同或不同的施用途径,在相同部位或不同部位进行。此外,每次施用可以使用相同或不同的活性剂。为了进行说明,2或3次彼此间隔大约1周(例如3到10天)的皮下施用尤其适于基于MVA的组合物,而1或2次肌肉施用尤其适于基于Ad、麻疹和质粒的组合物。在第一组引发施用后(例如6个月到数年后)可进行一或多次“回忆(recall)”施用,以便回忆起所引发的抗分枝杆菌免疫应答。还可以通过在休息期后重复的连续周期的施用(例如,每周为周期的施用)进行。

[0193] 在一个具体实施方案中,可以根据引发加强模式进行施用,该模式包括连续施用一或多种引发组合物和一或多种加强组合物。通常,引发和加强组合物使用不同的活性剂,其包括或编码至少一种共同的分枝杆菌抗原、免疫原性结构域或表位。引发和加强组合物可以在相同部位或可选部位,通过相同或不同的施用途径施用。例如,基于多肽的组合物可以通过粘膜途径施用,而基于载体的组合物优选通过例如皮下或肌肉途径注射。为了进行说明,可以预期利用活的减毒细菌(诸如BCG)引发宿主应答,并用至少一种本文所述“活性剂”(例如本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体(例如感染性病毒颗粒)或宿主细胞,或其任意组合)进行加强。

[0194] 预防和治疗用途

[0195] 本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物优选地用于预防或治疗分枝杆菌感染或由其引起或与其有关的任意疾病和病理性状况。这类用途目的在于诱导或刺激抗分枝杆菌抗原/表位的保护性免疫应答。

[0196] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物用于在需要其的受试者中预防分枝杆菌感染或延迟分枝杆菌感染风险的方法,尤其是与已患有活跃疾病的感染个体密切接触从而具有患分枝杆菌感染风险的受试者(例如通过吸入TB患者咳出的湿润液滴中的细菌)。

[0197] 在另一个实施方案中,本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物用于在感染分枝杆菌种(尤其是Mtb)的受试者中治疗活跃疾病的方法,所述方法包括给已患有活跃疾病的感染受试者施用治疗有效量的至少一种本文描述的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物,以便诱导抗感染性分枝杆菌种的免疫应答,从而延迟或降低患活跃疾病的风险。

[0198] “活跃疾病”是指具有显性严重疾病症状的分枝杆菌感染。例如,在人类受试者中,TB的特征在于通常的临床病症(诸如体重减轻、衰弱、发烧、盗汗),临床病症和/或症状(诸如肺部TB情况下的咳嗽、咯血、胸痛),和/或一些情况下根据感染部位的肺外病症(诸如淋巴结、骨形式、脑膜炎、泌尿生殖形式)。

[0199] 在另一个实施方案中,本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细

胞或组合物用于在潜伏感染分枝杆菌种(尤其是结核分枝杆菌)的受试者中预防或治疗再活化的方法,所述方法包括给所述潜伏感染的受试者施用治疗有效量的至少一种本文描述的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物,以便诱导抗感染性分枝杆菌种的免疫应答,从而预防或延迟再活化。

[0200] “潜伏感染受试者”应理解为已经感染毒性分枝杆菌种(例如Mtb),但不显示显性疾病症状或临床病症的个体。通常,潜伏感染受试者在其体内保留分枝杆菌,临床上不是生病的,但具有后续发展为临床疾病(再活化)的风险,尤其是在免疫抑制的情况下(例如共感染另一种病原体诸如HIV或正接受免疫抑制治疗诸如TNF α 抑制剂)。如果通过任意检验允许诊断为Mtb感染(例如结核菌素试验,针对PPD反应性的Mantoux试验,和/或IFN γ 释放测定),则Mtb潜伏感染受试者预期为阳性的。

[0201] 术语“再活化”是指对分枝杆菌感染检测阳性但不显示明显疾病症状的受试者中分枝杆菌相关疾病的显性疾病症状的后期显现。例如,再活化可能存在于具有或不具有先前显性活跃疾病症状的感染受试者,或已经接受治疗足以将感染变为潜伏状态的感染受试者。例如,Mtb感染受试者先前用BCG免疫,或先前对Mtb感染进行治疗(例如利用一或多种“一线”化疗药物)。

[0202] 在一个具体实施方案中,本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物用做BCG增强剂以增加接种受试者中BCG接种的效力。

[0203] 与化疗结合

[0204] 本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物可以与一或多种常规疗法联用,例如一或多种有效抗分枝杆菌感染的化疗药物。

[0205] 化疗法通常由治疗医生根据当前情况确定。这类化疗药物的实例包括但不限于本领域描述的抗生素,以及小的直接和间接抑制剂分子、抗体和免疫治疗剂。通常,当前用于治疗非抗药性Mtb感染的“一线”抗生素化疗法包括异烟肼、利福霉素(即利福平、利福喷丁和利福布汀)、乙胺丁醇、链霉素、吡嗪酰胺和氟喹诺酮类。用于治疗对一或多种“一线”疗法显示抗药性的Mtb感染的“二线”化疗法包括氧氟沙星、环丙沙星、乙硫异烟胺、氨基水杨酸、环丝氨酸、氨丁卡霉素、卡那霉素和卷曲霉素。一或多种化疗剂通常在合适的时间段内施用,例如,1或数月(例如1,2,3,4,5,6,9或12个月)或更长。在6到12个月的时段内每天施用200到600mg剂量(例如300或400mg)是合适的。

[0206] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物用于缩短抗分枝杆菌(例如Mtb)感染的化疗时程。通常,施用本文描述的活性剂将允许增强化疗效力(例如降低临床病症的持续时间和/或严重性,改善痰菌阴转率,等等),减少化疗长度和/或所用化疗药物的种类,尤其当感染的分枝杆菌具有抗药性时。

[0207] 根据本发明,可以在施用一或多种化疗药物之前、同时或之后施用本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物。在一个实施方案中,在开始化疗施用至少2周后施用本文描述的活性剂。

[0208] 在一个优选的实施方案中,本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物用于诱导或增强所施用受试者中的免疫应答。相应地,本发明还包括一种通过给受试者施用本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物诱导或刺激抗分枝杆菌抗原的免疫应答的方法。

[0209] 诱导或刺激的免疫应答可以是特异性的(即针对分枝杆菌表位/抗原)和/或非特异性的(先天的),体液和/或细胞的。在本发明的上下文中,免疫应答优选是针对分枝杆菌抗原/表位的CD4⁺或CD8⁺介导的T细胞应答或上述两者。

[0210] 利用本领域标准的各种直接或间接测定,可以在体外或体内鉴定本文所述活性剂诱导或刺激免疫应答的能力。检验和证实还在所附实施例部分显示。

[0211] 例如,可以通过测量NK/NKT细胞(例如活化的代表性和水平),以及IFN相关细胞因子和/或趋化因子产生级联,TLRs和其他先天免疫标记物的活化(例如Riano等,2012, Tuberculosis 92:148-59)进行非特异性免疫的诱导。

[0212] 刺激体液应答的能力可以通过抗体滴度的增加来确定,所述抗体滴度对本文所述免疫原性组合和融合多肽包括或编码的至少一种抗原特异。示例性的技术包括但不限于抗体结合、结合竞争以及ELISA和蛋白印迹。

[0213] 对细胞免疫的评价可以通过例如免疫细胞(诸如对本文所述免疫原性组合和融合多肽包括或编码的至少一种分枝杆菌抗原特异的T淋巴细胞)频率增加来估算。还可以通过放射性标记监测细胞增殖(例如通过³H胸苷掺入测定的T细胞增殖测定)。另一种用于检测免疫应答的灵敏方法是ELISpot,其中测定产生IFN γ 的细胞的频率。还可以在致敏受试者中或通过合适动物模型的免疫评价抗原特异性T淋巴细胞的细胞毒能力。还可以使用常规生物测定(例如通过多参数流式细胞术(ICS),通过利用多重技术或ELISA的细胞因子谱分析(cytokine profile analysis),等等),通过定量活化T细胞产生的相关Th1和/或Th2细胞因子的释放来实现。还可以使用PCR技术确定编码相关细胞因子的mRNA的存在。技术人员将理解,这类相关细胞因子数量的增加或降低可用于评价一或多种本文所述活性剂的免疫原性。

[0214] 最后,可以在合适的实验动物体内鉴定保护性免疫应答,例如小鼠、大鼠或豚鼠(参见Ashwin等,2008, Am J Resp, 39:503-8; Acosta等,2011, Malays J Med, 18:5-12),例如通过与感染相同分枝杆菌毒性株但没有事前免疫的实验动物的对照组分枝杆菌cfu相比,测量从动物分离的脾、肺或其他组织匀浆物的分枝杆菌集落形成单位(cfu)的降低,所述动物先用本文所述的一或多种活性剂免疫,然后接受分枝杆菌种(例如Mtb)的毒性株攻击感染。治疗组和未治疗组的比较还可以针对动物存活率(治疗组存活率的增加与保护性免疫应答有关)进行评价。

[0215] 这类免疫读数与本文所述活性剂提供的抗分枝杆菌感染的保护性免疫应答紧密相关。

[0216] 还可以通过根据本文描述的方式给人类受试者施用,相对于基线状态或如果不治疗的预期状态,估算本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物提供的保护性应答。保护性应答可以被医生或其他熟练医疗人员经常使用的任意相关临床测量值证实:

[0217] -在指定国家的指定群体(诸如中国人群体或移居者群体)中疾病发病率和/或传播和/或频率的下降(例如,在已经接受本文所述活性剂的组中,较低比例的已经确诊患有分枝杆菌感染或具有患分枝杆菌感染或与分枝杆菌感染有关的疾病的新个体);

[0218] -治疗受试者组中更高百分比的痰菌阴转率;

[0219] -治疗受试者组中更高百分比的活跃疾病治愈;

[0220] -在密切接触感染受试者后分枝杆菌传播程度的降低(例如,降低或延迟被感染的风险或患活跃疾病的风险,和/或降低或延迟潜伏感染受试者再活化的风险);

[0221] -疾病状态的改善(例如靶组织或生物样本中细菌cfu的降低;疾病症状或其严重性(例如靶器官中损伤的数量和/或严重性)的减轻或稳定的(未恶化)疾病状态);和

[0222] -接受治疗的受试者对同期治疗的应答改善(常规化疗药物的需求、数量、持续时间和/或剂量的降低)。

[0223] 在本发明的上下文中,保护性应答可以是短暂的(施用终止后数周)或持续的(数月或数年)。因为临床状况的天然过程在受试者之间可能显著不同,不需要在每个接受治疗的受试者中观察到保护性应答,只需要在众多受试者中观察到(例如可以通过本领域已知的任意统计检验确定两组之间统计上的显著差异,诸如Tukey参数检验、Kruskal-Wallis检验、根据Mann和Whitney的U检验、Student's t-检验、Wilcoxon检验,等等)。

[0224] 这类测量可以在施用本文所述活性剂之前(基线)、在治疗期间的各个时间点以及在治疗终止后至少数周(例如12周)进行。

[0225] 作为总体指导,可以通过各种方式检测分枝杆菌感染和相关疾病。例如,如今还可以通过临床使用的大量方法确定Mtb感染,诸如Mantoux结核菌素皮试(TST)、Quantiferon检验以及对HBHA(肝素结合血细胞凝集素;Hougardy等,2007;PLos One 2(10):e926)应答的体外检测,或用ESAT6、CFP10和TB7.7体外刺激后的IP10检测(Ruhwald等,2008;Microbes Infect9:806-12)。根据现行办法可以诊断患有活跃疾病的受试者。为了进行说明,TB诊断基于通过显微镜检术、培养技术、聚合酶链式反应(PCR)及其各种衍生方法检测临床样本中的致病细菌。还可以实施DNA指纹法和间隔区寡核苷酸分型(spoligotyping)。分枝杆菌培养是用于鉴定结核复合物分枝杆菌的分离物和药物易感性测试的金标准方法。还可以实施X射线技术和临床观察,以支持活跃肺部和/或肺外疾病的发现。另一方面,已经开发出许多使用各种抗原来检测循环抗体的血清学测定法来诊断Mtb感染,包括补体结合试验、血细胞凝集试验、放射免疫测定和酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0226] 抗体

[0227] 在另一个方面,本发明涉及一种抗体,其选择性结合本发明的免疫原性组合或融合多肽包括或编码的至少一种分枝杆菌抗原。

[0228] 如本文使用的,“抗体”包括任意多肽,其包括抗原结合片段或抗原结合结构域,并选择性结合靶蛋白,其结合靶蛋白并且不显著结合无关蛋白。在某些情况下,应理解尽管存在一些程度的交叉反应性,结合靶蛋白的抗体仍然是选择性的。通常,当结合常数 K_A 大于 10^{-6} M时,抗体与抗原间的结合被认为是特异性的。合适的结合条件,诸如抗体浓度、溶液的离子强度、温度、允许结合的时间、阻断剂(例如,血清白蛋白、乳酪蛋白)的浓度等等,可以由技术人员使用常规技术进行优化。

[0229] 本发明的抗体可以是多克隆、单克隆、单特异性、多特异性、人源、人源化、单链、嵌合、合成、重组抗体,以及保持抗原结合的这类抗体的任意片段,包括但不限于,Fab、F(ab')₂、Fv和scFv片段。

[0230] 本发明的抗体可以使用本领域常规技术产生,例如给动物(例如兔、马,等等)施用有效量的本文描述的任意分枝杆菌抗原、融合蛋白和/或其肽片段后,通过展示技术(例如噬菌体、酵母或核糖体展示)或杂交瘤技术。用于制备单克隆抗体的常规方法是本领域公知

的。

[0231] 本发明的抗体可以以分离形式、于溶液中(例如动物抗血清)或宿主细胞中(例如杂交瘤)提供。此外,它可以缀合合适的标记(可检测的或功能标记),包括放射性标记(^{131}I , 或 ^{99}Tc , 等等)、酶标记(辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶, 等等)和化学标记(例如生物素, 等等)。

[0232] 本发明的抗体具有属于本发明范围的各种潜在用途。例如,这类抗体可以用作(a)检测本发明所用分枝杆菌抗原的测定中的试剂,(b)检测生物样本中分枝杆菌存在的测定中的试剂,和/或(c)根据本发明的方法从蛋白和其他污染物的混合物检测和/或回收重组产生的分枝杆菌抗原和融合多肽(例如从培养的宿主细胞通过亲和层析或免疫沉淀进行纯化)的工具。它们还可以用于治疗目的,例如治疗接触分枝杆菌后的受试者(例如被动免疫疗法)。

[0233] 在一个实施方案中,本发明涉及一种使用本发明的抗体,在从已感染或易感染分枝杆菌的受试者获取的生物学样品(例如血浆、血清、唾液, 等等)中检测和/或定量分枝杆菌抗原的方法,包括以下步骤:在允许分枝杆菌抗原和抗体试剂形成复合物的条件下将所述生物学样品与作为试剂的本发明抗体接触,并通过任意适当方式检测和/或定量所述复合物的形成。检测到靶分枝杆菌抗原的存在提示分枝杆菌感染(例如Mtb)。

[0234] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种检测和/或定量生物学样品(例如从已感染或易感染分枝杆菌的受试者获取的血浆、血清, 等等)中针对分枝杆菌的抗体的方法,包括以下步骤:在允许抗体和任意上述试剂包括或编码的分枝杆菌抗原/表位之间形成复合物的条件下,将所述生物学样品与包括本发明的任意免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、感染性病毒颗粒、宿主细胞的试剂接触,并通过任意适当方式检测和/或定量所述复合物的形成。检测到特异性抗体的存在提示分枝杆菌感染(例如Mtb)。

[0235] 本领域技术人员能够容易地确定本发明方法中使用的试剂数量。检测和/或定量抗原/抗体复合物的方式是常规的,并且是本领域技术人员公知的。为了说明,可以提及印迹、ELISA、所谓的夹心技术、竞争技术和PCR技术,尤其是所谓的“实时”技术。通过与可检测的物质偶联(即,物理连接),有利于上述试剂的使用。可检测物质的实例包括各种酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶)、辅基(例如链霉亲和素/生物素,或亲和素/生物素)、荧光材料(例如伞形酮、荧光素或荧光素衍生物)、发光材料、生物发光材料(例如荧光素酶、荧光素或水母发光蛋白)和放射性材料(例如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H)。

[0236] 本发明还涉及用于诊断分枝杆菌(例如Mtb)感染的试剂的试剂盒,对于抗原测定其包括本发明的抗体,对于抗体测定其包括本发明的免疫原性组合、融合多肽、核酸分子、载体、宿主细胞、组合物。

[0237] 所有上述引用的专利、出版物和数据库条目的内容通过整体引用具体引入本文,就如同每种所述单独的专利、出版物或者条目是具体和单独的指定通过引用引入。

附图说明

[0238] 图1显示Mtb抗原各种融合多肽(如所附实施例部分的描述进行产生和使用)的图示。“SS”表示信号肽,“TM”表示跨膜结构域,“F”表示Flag标签,“M”表示Myc标签,“H”表示组氨酸标签。A*表示相对于天然对应物的Mtb抗原修饰。该图还显示融合多肽的 n° 以及下文所

用表达质粒载体 (pTGXXXXX) 参考号码。

[0239] 图2通过蛋白印迹随后用特异性抗体免疫检测显示单个Mtb基因的表达。通过Lipofectamine 2000用5 μ g DNA转染2 \times 10⁶个HEK293细胞。转染后18h向培养基添加蛋白酶体抑制剂MG132。通过10%凝胶标准的电泳分析培养48h后收集的细胞裂解物,并用1/1000稀释的识别Rv2029c* (图2A)、RPFb-Dhyb (图2B)的兔抗血清和识别ESAT-6 (图2C)和Rv2626 (图2D)的商品化抗体进行免疫检测。

[0240] 图3显示包括潜伏期抗原 (pTG18295编码融合物n°9)、活跃期抗原 (pTG18296编码融合物n°10)、复苏期抗原 (pTG18307编码融合物n°12)以及复苏期和活跃期抗原两者 (pTG18297编码融合物n°11)的Mtb融合物的蛋白印迹分析,随后用抗Flag免疫检测。+/-表示含有和不含有MG132。

[0241] 图4显示分别包括TB10.4 (图4A)、Rv0569 (图4B)和Rv2626 (图4C)的Mtb融合物的蛋白印迹分析,随后利用商品化抗TB10.4抗体 (ABIN361292)、抗Rv0569兔抗血清和抗Rv2626小鼠单克隆抗体26A11免疫检测。

[0242] 图5显示融合物编码质粒pTG18266 (SS-Ag85B-TB10.4-ESAT6-TM;图5A)、pTG18296 (细胞质Ag85B-TB10.4-ESAT6;图5B)、编码单个Ag85B、TB10.4和ESAT6抗原的pTG18310、pTG18315和pTG18308质粒的混合物 (图5C)和pGWiz (图5D)免疫动物后诱导的产生IFN γ 的细胞。用特定肽库体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0243] 图6显示用编码融合物的质粒pTG18268 (SS-RPFb-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6-TM,图6A)、pTG18297 (细胞质RPFb-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6;图6B)、编码单个RPFb-Dhyb、Ag85B、TB10.4和ESAT6抗原的pTG18307、pTG18310、pTG18315和pTG18308质粒混合物 (图6C)和pGWiz (图6D)免疫动物后诱导的产生IFN γ 的细胞。用特定肽库体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0244] 图7显示用编码融合物的质粒pTG18267 (SS-RPFb-TM;图7A)、pTG18307 (细胞质RPFb-Dhyb;图7B)和pGWiz (图7C)免疫动物后诱导的产生IFN γ 的细胞。用覆盖RpfB和RpfD抗原的特定肽库体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0245] 图8显示用编码融合物的质粒pTG18269 (SS-Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TM;图8A)、pTG18295 (细胞质Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807;图8B)、编码单个Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478和Rv1807抗原的pTG18301、pTG18303、pTG18300、pTG18304和pTG18302质粒的混合物 (图8C)和pGWiz (图8D)免疫动物后诱导的产生IFN γ 的细胞。用特定肽库体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0246] 图9显示纯化的Rv2626 (图9A)、RPFb-Dhyb融合物 (图9B)和TB10.4 (图9C)的SDS-PAGE分析。

[0247] 图10显示用编码融合物的质粒pTG18323 (Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111;图10a)或pGWiz (图10b)免疫动物后产生的细胞免疫应答。用特定肽库体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定产生IFN γ 的细胞。每条代表1只小鼠的应答 (7只小鼠/组)。

[0248] 图11显示用(a) MVATG18365 (Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111+RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6W/O SS/TM) 或(b) MVATG18364 (Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111+RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6) 免疫小鼠后诱导的细胞免疫应答。用特定肽库体外再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在MVA注射后1周鉴定产生IFN γ 的细胞。每条代表单个小鼠的应答(5只小鼠/组)。

[0249] 图12概述用所有MVA候选物(根据TB疾病期或生化基本原理产生)接种的BALB/c小鼠中IFN γ 应答水平。用14种Mtb抗原的特定肽库体外再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在MVA注射后1周鉴定产生IFN γ 的细胞。根据每次再刺激的中值(噬斑/ 10^6 个脾细胞)相对于截断值的倍数增加将检测的应答强度排列,使用颜色代码(参见图例,包括-,+,++,+++)。阴影框表示该抗原在指定MVA疫苗中缺失。

[0250] 图13显示用(a) MVATG18376 (Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111+RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6 +Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807) 或(b) 空MVATGN33.1免疫转基因HLA-A2小鼠后诱导的细胞免疫应答。用特定肽库体外再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在MVA注射后1周鉴定产生IFN γ 的细胞。每条代表单个小鼠的应答(6只小鼠/组)。

[0251] 图14显示用(a) MVATG18377 (Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111+RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6 W/O SS/TM +Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807) 或(b) 空MVATGN33.1免疫C3H/HeN小鼠后诱导的细胞免疫应答。用特定肽库体外再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在MVA注射后1周鉴定产生IFN γ 的细胞。每条代表单个小鼠的应答(6只小鼠/组)。

[0252] 图15概述用指定MVA候选物接种的转基因HLA-A2、C57BL/6和C3H/HeN小鼠的IFN γ 应答水平。用14种Mtb抗原的特定肽库体外再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在MVA注射后1周鉴定产生IFN γ 的细胞。根据每次再刺激的中值(噬斑/ 10^6 个脾细胞)相对于截断值的倍数增加将检测的应答强度排列,使用颜色代码(参见图例,包括-,+,++,+++)。阴影框表示该抗原在指定MVA疫苗中缺失。

[0253] 材料和方法

[0254] 分析方法

[0255] 研究来自当前文献和数据库有关Mtb抗原的现有数据,目标是鉴定Mtb基因/抗原的第一选择,其可用作能够在天然感染过程的所有期中激发抗TB免疫的免疫治疗性疫苗。

[0256] 然后将选择的抗原呈送数据采掘评分系统,所述系统用于转录和比较不同来源的数据。产生全部终“值”来反映每种抗原的值。该分数考虑了抗原的免疫原性潜能以及其在动物模型和人中预防感染性攻击的能力(例如,对人的预防数据比在动物模型中诱导免疫原性分数更高)。一旦收集了特定抗原的全部数据,对每种类型进行0到5的分级,0是最坏可能的级别而5是最好的。分级的选择还基于数据质量(例如,用于实验的正确对照,严格的解释),并且还基于数据强壮性(例如运行实验的次数,证实/支持发现的出版物数量)。

[0257] 抗原生化计算机分析

[0258] 生化和生物学数据也是优化表达和融合设计(允许预期潜在的表达问题)的关键数据。例如,蛋白的生物学功能可能产生潜在毒性,导致在载体介导的表达时的遗传不稳定性 and/或安全性概貌。此外,因为更高的细胞降解速率,蛋白未折叠可能影响稳定性和表达水平

[0259] 对于全部Mtb抗原进行广泛的文献检索以便更好的了解并表征这些蛋白的结构和功能。

[0260] 此外,还进行生化和生物信息学预测以表征Mtb抗原。使用生物信息学预测工具(Nielsen等,2007PLos One 2:e796;Nielsen等,2008,PLoS Comput Biol 4:e1000107)来检查I类和II类HLA分子的预测表位。这些表位区域的鉴定可用于优化选择的Mtb抗原,或促进基于免疫的测定的开发。

[0261] 此外,进行广泛的计算机结构预测分析,以便预测生化特性和/或生物学功能,从而允许Mtb抗原选择和设计(例如,是否有可能表达全长的天然形式,或看起来是否需要修饰)。

[0262] 更具体地

[0263] -在蛋白数据库(PDB)中查找结构同源物。使用的程序是利用缺省参数的BLASTP,所选数据库是NPS@3D SEQUENCES(来自PDB)。该检索允许发现抗原或序列同源性高于25%的蛋白的NMR或晶体结构。利用CN3D 4.1.或PDB Viewer显示3D结构。

[0264] -在UNIPROT-SWISSPROT和TB数据库中检索。使用一级结构作为查询入口,在UNIPROT-SWISSPROT数据库中检索感兴趣的Mtb抗原的蛋白同源物,并在NPS@中进行BLAST检索。使用的程序是利用缺省参数的BLASTP,所选数据库是UNIPROT-SWISSPROT;UNIPROT-SWISSPROT条目给出关于蛋白功能、结构域、可能的信号肽、翻译后修饰以及参考文献的一般信息。利用Rv蛋白名称作为查询入口在TB数据库中检索关于所选Mtb抗原的一般信息(例如基因功能、基因间的遗传联系、与基因有关的表型和突变、免疫原性以及参考文献)。

[0265] -信号肽的预测:这些短的N末端序列经常被预测为跨膜结构域,但不存在于天然和成熟的蛋白中。注意到在UNIPROT-SWISSPROT中有某些抗原的信号肽,或使用信号v3.0算法的隐马尔可夫模型。

[0266] 如果同源检索没有结果,实施额外的检索:

[0267] -使用3种不同程序(例如Dense Alignment Surface(DAS)方法,Algorithm TMHMM和TopPred0.01)预测潜在的跨膜结构域(TM)。我们观察到,这种疏水TM结构域的存在可能破坏对应抗原的遗传稳定性(当在病毒载体诸如MVA中表达时)。

[0268] -使用PROSITE SCAN寻找与蛋白结构域、家族和功能位点有关的蛋白基序

[0269] -使用数种预测方法(即:SOPM、MLRC、HNN、DSC、PHD、PREDATOR)预测二级结构。如果使用6种方法预测到它,则二级结构被认为是具有高度可能的。如果6种方法中有3种预测到它,则二级结构被认为是可能的。

[0270] -疏水簇分析(HCA)。HCA方法基于蛋白折叠的基本特征:亲水/疏水二分法和蛋白球状结构域的疏水紧性(compactness)。使用HCA曲线鉴定沿着蛋白序列的疏水簇。这些簇是具有疏水包埋核的折叠蛋白的特征。如果在蛋白的至少一些部分中存在疏水簇,则抗原被认为可能具有折叠状态。

[0271] -天然无序区的预测(MetaPrDOS预测),其允许鉴定未折叠区域。该分析通过预测未折叠的蛋白区域来弥补HCA曲线。高于阈值0.5(无序倾向)的所有区域被认为是蛋白的未折叠部分。应注意大部分时候,蛋白的N末端和C末端部分在它们的天然状态下是非折叠的。如果存在末端的这种序列段并且小于10个残基,它们可作为用于融合的潜在接头。

[0272] -卷曲螺旋的预测(使用COILS程序)。抗原的寡聚状态可能影响抗原融合物设计。

如果利用至少14个残基窗口分析对于蛋白的一部分输出概率展示值为1,则预测为卷曲螺旋结构域。

[0273] 此外,进行序列比对以验证选择的Mtb抗原在不同的Mtb菌株和分离物之间是保守的。更确切地说,使用每种选择的抗原(示例性Mtb抗原来源于H37Rv菌株)和它们的11种其他Mtb菌株(临床分离物)的等同物和已经在蛋白数据库中鉴定(BLASTP检索)的牛分枝杆菌的氨基酸序列的Clustal W2 (@.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)进行多重序列比对。结果是,TB抗原在分析的12种分枝杆菌菌株中显示高度保守性,相同性百分比的范围是100%到96%(取决于抗原和分枝杆菌菌株)。主要例外是Rv3478,其与H37Rv和CDC1551序列之间只有88%的相同性。

[0274] 最后,实现最终TB抗原选择的另一个主要标准是确保均衡代表来自各感染期的抗原。例如,选择一些潜伏期抗原,尽管其最终数据采掘分数要低于大部分活跃期抗原。

[0275] Mtb抗原融合物的构建

[0276] 如图1所示,构建12种Mtb抗原融合物。5种融合物是基于生化理论设计的(融合物3,5,6,8和14),而融合物2,4和13是相对于疾病的TB期设计的,融合物2包含活跃抗原,融合物4包含活跃和复苏抗原,融合物13由潜伏抗原组成。为了便于检测各种基因融合物并避免对每种Mtb抗原都需要特异性抗体,在每种融合物中添加标签序列,分别是N末端Flag标签(DYKDDDDK;SEQ ID NO:25),C末端c-myc(EQKLISEEDL;SEQ ID NO:26)和His(HHHHHH;SEQ ID NO:27)标签。

[0277] 另一方面,分别在Mtb融合蛋白的N末端和C末端添加信号肽(也称为信号序列或SS)和膜锚定肽(也称为跨膜或TM肽/结构域)以确保锚定在细胞表面,在某些情况下这被认为优化免疫原性。但是,以Rv0111或Rv1733c结尾的融合物不必添加TM结构域,因为这些蛋白已经包含膜锚定肽。为了比较目的,还构建了不含任何信号序列(SS)和TM结构域的4种融合物,以研究细胞定位(存在SS和TM肽条件下的膜呈递相对于没有这些肽条件下的细胞质定位)对表达水平和免疫原性的影响。例如,pTG18269编码与pTG18295相同的Mtb抗原(Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807),除了pTG18269编码的融合物在其N末端具备SS以及在其C末端Myc和His标签之间具备TM,而pTG18295编码的融合物不含这种SS和TM肽。

[0278] 编码不同Mtb抗原和融合物的合成基因由Genart (Regensburg, Germany)合成。所述序列针对人密码子使用而优化,并在ATG起始密码子之前添加Kozak序列(ACC)。此外排除一些基序:TTTTNT,GGGGG,CCCCC,其不利于在痘病毒载体中的表达,和AAAGGG,AAAAGG,GGGAAA,GGGAA,(和互补序列TTCCCC,TTTCCC,CCTTTT,CCCCTT),其不利于在其他一些载体中的表达。

[0279] 将融合物克隆入用NotI和BamH消化的pGWiz质粒(Gelantis)。该质粒包含修饰的CMV启动子,然后是来自CMV即时早期基因的内含子A,和高效人工转录终止子。

[0280] pTG18266(融合物n°2)的构建

[0281] 融合物n°2的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:28。氨基酸1到23对应于在狂犬病病毒ERA菌株的糖蛋白前体N末端存在的信号肽(描述于Genbank n°M38452),氨基酸24到31对应于Flag标签,氨基酸32到317对应于Ag85B*,氨基酸318到412对应于TB10.4,氨基酸413到506对应于ESAT6,氨基酸507到516对应于c-myc标签,1个丝氨酸接头,氨基酸518到583对应于来源于ERA菌株的狂犬病糖蛋白的膜锚定肽,氨基酸584到589对应于His标签。如SEQ ID

NO:40所示的融合物n°2编码核苷酸序列通过合成方式产生,将合成基因克隆入NotI和BamH1酶切的pGWiz得到pTG18266。

[0282] pTG18267(融合物n°3)的构建

[0283] 融合物n°3的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:30。氨基酸1到23对应于狂犬病病毒PG菌株的糖蛋白前体N末端存在的信号肽(描述于Genbank n°ay009097和W02008/138649的SEQ ID NO:2),氨基酸24到31对应于Flag标签,氨基酸32到380对应于RPFB-Dhyb*,氨基酸381到390对应于c-myc标签,1个丝氨酸接头,氨基酸392到457对应于来源于PG菌株狂犬病糖蛋白的膜锚定肽(W02008/138649的SEQ ID NO:3),氨基酸458到463对应于His标签。如SEQ ID NO:42所示的融合物n°3编码核苷酸序列通过合成方式产生,将合成基因克隆入NotI和BamH1酶切的pGWiz以得到pTG18267。

[0284] pTG18268(融合物n°4)的构建

[0285] 融合物n°4的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:32。氨基酸1到23对应于狂犬病病毒PG菌株的糖蛋白前体N末端存在的信号肽(描述于Genbank n°ay009097),氨基酸24到31对应于Flag标签,氨基酸32到380对应于RPFB-Dhyb*,氨基酸381到666对应于Ag85B*,氨基酸667到761对应于TB10.4,氨基酸762到855对应于ESAT6,氨基酸856到865对应于c-myc标签,1个丝氨酸接头,氨基酸867到932对应于来源于PG菌株的狂犬病糖蛋白的膜锚定肽,氨基酸933到938对应于His标签。如SEQ ID NO:44所示的融合物n°4编码核苷酸序列通过合成方式产生,将合成基因克隆入NotI和BamH1酶切的pGWiz以得到pTG18268。

[0286] pTG18269(融合物n°5)的构建

[0287] 融合物n°5的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:34。氨基酸1到23对应于狂犬病病毒ERA菌株的糖蛋白前体N末端存在的信号肽(描述于Genbank n°M38452),氨基酸24到31对应于Flag标签,氨基酸32到118对应于Rv0569,氨基酸119到227对应于Rv1813*,氨基酸228到325对应于Rv3407,氨基酸326到717对应于Rv3478,氨基酸718到1115对应于Rv1807,氨基酸1116到1125对应于c-myc标签,1个丝氨酸接头,氨基酸1127到1192对应于来源于PG菌株的狂犬病糖蛋白的膜锚定肽(W02008/138649的SEQ ID NO:3),氨基酸843到848对应于His标签。如SEQ ID NO:46所示的融合物n°5编码核苷酸序列通过合成方式产生,将合成基因克隆入NotI和BamH1酶切的pGWiz以得到pTG18269。

[0288] pTG18270(融合物n°6)的构建

[0289] 融合物n°6的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:36。氨基酸1到23对应于狂犬病病毒ERA菌株的糖蛋白前体N末端存在的信号肽(描述于Genbank n°M38452),氨基酸24到31对应于Flag标签,氨基酸32到317对应于Ag85B*,氨基酸318到459对应于Rv2626,氨基酸460到808对应于RPFB-Dhyb*,氨基酸809到956对应于Rv1733c*,氨基酸957到966对应于c-myc标签,1个丝氨酸接头,氨基酸968到973对应于His标签。如SEQ ID NO:48所示的融合物n°6编码核苷酸序列通过合成方式产生,将合成基因克隆入NotI和BamH1酶切的pGWiz以得到pTG18270。

[0290] pTG18272(融合物n°8)的构建

[0291] 融合物n°8的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:37。氨基酸1到23对应于狂犬病病毒ERA菌株的糖蛋白前体N末端存在的信号肽(描述于Genbank n°M38452),氨基酸24到31对应于Flag标签,氨基酸32到317对应于Ag85B*,氨基酸318到459对应于Rv2626,氨基酸460到

607对应于Rv1733c*,氨基酸608到617对应于c-myc标签,1个丝氨酸接头,氨基酸619到624对应于His标签。如SEQ ID NO:49所示的融合物n°8编码核苷酸序列通过合成方式产生,将合成基因克隆入NotI和BamHI酶切的pGWiz以得到pTG18272。

[0292] pTG18323(融合物n°13)的构建

[0293] 融合物n°13的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:38。氨基酸1到28对应于麻疹病毒的F蛋白N末端存在的信号肽(Hallé菌株,描述于Genbank n°X05597-1),氨基酸29到36对应于Flag标签,氨基酸37到349对应于Rv2029c*,氨基酸350到491对应于Rv2626,氨基酸492到639对应于Rv1733c*,氨基酸640到932对应于Rv0111*,氨基酸933到942对应于c-myc标签,1个丝氨酸接头,氨基酸944到949对应于His标签。如SEQ ID NO:50所示的融合物n°13编码核苷酸序列通过合成方式产生,将合成基因克隆入NotI和BamHI酶切的pGWiz以得到pTG18323。

[0294] pTG18324(融合物n°14)的构建

[0295] 融合物n°14的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:39。氨基酸1到28对应于麻疹病毒的F蛋白N末端存在的信号肽(Hallé菌株,描述于Genbank n°X05597-1),氨基酸29到36对应于Flag标签,氨基酸37到349对应于Rv2029c*,氨基酸350到444对应于TB10.4,氨基酸445到538对应于ESAT6,氨基酸539到831对应于Rv0111*,氨基酸832到841对应于c-myc标签,1个丝氨酸接头,氨基酸843到848对应于His标签。如SEQ ID NO:51所示的融合物n°14编码核苷酸序列通过合成方式产生,将合成基因克隆入NotI和BamHI酶切的pGWiz以得到pTG18324。

[0296] 融合物9-12的构建

[0297] 使用合适的引物对通过定向诱变(Quick Change定点诱变试剂盒,Stratagene)从质粒pTG18267、pTG18269、pTG18266和pTG18268去除靶向序列,OTG20188(CGCGCCGCACCATGGATTACAAGGATGACGACG;SEQ ID NO:52)和OTG20189(CGTCGTCATCCTTGTAATCCATGGTGC GGCCGCG;SEQ ID NO:53)用于去除信号肽序列,OTG20190(CATCTCAGAAGAGGATCTG-CATCATCATCATCATCATTG;SEQ ID NO:54)和OTG20191(CAATGATGATGATGATGATGATGCAGATCCTCTTCTGAGATG;SEQ ID NO:55)用于去除TM序列。所获质粒是pTG18307(融合物n°12=细胞质融合物n°3),pTG18295(融合物n°9=细胞质融合物n°5),pTG18296(融合物n°10=细胞质融合物n°2)和pTG18297(融合物n°11=细胞质融合物n°4),分别对应核苷酸序列SEQ ID NO:43,47,41和45编码的氨基酸序列SEQ ID NO:31,35,29和33。

[0298] 单个Mtb基因表达质粒的构建

[0299] 将通过NheI限制性酶切位点分离的Flag序列和c-myc-His序列引入pGWiz质粒的CMV启动子下游。由Genart合成包含CMV启动子末端、Flag和c-myc-His序列的合成DNA片段,并插入质粒FLAG_TAG_1。该质粒经PvuII和BglIII消化,所获片段插入用相同酶消化的pGWiz,产生pTG18282。然后通过PCR从pTG18269扩增单个Rv3407、Rv0569、Rv1807、Rv1813*、Rv3478和Rv2626基因,除了Rv2626之外(其使用pTG18323作为模板)。

[0300] 用于分离每种TB基因的扩增引物对显示于表1。

[0301] 表1:

TB 基因	引物名称	引物序列
Rv3407	OTG20232 SEQ ID NO: 56	GATGACGACGATAAGGCTAGCAGAGCCACCGTGGGACTGG
	OTG20233 SEQ ID NO 57	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCCTGTTTCATCCCGCATCTCGT
Rv0569	OTG20234 SEQ ID NO: 58	GATGACGACGATAAGGCTAGCAAGGCCAAAGTCGGCG
	OTG20235 SEQ ID NO: 59	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCTGTTCTCTGGCGTGC
Rv1807	OTG20236 SEQ ID NO: 60	GATGACGACGATAAGGCTAGCGATTTTGCCACCCTCCCACC
	OTG20237 SEQ ID NO: 61	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGCCAGCTGCAGGAGGTCTG G
Rv1813*	OTG20238 SEQ ID NO: 62	GATGACGACGATAAGGCTAGCGCCAACGGCAGCATGAGCG
	OTG20239 SEQ ID NO: 63	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGTTGCAGGCCAGTTCACG A
Rv3478	OTG20240 SEQ ID NO: 64	GATGACGACGATAAGGCTAGCGTGGACTTCGGCGCCCTGC
	OTG20241 SEQ ID NO: 65	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGCCAGCGGCTGGAGTCTG G
Rv2626	OTG20242 SEQ ID NO: 66	GATGACGACGATAAGGCTAGCACAACCGCCAGAGACATCATG
	OTG20243 SEQ ID NO: 67	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCAGAGGCCAGGGCCATGGGG

[0302] 利用“*In fusion Advantage*”PCR克隆方法(Clontech)将所获扩增子克隆入由NheI线性化的pTG18282中。这允许标签序列与Mtb基因的融合。产生的质粒分别被命名为pTG18300 (Rv3407)、pTG18301 (Rv0569)、pTG18302 (Rv1807)、pTG18303 (Rv1813*)、pTG18304 (Rv3478)和pTG18305 (Rv2626)。

[0303] 包含ESAT6、Rv1733c*、Ag85B*、TB10-4、Rv0111*和Rv2029c*的表达盒(其在5'融合Flag和在3'融合c-myc-His序列)的6种质粒由Genart合成,并插入pGWiz。它们分别被命名为pTG18308 (ESAT6)、pTG18309 (Rv1733c*)、pTG18310 (Ag85B*)、pTG18315 (TB10.4)、pTG18329 (Rv0111*)、pTG18317 (Rv2029c*)。因为Rv1733c*和Rv0111*蛋白包含TM结构域,将狂犬病病毒ERA菌株的糖蛋白前体N末端存在的信号肽融合到Flag序列上游以避免表达问

题。

[0305] 无论是编码单个或融合的Mtb基因,用于免疫的质粒都在无内毒素条件下产生。

[0306] 重组MVA的构建

[0307] 标签序列的去除

[0308] 从Mtb抗原融合物去除标签序列以避免它们存在于MVA载体中。使用QuikChange定点诱变试剂盒(Stratagene)和如下面表2所示的合适引物对,通过定向诱变去除位于Mtb融合物盒内部的标签序列(即存在于信号肽和Mtb融合物的第一个氨基酸之间的Flag,以及存在于Mtb融合物的最后一个氨基酸和膜锚定肽之间的c-myc标签)。使用允许在融合物两端添加起始密码子Met和终止密码子的引物,通过PCR去除位于Mtb融合物盒之外的标签序列(针对细胞质融合物和His标签)。

[0309] 表2

融合物	用于去除 Flag 的引物对	用于去除 c-myc 的引物对	所获质粒
4	OTG20313 (SEQ ID NO:68) OTG20314 (SEQ ID NO: 69)	OTG20315 (SEQ ID NO: 70) OTG20316 (SEQ ID NO: 71)	pTG18339
5	OTG20317 (SEQ ID NO: 72) OTG20318 (SEQ ID NO: 73)	OTG20319 (SEQ ID NO: 74) OTG20320 (SEQ ID NO: 75)	pTG18340
[0310] 6	OTG20321 (SEQ ID NO: 76) OTG20322 (SEQ ID NO: 77)	NA	pTG18341
13	OTG20333 (SEQ ID NO: 78) OTG20334 (SEQ ID NO: 79)	NA	pTG18342
14	OTG20333 (SEQ ID NO: 78) OTG20334 (SEQ ID NO: 79)	NA	pTG18343

[0311] MVATG18355(融合物^{n°}13)的构建

[0312] 将编码融合物^{n°}13(SF-Rv2029c*-Rv2626-Rv1733c*-Rv0111*,如SEQ ID NO:38从1到28和37到932的部分所示)的核苷酸序列置于p7.5K启动子(SEQ ID NO:80;CCACCCACTT TTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAAT TTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAAGAACAGT)的控制下。后者使用合适的引物对OTG20405 (SEQ ID NO:81)和OTG20406 (SEQ ID NO:82),通过PCR从VV(牛痘病毒)哥本哈根菌株的DNA扩增,而融合物^{n°}13序列利用OTG20407 (SEQ ID NO:83)和OTG20408 (SEQ ID NO:84),通过PCR从质粒pTG18342扩增。然后利用引物OTG20405 (SEQ ID NO:81)和OTG20408 (SEQ ID NO:84),通过双重PCR重新装配p7.5K和融合物^{n°}13编码序列。将所获片段插入牛痘转移质粒pTG17960的BglIII和NotI限制性酶切位点,得到pTG18355。

[0313] 将MVA转移质粒pTG17960设计为允许通过同源重组将待转移的核苷酸序列插入MVA基因组的deletion III中。它来源于质粒pTG1E(描述于Braun等,2000,Gene Ther.7:1447),将围绕MVAdelation III(Sutter and Moss,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10847)的侧翼序列(BRG3和BRD3)克隆入所述质粒中。转移质粒还包含维多利亚多管水母(Aequorea victoria)增强绿色荧光蛋白(eGFP基因,分离自pEGP-C1,Clontech)和大肠杆

菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因 (gpt基因) 的融合物,其受到早晚期牛痘病毒合成启动子p11K7.5 (R.Wittek惠赠,University of Lausanne) 的控制。黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶的合成使GPT⁺重组MVA能够在包含霉酚酸、黄嘌呤和次黄嘌呤的选择性培养基中生长 (Falkner等,1988,J.Virol.62,1849-54),eGFP使得能够观察重组MVA噬斑。将选择标记物eGFP-GPT按照相同方向置于两个同源序列之间。在克隆选择后,可以通过没有选择(允许eGFP-GPT重组MVA的生长)的数次传代轻易去除选择标记物。

[0314] 在感染MVA并用pTG18355进行Nucleofection转染的原代鸡胚胎成纤维细胞(CEF)中,通过同源重组产生MVATG18355。在包含霉酚酸、黄嘌呤和次黄嘌呤的选择性培养基存在的条件下生长后,通过噬斑纯化进行病毒选择。如上所述,继而通过在非选择性培养基中传代去除选择标记物。通过PCR验证不存在亲代MVA的污染。

[0315] MVATG18364(融合物n°13+融合物n°4)的构建

[0316] 将编码融合物n°4 (SR-RPFB-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-TMR,如SEQ ID NO:32从1到23然后是32到855和866到932的部分所示)的核苷酸序列置于pH5R启动子(SEQ ID NO:85,TTTATTCTATACTTAAAAATGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTGTGTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTG)的控制下,所述pH5R启动子是利用引物对OTG20445(SEQ ID NO:86)和OTG20446(SEQ ID NO:87)通过PCR从野生型MVA的基因组DNA克隆的。扩增产物用NotI和PacI消化。利用OTG20447(SEQ ID NO:88)和OTG20380(SEQ ID NO:89)引物通过PCR从pTG18339扩增融合物n°4编码序列。扩增产物用PacI和XhoI消化。将两个片段一起克隆入NotI和XhoI限制性酶切的pTG18355,得到pTG18364。

[0317] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18364病毒。

[0318] MVATG18365(融合物n°13+融合物n°11)的构建

[0319] 将编码融合物n°11 (RPFB-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6,如SEQ ID NO:33从第10位到第833位的部分所示,之前的第1位是Met起始密码子)的核苷酸序列置于pH5R启动子的控制下。所述启动子利用OTG20445(SEQ ID NO:86)和OTG20446(SEQ ID NO:87)引物,通过PCR从pTG18364获得,并用NotI和PacI消化扩增的片段。利用引物对OTG20448(SEQ ID NO:90)和OTG20382(SEQ ID NO:91),通过PCR从pTG18297克隆融合物n°11编码序列,并用PacI和XhoI消化扩增产物。将两个片段一起克隆入NotI和XhoI限制性酶切的pTG18355,得到pTG18365。

[0320] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18365病毒。

[0321] MVATG18376(融合物n°13+融合物n°4+融合物n°5)的构建

[0322] 将编码融合物n°5 (SR-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR,如SEQ ID NO:34从第1位到第23位继之以第32位到第1115位和第1126位到第1192位的部分所示)的核苷酸序列置于B2R启动子(SEQ ID NO:92,TATATTATTAAGTGTGGTGTGGTTCGATGTAATAATTT-TTGTCGATAAAAATTAATAAATAACTTAATTTATTATTGATCTCGTGTGTACAACCGAAATC)的控制下。所述启动子利用引物对OTG20469(SEQ ID NO:93)和OTG20470(SEQ ID NO:94),通过PCR从VV Western Reserve菌株DNA扩增,并用XhoI和NheI消化扩增片段。使用引物对OTG20472(SEQ ID NO:95)和OTG20473(SEQ ID NO:96)从pTG18340扩增融合物n°5编码序列,然后用NheI和BamHI限制性酶切。将两个消化片段一起克隆入XhoI和BamHI线性化的pTG18364,以产生pTG18376。

- [0323] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18376病毒。
- [0324] MVATG183777(融合物^{n°13}+融合物^{n°11}+融合物^{n°5})的构建
- [0325] 利用如上所述的引物对OTG20469和OTG20470从pTG18376扩增B2R启动子,并用XhoI和NheI消化。如上所述扩增编码融合物^{n°5}(SR-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR)的核苷酸序列,并克隆入由XhoI和BamHI线性化的pTG18364(在B2R启动子的控制下)以产生pTG18377。
- [0326] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18377病毒。
- [0327] MVATG18378(融合物^{n°13}+融合物^{n°4}+融合物^{n°9})的构建
- [0328] 利用引物对OTG20483(SEQ ID NO:97)和OTG20474(SEQ ID NO:98),通过PCR从pTG18295扩增编码融合物^{n°9}(Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807,如SEQ ID NO:35从第10位到第1093位的部分所示,之前的第1位是Met起始密码子)的核苷酸序列。扩增产物用NheI和BamHI消化,并与XhoI和NheI限制性酶切的B2R启动子(如上所述从pTG18376扩增)克隆入由XhoI和BamHI线性化的pTG18364,产生pTG18378。
- [0329] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18378病毒。
- [0330] MVATG18379(融合物^{n°13}+融合物^{n°11}+融合物^{n°9})的构建
- [0331] 如上所述扩增编码融合物^{n°9}(Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807)的核苷酸序列和B2R启动子,并一起克隆入由XhoI和BamHI线性化的pTG18365,产生ptg18378。
- [0332] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18379病毒。
- [0333] MVATG18404(融合物^{n°14}+融合物^{n°6})的构建
- [0334] 使用引物对OTG20407(SEQ ID NO:83)和OTG20525(SEQ ID NO:99),通过PCR从pTG18343扩增编码融合物^{n°14}(SF-Rv2029c*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*,如SEQ ID NO:39从第1位到第28位和第37位到第831位的部分所示)的核苷酸序列。利用OTG20524(SEQ ID NO:100)和OTG20406(SEQ ID NO:82)引物,通过PCR从pTG18355获得p7.5K启动子。然后使用OTG20524(SEQ ID NO:100)和OTG20525(SEQ ID NO:99),通过双重PCR将融合物^{n°14}编码序列克隆在p7.5K启动子的控制下。将所获片段用BamHI和NotI限制性酶切,并插入牛痘转移质粒pTG17960的BglIII和NotI限制性酶切位点,产生pTG18395。
- [0335] 使用引物对OTG20527(SEQ ID NO:101)和OTG20376(SEQ ID NO:102),通过PCR从pTG18341扩增编码融合物^{n°6}(SS-Ag85B*-Rv2626-RPFb-Dhyb*-Rv1733c*,如SEQ ID NO:36第1位到第23位和第32位到第956位的部分所示)的核苷酸序列,并用PacI和XhoI消化扩增产物。如上所述从pTG18355扩增pH5R启动子,并用NotI和PacI消化。将两个消化片段一起克隆入由NotI和XhoI线性化的pTG18395,产生质粒pTG18404。
- [0336] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18404病毒。
- [0337] MVATG18417(融合物^{n°14}+融合物^{n°6}+融合物^{n°5})的构建
- [0338] 通过用XhoI和BamHI消化pTG18376获得置于B2R启动子控制下的编码融合物^{n°5}(SR-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR)的核苷酸序列。将所获片段插入用相同酶消化的pTG18404,产生pTG18417。
- [0339] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18417病毒。
- [0340] MVATG18418(融合物^{n°14}+融合物^{n°6}+融合物^{n°9})的构建
- [0341] 通过用XhoI和BamHI消化pTG18379获得置于B2R启动子控制下的编码融合物^{n°9}

(Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807)的核苷酸序列。将所获片段插入用相同酶限制性酶切的pTG18404,产生pTG18418。

[0342] 如上所述通过同源重组在CEF中产生MVATG18418病毒。

[0343] 制备和蛋白纯化

[0344] 4种大肠杆菌菌株被检验用于表达单个Mtb抗原。所有菌株在它们的基因组携带DE3原噬菌体,其允许通过乳糖或乳糖类似物(即IPTG)诱导T7聚合酶的表达。4种菌株是作为蛋白表达典型菌株的B121 (DE3) (Lucigen),用于表达毒性蛋白的C41 (DE3) (Lucigen),用于具有不同于大肠杆菌密码子使用的蛋白表达的B121 (DE3) Rosetta (Merck Chemical),和用于表达具有跨膜肽的蛋白(例如Rv1733c)的C43 (DE3) (Lucigen)。此外,为了优化抗原产生,检验了3种不同温度和生产时间。

[0345] 用于确定最优条件的表达测定

[0346] 用编码待产生的Mtb抗原的质粒转化每种大肠杆菌菌株。从新转化的平板分离5个集落,接种于50ml存在氨苄青霉素的LB (Luria Broth) 培养基,并在37°C摇动条件下生长过夜。用预培养样本接种含自体诱导培养基(AI培养基,包含葡萄糖/乳糖和抗生素;Studier, 2005,Protein Expr Purif.41:207-34)的长颈瓶,然后分别在18°C、30°C和37°C培养24、8和8小时。温育结束后,测量600nm吸光度,并通过离心收集细胞。将细胞沉淀重悬于PBS,并针对每种检验的培养条件,将OD 600nm调节为大约50,然后通过超声裂解细胞。然后在4°C于10,000g将细胞裂解物离心10分钟,然后将上清液和沉淀物的样本(通常10 μ l)上样于SDS-PAGE以估算最优条件。

[0347] Mtb抗原的产生和纯化

[0348] 利用之前确定的最优条件,从在2L长颈瓶中生长的500mL培养物纯化包含His标签的Mtb抗原。通过离心收集细胞,将对应于250mL培养物的沉淀物保存于-20°C直至使用。根据抗原溶解度,将收集的细菌重悬于PBS或胍中,进行超声处理以裂解细胞,根据制造商的推荐,在天然或变性条件下利用Ni sepharose 6 fast Flow树脂(GE Healthcare;参照号17-5318)通过IMAC亲和层析进行纯化。通过使用增加浓度的咪唑(50mM、100mM和250mM)洗脱蛋白。汇集包含纯蛋白的组分,并根据抗原的溶解度透析PBS或尿素。

[0349] 蛋白表征

[0350] 进行各种试验以估计存在于洗脱组分中的纯化Mtb抗原的数量和质量。

[0351] 利用来自Charles River Laboratories的Portable Test System (PTS) 测量内毒素水平。根据制造商的推荐使用检测范围为0.005到0.5EU/mL的卡片(cartridge)。

[0352] 根据制造商的推荐,通过Bradford测定法(Bioroad)测定蛋白浓度。在样品缓冲液中稀释的牛血清白蛋白(BSA)被用作标准品。

[0353] 可以通过SDS-PAGE(4-12%Invitrogen)电泳鉴定洗脱组分和透析溶液的纯度。

[0354] 使用MALDI(基质辅助激光解吸/电离)或电喷射方法测量纯化蛋白的质量。将测量的质量与计算的质量进行比较,以便确定蛋白是否是完整的。通过对胰蛋白酶消化后产生的肽的质量测量,确认溶液或凝胶条带中蛋白的身份。通过MALDI和/或与串联质谱(LC/MS/MS)偶联的液相层析确定肽的质量。将测量的肽质量与计算的肽质量进行比较,以便验证蛋白的身份。

[0355] 抗Mtb抗原的抗体的产生

[0356] 用两种不同的抗原特异性肽的混合物 (Eurogentec; Seraing, Belgium) 免疫兔后, 产生针对各种Mtb抗原的抗体。在运行表位B预测程序后, 选择具有15或16个氨基酸残基的肽。在第0天用两种特定肽免疫兔并在第7、10和18天进行3次加强后, 产生抗Rv1733c*、Rv2029c*、Rv0569、Rv1807、Rv0111、RPF-B-Dhyb*、Rv1813*和Rv3407抗原的抗血清。在第一次肽注射前和第21天采集血液样品。第29天进行兔的最终放血。对于Rv3478, 在第0、22、49和77天用两种特定16mer肽注射兔。在第一次肽注射前以及第31和59天采集血液样品。第87天进行兔的最终放血。

[0357] 使用特定肽通过ELISA, 并使用单个Mtb基因表达质粒通过蛋白印迹分析来鉴定最终血清。

[0358] Mtb融合蛋白的体外试验

[0359] DNA介导表达产物的蛋白印迹

[0360] 利用Lipofectamine 2000 (Invitrogen; #11668-019), 使用5 μ g编码Mtb抗原融合物或单个基因的各种质粒转染 2×10^6 HEK293细胞, 转染后18h向生长培养基添加蛋白酶体抑制剂MG132 (10 μ M)。pGWIZ质粒用做阴性对照。48小时后弃去培养基, 并用450 μ L/皿添加 β -巯基乙醇 (5% v:v) 的Tris-Glycin-SDS 2X缓冲液 (参考号: LC2676; Novex) 裂解细胞。然后超声处理裂解物, 并在95 $^{\circ}$ C煮沸5分钟。使用Criterion Precast凝胶系统 (Biorad), 在预制10% Criterion凝胶上对30微升细胞裂解物进行电泳。电泳后将蛋白转移到PVDF膜 (Macherey Nagel, 741260)。利用1/500稀释的抗Flag M2过氧化物酶 (HRP) 单克隆抗体 (Sigma; #A8592) 或1/5000稀释的抗His过氧化物酶单克隆抗体 (Invitrogen; #R931-25) 进行免疫检测。使用ImmunStar WesternC试剂盒 (Biorad, ref 170.5070) 显影免疫复合物。

[0361] 如上所述的免疫兔后获得的血清 (1/1000稀释) 也用于Rv1733c*、Rv2029c*、Rv0569、Rv1807、Rv0111*、Rpf-B-D、Rv1813*、Rv3407和Rv3478的蛋白印迹检测。商品化抗体分别用于检测ESAT6、Ag85B*、TB10.4和Rv2626, 小鼠单克隆抗体HYB076-08 (Santa-Cruz; #sc-57730, 1/500稀释) 用于ESAT6, 兔多克隆抗血清NR-13800 (BEI, 1/5000稀释) 用于Ag85B*, 小鼠单克隆抗体26A11 (Lifespan-Biosciences; #LS-C91052, 1/1000稀释) 用于Rv2626, 多克隆兔抗体ABIN361292 (Antibodies-online, 1/1000稀释) 用于TB10.4。

[0362] MVA介导表达产物的蛋白印迹

[0363] 用MOI 1的各种产生Mtb抗原融合物的MVA感染 10^6 个A549细胞, 感染后30分钟向生长培养基添加蛋白酶体抑制剂MG132 (10 μ M)。MVATGN33.1空载体用作阴性对照。24小时后弃去培养基, 并用300 μ L/皿添加 β -巯基乙醇 (5% v:v) 的Tris-Glycin-SDS 2X缓冲液 (参考号: LC2676; Novex) 裂解细胞。然后超声处理裂解物, 并在95 $^{\circ}$ C加热5分钟。使用Criterion Precast凝胶系统 (Biorad), 在预制4-15% Criterion凝胶上对20微升细胞裂解物进行电泳。电泳后将蛋白转移到PVDF膜 (Trans-blot[®] Turbo[™] Transfer System (#170-4155, Biorad))。如上所述使用与DNA质粒表达产物有关的Mtb特异性抗体进行免疫检测。使用ImmunStar WesternC试剂盒 (Biorad, ref 170.5070) 显影免疫复合物。

[0364] 小鼠模型中的免疫原性鉴定

[0365] DNA免疫方案

[0366] 用融合物编码质粒或编码所述融合物中包括的单个Mtb抗原的质粒混合物对小鼠免疫3次, 中间间隔2或3周。将溶于100 μ L无菌PBS的100 μ g DNA通过肌肉途径注射入胫骨前

肌肌肉。在最后一次DNA注射后2周通过ELISpot IFN γ 测定鉴定细胞免疫应答。

[0367] MVA免疫方案

[0368] 在BALB/c、转基因HLA-A2、C57BL/6和C3H/HeN小鼠中鉴定MVA TB候选物的免疫原性。在尾基部皮下施用每种MVA载体,每次剂量为溶于100 μ L Tris-HCl缓冲的并包含蔗糖的缓冲液的 1×10^7 pfu。在MVA注射后7天通过ELISpot IFN γ 测定鉴定细胞免疫应答

[0369] 肽库(library)

[0370] 使用肽库对来自免疫小鼠的脾细胞进行离体再刺激。更确切地说,合成(ProImmune) 679种肽(15mers,有11个氨基酸重叠),其覆盖上述融合物包含的所有14种Mtb抗原。在DMSO中制备肽库(pool),终浓度为1 μ mol/L。需要1-4个库以便覆盖每种Mtb抗原的全长。

[0371] Rv1733c被18肽和17肽的两个库覆盖。库1:覆盖Rv1733c残基62到144的18肽;库2:覆盖Rv1733c残基134到210的17肽。

[0372] Rv2029c被4个19肽库覆盖。库1:覆盖Rv2029c残基1到87的19肽;库2:覆盖Rv2029c残基到163的19肽;库3:覆盖Rv2029c残基153到239的19肽;库4:覆盖Rv2029c残基229到314的19肽。

[0373] Rv0569被1个覆盖Rv0569残基1到88的20肽库覆盖。

[0374] Rv1807被4个肽库覆盖,前3个是25肽库,第4个是22肽库。库1:覆盖Rv1807残基1到111的25肽;库2:覆盖Rv1807残基101到211的25肽;库3:覆盖Rv1807残基201到311的25肽;库4:覆盖Rv1807残基301到399的22肽。

[0375] Rv0111被4个肽库覆盖,前3个是20肽库,第4个是19肽库。库1:覆盖Rv0111残基361到451的20肽;库2:覆盖Rv0111残基441到531的20肽;库3:覆盖Rv0111残基521到611的20肽;库4:覆盖Rv0111残基601到685的19肽。

[0376] RpfB-Dhyb被4个肽库覆盖,前3个是22肽库,第4个是19肽库。库1:覆盖RpfB残基30到127的22肽;库2:覆盖RpfB残基117到215的22肽;库3:覆盖RpfB残基205到284和RpfD残基53到71的22肽;库4:覆盖RpfD残基61到146的19肽。

[0377] Rv1813被1个覆盖Rv1813残基34到143的25肽库覆盖。

[0378] Rv3407被1个覆盖Rv3407残基1到99的22肽库覆盖。

[0379] Rv3478被4个24肽库覆盖。库1:覆盖Rv3478残基1到107的24肽;库2:覆盖Rv3478残基97到203的24肽;库3:覆盖Rv3478残基193到299的24肽;库4:覆盖Rv3478残基289到393的24肽。

[0380] Rv2626被2个17肽和16肽库覆盖。库1:覆盖Rv2626残基1到79的17肽;库2:覆盖Rv2626残基69到143的16肽。

[0381] Ag85B被3个23肽库覆盖。库1:覆盖Ag85B残基39到141的23肽;库2:覆盖Ag85B残基131到233的23肽;库3:覆盖Ag85B残基223到325的23肽。

[0382] ESAT-6被1个覆盖ESAT-6残基1到95的21肽库覆盖。

[0383] TB10.4被1个覆盖TB10.4残基1到95的21肽库覆盖。

[0384] IFN γ ELISpot测定

[0385] 收集来自免疫小鼠的脾细胞,并裂解红细胞(Sigma,R7757)。在包被抗小鼠IFN γ 单克隆抗体(BD Biosciences;10 μ g/mL,551216)的Multiscreen板(Millipore,MSHA

S4510) 中培养 2×10^5 细胞/孔,一式三份,所述孔含有 α MEM培养基(Gibco,22571),所述培养基添加有10%FCS(JRH,12003-100M),80U/mL青霉素/80 μ g/mL链霉素(PAN,P06-07-100),2mM L-谷氨酰胺(Gibco,25030),1x非必需氨基酸(Gibco,11140),10mM HEPES(Gibco,15630),1mM丙酮酸钠(Gibco,31350)和50 μ M β -巯基乙醇(Gibco,31350),并含有10单位/mL重组鼠IL2(PeproTech,212-12),单独作为阴性对照,或还含有:

[0386] -上述肽库,终浓度为1 μ mol/L

[0387] -5 μ g/ml伴刀豆球蛋白A(Sigma,C5275),作为阳性对照。

[0388] -无关肽

[0389] 如前所述(Himoudi等,2002,J.Virol.76:12735-46),通过ELISpot(细胞因子特异性酶联免疫斑点)测定定量产生IFN γ 的T细胞。结果如三个孔获得的平均值所示。通过计算对应于单独培养基观察到的斑点平均值+2标准偏差的阈值(报告为 10^6 细胞),确定用于观察应答阳性的实验阈值(或截断值)。与CTL ELISpot读数器相连的技术截断值也被限定为50个斑点/ 10^6 个细胞(高于该值的读数器的CV(变异系数)系统地低于20%)。通过使用Kruskal-Wallis检验进行ELISpot应答的统计学分析,当获得显著差异时,继而进行Mann-Whitney检验。等于或低于0.05的P值被认为是显著的。

[0390] 在鼠中鉴定包含Mtb抗原的疫苗抗结核分枝杆菌感染的治疗功效

[0391] 在第0周联合使用量入式Henderson装置与Aero控制单元(Hartings等,2004,J Pharmacol Toxicol Methods 49:39-55),对雌性C57BL/6小鼠(6到8周龄)进行雾化攻击。结核分枝杆菌攻击菌株H37Rv(NCTC 7416)在恒化器中培养(James等,2000,J Appl Microbiol 88:669-77),并在Collison喷雾器中产生平均直径为2 μ m的微粒,并直接递送到动物鼻部。调节Collison喷雾器中的悬液,以给每组小鼠递送大约100CFU/肺的估算吸入剂量。

[0392] 在感染后第10和14周,在尾基部一个位点皮下给予MVATG18364、MVATG18376或MVATG18377(10^7 pfu/100 μ L/小鼠)对小鼠进行免疫。一组小鼠注射MVATGN33.1作为阴性对照(10^7 pfu/100 μ L/小鼠)。

[0393] 利用异烟肼(INH,25mg/kg体重)和利福喷丁(RIF,10mg/kg体重)通过口服管饲法治疗小鼠,每周一次,共10周,从第6周到第15周(方案改编自Aagaard等,2011,Nat Med,17:189-194)。在药物治疗前6周杀死5只小鼠。

[0394] 杀死每组的小鼠,5只在抗生素治疗结束时(感染后15周)杀死以确定治疗期结束时的清除率,其他小鼠在第21周杀死。无菌取出器官(例如脾),在尸体解剖当天冷冻,并进行处理以用于细菌载量分析。将器官匀浆样品的系列稀释物种于7H11 Middlebrook OADC选择性琼脂,并孵育至3周以计数活的分枝杆菌(CFU)。细菌载量数据表示为Log₁₀总集落形成单位(CFU)。

[0395] 比较MVA候选物的治疗功效,并使用Mann-Whitney检验进行分级。低于0.05的P值被认为是显著的。

[0396] 结果

[0397] 实施例1:选择用于免疫原性组合的合适Mtb抗原:

[0398] Mtb基因组表达大约4000个基因,但大多数基因产物在Mtb生命周期中的功能和作用还没有被表征。如材料和方法部分所述,研究来自当前文献和数据库有关Mtb抗原的现有

数据,目标是鉴定来自Mtb基因组的最合适基因/抗原集,以提供能够在天然感染过程的所有期激发抗TB免疫的免疫治疗性疫苗。

[0399] 这些文献分析允许“预选择”属于全部3个感染期的一组33种Mtb抗原,即7种活跃期抗原,5种复苏期(Rpf)抗原,19种潜伏期抗原以及2种PE/PPE抗原。

[0400] -活跃期抗原:ESAT-6 (Rv3875),CFP-10 (Rv3874),TB10.4 (Rv0288),Ag85A (Rv3804),Ag85B (Rv1886),和2种“ESAT-6样抗原”(Rv3620和Rv3619);

[0401] -2种PE/PPE抗原(Rv2608和Rv3478),其看起来与毒性有关。

[0402] -复苏期抗原:预选择5种现有的Rpfs基因(RpfA (Rv0867c),RpfB (Rv1009),RpfC (Rv1884c),RpfD (Rv2389),RpfE (Rv2450c))。Rpfs是分泌或膜结合的胞壁质水解酶,其表达需要休眠细胞的复苏。

[0403] -从所述超过150种现有潜伏基因中预选择19种潜伏抗原。更确切地说,12种属于DosR调节子,一组45种基因的表达在潜伏期增加,并从在被认为模拟Mtb在体内面临的潜伏期条件的培养条件下表达被调节的基因中选择5种。还基于最近描述的临床前和早期临床阶段选择3种潜伏抗原(Bertholet等,2008,J. Immunol. 181:7948-57;Bertholet等,2010, Sci Transl Med 2:53ra74,Mollenkopf等,2004, Infect Immun 72:6471-9)。总之,预选择的19种潜伏抗原是Rv1733c、Rv2029c、Rv1735、Rv1737、Rv2628、Rv0569、Rv2032、Rv2627c、Rv0111、Rv3812、Rv1806、Rv1807、Rv0198、Rv2626、Rv0081、Rv2005c、Rv2660、Rv3407和Rv1813。

[0404] 然后,进行第二次选择以将33种预选择的Mtb抗原进行排序。Mtb抗原的第二次选择基于以数据采掘为基础的选择方法(参见材料和方法)(反映它们的免疫和预防潜能(保留的最高分))以及生化预测。

[0405] 选择下列抗原:

[0406] -潜伏期抗原:Rv1733c,Rv2029c,Rv0569,Rv0111,Rv1807和Rv3407。还选择Rv2626和Rv1813,因为它们很好的数据采掘分数和生化预测分数。

[0407] -活跃期抗原:ESAT-6 (Rv3875),TB10.4 (Rv0288),Ag85B (Rv1886)和Rv3478。应注意,预选择的活跃期Rv3619抗原具有良好的数据采掘分数,但是作为ESAT-6样蛋白,由于未显示比ESAT-6自身更好的分数,其没有保留在选择列表中。另一个实例,活跃Rv2608和Rv3478抗原具有相同的数据采掘分数,但基于Rv3478在人队列研究中诱导更高的应答者百分比的能力而选择Rv3478。

[0408] -复苏期抗原:RpfB和RpfD。在5种复苏基因产物中,3种Rpf比较突出(RpfB,D和E),在运行数据采掘评分方法后具有非常类似的分数,但出于2个主要原因,只选择RpfB和D。首先,就细胞和体液应答来说,在5种Rpfs中有4种报道有交叉反应性(Yeremeev等,2003, Infect Immun 71:4789-94),除了RpfB,这是我们选择后者的理由。其次,基于RpfB和D之间溶菌酶结构域(LD)的序列同源性低于RpfB和E之间,在序列分析后选择RpfD而非RpfE。因此推定保留Rpf B和D足以产生针对5种Rpf的免疫应答。

[0409] 实施例2:融合设计

[0410] 进行广泛的计算机结构预测和文献分析,以便预测材料和方法部分所述选择的Mtb抗原的生化特性和/或生物学功能。

[0411] 将选择的14种抗原候选物分类为需要不同类型的分析的3组。

[0412] -具有涉及它们在各种病毒载体中表达的现有数据的抗原,即MVA (Kolilab等2010,Clin Vaccine Immunol 17:793-801)、牛痘病毒 (Malin等2000,Microbes Infect 2:1677-85) 和腺病毒 (Mu等,2009,Mol Ther 17:1093-100;Dietrich等2005,J Immunol 174:6332-9;和Havenga等2006;J Gen Virol 87:2135-43) 中的Ag85B ESAT-6和TB10-4。在这些情况下,文献分析是设计插入载体构建体的序列的主要信息来源。

[0413] -没有关于病毒载体化报道的数据,但与已知结构的蛋白相同或同源的抗原。在这些情况下,结构数据是设计插入载体构建体的Mtb序列的主要信息来源 (Rv2626,Rv2029c,RpfB,RpfD和Rv0569)。

[0414] -没有关于病毒载体化报道的数据,并且与已知结构的任意蛋白没有同源性的抗原。在这些情况下,使用计算机生化分析和预测来表征抗原,并设计插入载体构建体的Mtb序列 (Rv0111,Rv3407,Rv3478,Rv1807和Rv1813)。

[0415] Ag85B抗原的设计

[0416] Ag85B显示长40个残基的肽信号,其在Kolilab的MVA载体中保守,但在Malin的牛痘病毒和腺病毒构建体中不保守。因为预测Ag85B信号肽是TM结构域,本发明人推荐在本发明的载体构建体中不保留Ag85B肽信号。推荐用于本文所述载体构建的Ag85B*一级结构对应于SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。

[0417] ESAT-6抗原的设计

[0418] ESAT-6与CFP-10形成异二聚体复合物,预期这种异二聚体相互作用诱导这两种蛋白的折叠。单独的ESAT-6是熔化球样状态,当与CFP10复合时,是螺旋-转角-螺旋。因此,与其配偶体结合的ESAT-6比单独表达的ESAT-6更稳定。但是,推荐的用于本文所述载体构建的ESAT-6一级结构对应于全长蛋白 (SEQ ID NO:14显示的氨基酸序列),最终不含其起始密码子Met (例如如果在融合物中的内部位置)。

[0419] TB10-4 (Rv0288) 的设计

[0420] TB10-4与ESAT-6属于同一蛋白家族。TB10-4的NMR结构显示,其与Rv0287形成预期可以稳定结构的异二聚体复合物。没有关于痘病毒的TB10-4表达的公开报道,但有报道全长TB10-4在腺病毒载体中的表达,其采用与Ag85A或Ag85B的C末端部分融合的形式。基于此,推荐用于本文描述的载体构建的TB10.4一级结构对应于全长蛋白 (SEQ ID NO:2显示的氨基酸序列),最终不含其起始密码子Met。

[0421] Rv2626的设计

[0422] Rv2626的结晶 (Sharpe等,2008,J Mol Biol 383:822-36) 显示它表达为具有亚单位内和亚单位间二硫键的同二聚体。预测Rv2626没有信号肽。因为Rv2626具有非常定义明确的折叠,推荐用于本文描述的载体构建的Rv2626一级结构对应于全长蛋白 (SEQ ID NO:10显示的氨基酸序列),最终不含其起始密码子Met。

[0423] Rv0569的设计

[0424] Rv0569结构未知,但该蛋白与Rv2302在76个氨基酸重叠区 (相较于88个残基) 中显示62%相同性 (81%相似性)。已经通过NMR解析了后者结构 (Buchko等,2006,Bacteriol 188:5993-6001),其在溶液中显示具有反平行 β -片层核心和C末端 α -螺旋的非常好的折叠结构。没有关于该蛋白卷曲螺旋的预测。没有与Rv0569蛋白有关的已知功能。由于潜在的非常定义明确的折叠,推荐用于本文描述的载体构建的Mtb Rv0569一级结构对应于全长蛋白

(SEQ ID NO:3显示的氨基酸序列),最终不含其起始密码子Met。

[0425] Rv2029c的设计

[0426] Rv2029c结构是未知的,但该蛋白显示与大肠杆菌的磷酸果糖激酶-2 (pfk2) 在310aa重叠区(相较于339个氨基酸)中35%的相同性。此外,PROSCAN检索鉴定出一个完全保守的碳水化合物激酶特征。因此,Rv2029c在Mtb中可能具有磷酸果糖激酶活性。磷酸果糖激酶在糖酵解期间催化果糖-6-磷酸的磷酸化。当结合ATP时,大肠杆菌pfk2结构是四聚体,当培养基中不存在ATP时,是二聚体(酶活性的变构调节)。在大肠杆菌酶中,C末端最后4个残基的缺失完全抑制ATP诱导的四聚体化。因此,为了避免Rv2029c的寡聚异质性(二聚体和四聚体形式的混合),推荐去除C末端部分(即去除最后25个残基)。此外,为了消除Rv2029c的酶活性,推荐突变D265N(从Met起始密码子开始的第265位,或无Met的第264位),因为它几乎完全消除大肠杆菌pfk-2的酶活性(Cabrera等,2010,Arch Biochem Biophys 502:23-30)。基于此,推荐用于本文所述载体构建的Rv2029c抗原(Rv2029c*)一级结构对应于SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。

[0427] RpfB和RpfD的设计

[0428] 复苏促进因子(Rpf)是分泌蛋白,其在细菌的再活化期(从休眠转换到生长)产生。结核分枝杆菌具有5种不同的Rpf(A到E),所有都包含保守的催化结构域(溶菌酶样结构域)。除了该结构域外,这5种蛋白不存在显著相似性。已经获得约一半分子的RpfB结构(残基194-362),并预测了信号肽(残基1-29;Ruggiero等2009,J Mol Biol 385:153-62)。当在大肠杆菌中表达时,全长蛋白(不含其信号肽)作为单体起作用。

[0429] 对RpfB进行计算机预测和分析,以分析结构未知的蛋白部分(30-193)。除信号肽之外,预测没有跨膜结构域。HCA曲线、二级结构预测和天然无序区预测与30-193区域的定义明确的折叠一致。使用PROSCAN对已知基序的卷曲螺旋预测和查找未获得任何显著结果。

[0430] 在耻垢分枝杆菌复苏测定中,已经证明催化结构域活性取决于一个保守残基,其在藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) Rpf的复苏活性中是必需的(突变E292K; Mukamolova等2006,Mol Microbiol 59:84-98)。此外,两个残基T315和Q347参与溶菌酶的底物结合,并且在RpfB中是保守的(Cohen-Gonsaud等,2005,Nat Struct Mol Biol 12, 270-3)。

[0431] 此外,已经选择设计对应于RpfB分子的RPFB-D杂种,其催化结构域被Rpf中最趋异的催化结构域(即RpfD催化结构域)取代。因此,在病毒载体中表达的RPFB-D杂种是具有因3个突变(E292K,T315A和Q347A)所产生的中和催化活性,且不含信号肽的杂种蛋白。推荐用于融合物的这种RPFB-D杂种蛋白的一级结构对应于SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列,从RpfB的残基10到残基283并融合RpfD的残基51到残基147,最终含有起始密码子Met。

[0432] Rv1807的设计

[0433] Rv1807结构没有公开,但针对PDB数据库的BLAST检索得到只与Mtb PPE蛋白(Rv2430)前150个残基的匹配。PE/PPE是Mtb蛋白的一个大家族(大约100个PE和60个PPE成员),它们在其N末端部分具有共有的PE(脯氨酸,谷氨酸)或PPE(脯氨酸,脯氨酸,谷氨酸)基序。PE蛋白与PPE以异二聚体表达,它们的功能还是未知的。针对UNIPROT-SWISSPROT的BLAST检索得到数个匹配,但它们都是其他的Mtb PPE,没有获得额外信息。

[0434] 在大肠杆菌中,只有作为异二聚体表达时,可溶性PPE(Rv2430)或PE(Rv2431)的表

达似乎才是可能的(Strong等2006,Proc Natl Acad Sci 103:8060-5)。这些作者报道称,在大肠杆菌中单独表达的Rv1807形成包涵体。PROSCAN检索未获得与已知基序的任何显著匹配。对于该蛋白没有报道或预测信号肽或跨膜结构域。HCA曲线以及二级结构预测与完整蛋白定义明确的折叠一致,除了最后60-70个残基区域。此外,使用天然无序区预测,最后60个残基预测是未折叠的,而对Rv1807的卷曲螺旋预测未获得任何显著结果。

[0435] 至于ESAT6和TB10-4,Rv1807与其配偶体(即Rv1806)的共表达将有可能对蛋白稳定性产生有利影响,从而加强其免疫原性。错误折叠蛋白(单体的)的表达可能损害重组载体稳定性(蛋白毒性)。此外,Rv1807未折叠的C末端部分也会对免疫原性和/或重组病毒稳定性产生不利影响。推荐的融合物使用的Rv1807的一级结构对应于全长蛋白(SEQ ID NO:6)。在全长抗原遇到问题时,可以使用缺失最后60个残基的C末端截短型抗原(如SEQ ID NO:18所示)。

[0436] Rv3478的设计

[0437] Rv3478是另一种PPE蛋白。其PPE结构域与Rv1807的PPE结构域57%相同(两种完整蛋白之间有41%的相同性)。对UNIPROT-SWISSPROT的BLAST检索获得数个匹配,都是其他Mtb PPE。HCA曲线显示整个蛋白序列上存在的疏水片。换句话说,HCA曲线不显示Rv3478的未折叠亲水区域。但是,对于Rv1807,预测Rv3478的最后40到50个残基是未折叠的(基于二级结构和天然无序预测)。对于该蛋白没有报道或预测有信号肽或跨膜结构域。对Rv3478的卷曲螺旋预测未获得任何显著结果。对于Rv1807,推荐的一级结构是全长蛋白(SEQ ID NO:13),或,如果遇到问题,推荐的一级结构是缺失最后40个残基的C末端截短型抗原(如SEQ ID NO:24所示)。

[0438] Rv0111的设计

[0439] 预测Rv0111是具有可能的酰基转移酶活性的膜蛋白。通过DAS、TMHMM和TopPred预测了10个跨膜结构域,跨越残基58到427。没有预测到信号肽。二级结构被预测遍及一级结构,在449-469具有缺口,对应于预测的天然无序区域。对Rv0111的卷曲螺旋预测未获得任何显著结果。

[0440] Proscan分析获得 $\geq 80\%$ 相似性的4个结果:Aldo/keto还原酶位点,酰基转移酶硫辛酰基结合位点,糖转运蛋白特征(signature)和真核生物脂质运载蛋白。由于3种第一特征位于蛋白的前300个残基中,因此推荐去除至少蛋白的这个部分,以避免任何可能的生物学活性。这还允许除去蛋白的大部分跨膜结构域。因此,推荐的用于病毒载体的Rv0111一级结构是蛋白的C末端部分(例如SEQ ID NO:15所示的天然抗原的残基393-685),在分泌构建体情况下只含1个用于胞质膜锚定的TM。如果遇到表达问题,可以使用甚至截得更短的不含任何TM结构域的抗原(天然Rv0111的残基429-685,起始于SEQ ID NO:15的残基37)。

[0441] Rv1813的设计

[0442] Rv1813结构没有公开,对PDB的BLAST检索未获得匹配。Rv1813是一种小蛋白(143个残基),预测包含信号肽(1-32),不包含跨膜结构域。其与Uniprot-Swissprot数据库的其他蛋白未显示显著同源性。HCA曲线、二级结构预测和天然无序区预测都与完整蛋白定义明确的折叠一致。卷曲螺旋预测未获得任何显著结果。TB库中未报道功能,PROSCAN检索未获得与已知基序的显著匹配。因此将用于病毒载体的Rv1813的推荐一级结构是不含其信号肽的全长蛋白(残基1到34),其氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。

[0443] Rv3407的设计

[0444] Rv3407结构没有公开,对PDB的BLAST检索未获得任何匹配。Rv3407是一种小蛋白(99个残基),与Uniprot-Swissprot数据库的其他蛋白没有显著同源性。对于该蛋白没有报道或预测信号肽或跨膜结构域。HCA曲线和二级结构预测与完整蛋白定义明确的折叠一致。但是,天然无序区预测表明,最后33个残基可能没有折叠成指定结构。与HCA和二级结构预测不一致的这最后一个结果可能是MORE(“分子识别元件”)的特征,其在结合配偶体蛋白时折叠。就Rv3407来说,只有当Rv3407结合其配偶体时才存在C末端 α 螺旋。卷曲螺旋预测未获得任何显著结果。TB库中未报道该蛋白的功能,PROSCAN检索未获得任何与已知基序的显著匹配。Rv3407的推荐一级结构是全长蛋白(SEQ ID NO:12)。如果遇到稳定性问题,可以使用缺失最后33个残基的C末端截短型抗原(如SEQ ID NO:23所示)。

[0445] Rv1733c的设计

[0446] 根据UNIPROT-SWISSPROT和TB库,预测Rv1733c是膜蛋白,具有2个跨膜结构域(还使用DAS、TMHMM和TopPred进行预测)。预测第一个TM结构域作为信号肽。除了这些跨膜结构域外,几乎没有预测该蛋白的二级结构。HCA曲线显示,几乎没有疏水片存在于这两个跨膜螺旋之间。最后,在这两个跨膜螺旋之间预测有天然无序区(约20残基长)。总之,这些结果表明跨膜结构域附近可能的松散折叠。对不含其信号肽的Rv1733c的PROSCAN检索未获得与已知基序的任何显著匹配。对Rv1733c的卷曲螺旋预测未获得任何显著结果。因此将用于病毒载体的Rv1733c的推荐一级结构是去掉其信号肽的完整蛋白(前62个残基),如SEQ ID NO:17所示。可选地,还可以使用全长Rv1733c(SEQ ID NO:5)。

[0447] 实施例3:Mtb基因融合物的构建

[0448] 如图1和表3所示,构造12种不同的融合蛋白。更具体地,如下所述基于生化原理分别设计5种融合物:

[0449] -融合物n°3 (RPFB-Dhyb*);

[0450] -融合物n°5 (Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807);

[0451] -融合物n°6 (Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb*-Rv1733c*);

[0452] -融合物n°8 (Ag85B*-Rv2626-Rv1733c*);和

[0453] -融合物n°14 (Rv2029c*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*).

[0454] 遵循下列生化原理设计融合物

[0455] -2种二聚体蛋白(即Rv2626和Rv2929*)不应在相同融合物中融合以避免任意空间抵触。

[0456] -两种膜蛋白不应用于相同融合物(即Rv1733c*和Rv0111*)以避免潜在毒性事件。

[0457] -含TM的蛋白(Rv1733c*和Rv0111*)应当插入融合物末端以允许用于分泌构建体的胞质膜锚定。

[0458] -如果可能,融合蛋白应从良好折叠的蛋白(即Ag85B*、Rv2029c*、Rv2626、Rv0569、RPFB-D杂种*)开始以对融合物剩余部分具有“蛋白伴侣”作用。

[0459] -制备3种融合物,其中两种具有最小集合的抗原(即Ag85B*、Rv2029c*、Rv2626、Rv0111*、Rv1733c*、TB10-4、ESAT-6、RPFB-D杂种*),最后1个融合物具有剩余(可选的)抗原(即Rv0569、Rv1813*、Rv3407、Rv1807、Rv3478)。

[0460] 另一方面,还相对于TB疾病期设计融合物。融合物n°2包含活跃抗原(Ag85B*-

TB10.4-ESAT6), 而融合物n°4包含活跃和复苏抗原 (RPFb-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6)。融合物n°13由潜伏抗原组成 (Rv2029c*-Rv2626-Rv1733c*-Rv0111*)。

[0461] 如材料和方法部分所述, 将一系列肽添加到Mtb抗原融合物, 分别是N末端Flag标签和C末端c-myc和His标签肽, 目的是有助于检测编码基因产物, 以及N末端信号肽和C末端膜锚定肽以增强免疫原性 (应注意对于以Rv0111*或Rv1733c*结尾的融合物不需要添加TM结构域, 因为这些蛋白已经包含这类结构域)。

[0462] 出于比较目的, 还构建了不含任何SS和TM肽的融合物, 以便鉴定编码Mtb抗原的细胞质表达。融合物n°3 (pTG18267)、n°5 (pTG18269)、n°2 (pTG18266) 和n°4 (pTG18268) 去除SS和TM肽, 得到融合物n°12 (pTG18307)、n°9 (pTG18295)、n°10 (pTG18296) 和n°11 (pTG18297)。在这些构建体中保留N末端Flag标签和C末端c-myc和His标签。

[0463] 表3提供本研究中构建的各种融合物的概述

	融合物 #	TB 抗原	质粒
按“期”融合	13	Rv2029c*-Rv2626-Rv1733c*-Rv0111*	pTG18323
	2	Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18266
	4	RPFb-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18268
Max 列表	5	Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807	pTG18269
按生物化学规则融合	6	Ag85B*-Rv2626-RPFb-Dhyb-Rv1733c*	pTG18270
	14	Rv2029c-TB10.4-ESAT6-Rv0111*	pTG18324
	8	Ag85B*-Rv2626-Rv1733c*	pTG18272
	3	RPFb-Dhyb	pTG18267
不含 SS 和 TM 的融合	9	Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807	pTG18295
	10	Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18296
	11	RPFb-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18297
	12	RPFb-Dhyb	pTG18307

[0465] 出于比较目的, 编码用于上述融合物的单个Mtb基因的质粒通过PCR扩增, 或由Genart合成基因序列。更确切地说, 使用pTG18269作为模板以扩增Rv3407、Rv0569、Rv1807、Rv1813*和Rv3478, 而使用pTG18323扩增Rv2626、ESAT6、Rv1733c*、Ag85B*、TB10-4、Rv0111*和Rv2029c*作为合成基因产生。

[0466] 单个基因按照与融合物相同的情况放置, 即插入pGWiz中CMV启动子的下游, 并在5'融合Flag, 在3'融合c-myc-His序列。因为Rv1733c*和Rv0111*蛋白包含TM结构域, 将狂犬病毒ERA菌株的糖蛋白前体N末端存在的信号肽融合到Flag序列上游以避免表达问题。产生的质粒分别命名为pTG18300 (Rv3407), pTG18301 (Rv0569), pTG18302 (Rv1807), pTG18303 (Rv1813*), pTG18304 (Rv3478), pTG18305 (Rv2626), pTG18308 (ESAT6), pTG18309 (Rv1733c*), pTG18310 (Ag85B*), pTG18315 (TB10.4), pTG18329 (Rv0111*), pTG18317 (Rv2029c*)。

[0467] 在将相应表达质粒导入后,在真核表达系统中评价各种融合蛋白。通过蛋白印迹评价表达,并在小鼠的DNA免疫后通过ELISpot IFN γ 测定鉴定免疫原性。在可能时,比较细胞质(不含SS和TM)和膜锚定形式的表达和免疫原性,以及由表达单个Mtb抗原的质粒混合物获得的融合物提供的免疫原性。

[0468] 实施例4:Mtb抗原和融合物的表达分析

[0469] 无论是单独表达还是融合表达,通过获自转染HEK293细胞的细胞裂解物的蛋白印迹分析Mtb基因的表达。

[0470] 4.1用编码单个Mtb抗原的质粒转染的细胞裂解物的蛋白印迹分析。

[0471] 利用针对表达盒包括的标签肽的抗体(例如抗Flag M2过氧化物酶(HRP)抗体,单克隆抗c-myc过氧化物酶抗体和单克隆抗His过氧化物酶抗体)或对Mtb抗原特异的抗体进行单个Mtb抗原的免疫检测。具体来说,使用免疫兔后获得的血清(参见材料和方法部分)检测Rv1733c*、Rv2029c*、Rv0569、Rv1807、Rv0111*、Rpf-B-D、Rv1813*、Rv3407和Rv3478,并使用商品化抗体检测ESAT6、Ag85B*、TB10.4和Rv2626。

[0472] 结果概述于表4。更具体地,无论使用何种免疫检测系统(抗Flag,抗His抗体,特异性兔血清和商品化抗体),对于全部单一蛋白检测对应于预期大小的条带。取决于使用的免疫检测系统,还检测了针对一些蛋白的其他产物。此外,除了Rv3407之外,检测到高水平的表达,TB10.4和ESAT6较低。针对一组典型Mtb抗原的表达检测的实例显示于图2,即Rv2029c*(图2A)、RPF-B-Dhyb(图2B)、ESAT6(图2C)和Rv2626(图2D)。

[0473] 表4:

TB 抗原 (质粒)	预期大小 (实验水平)	利用抗 Flag 和抗 His 抗体的其他 产物	利用抗 Mtb 抗体的其 他产物
Rv3407 (pTG18300)	14.4 kDa (+)		
Rv0569 (pTG18301)	12.9 kDa (+++)		1 个弱条带 ≈10 kDa
Rv1807 (pTG18302)	43.3kDa (++)		
Rv1813* (pTG18303)	15.1 kDa (+++)		
Rv3478 (pTG18304)	42.8 kDa (+++)	2 个 N 末端 clived 产物(被抗 Flag 抗体识别), 约 16 和 26 kDa	1 个条带 ≈ 30 kDa
Rv2626 (pTG18305)	18.9 kDa (+++)	对应于 Rv2626 二聚体的其他条 带	二聚体 ≈43 kDa
ESAT6 (pTG18308)	13.0 kDa (++)		
Rv1733c* (pTG18309)	21.2 kDa (+++)	1 个约 20 kDa 的 N 末端 clived 产物, 和 3 个 8 到 10 kDa 之间 的 C 末端产物	2 个条带 ≈10 和 20 kDa
Ag85B* (pTG18310)	33.9 kDa (+++)	5 个约 26, 24, 20, 17 和 12 kDa 的次要 N 末端 clived 产物, 以及 1 个约 34 kDa 的 C 末端 clived 产物(利用抗 His 抗体检测到)。	3 个弱条带 ≈26, 28 和 34 kDa
TB10.4 (pTG18315)	13.5 kDa (++)		
Rv0111* (pTG18329)	37.6 kDa (+++)	1 个约 8 kDa 的 N 末端 clived 产 物, 和 1 个约 34 kDa 的 C 末端 产物	1 个条带 ≈34 kDa 和 2 个非常弱的条带 ≈18 和 20 kDa
Rv2029c* (pTG18317)	35.8 kDa (+++)		
RfpB-Dhyb* (pTG18307)	39.4kDa (+++)		2 个弱条带 ≈40 kDa
[0475]	(pTG18307)	(+++)	

[0476] 4.2用编码Mtb抗原融合物的质粒转染的细胞裂解物的蛋白印迹分析。

[0477] 利用表达不同Mtb基因融合物的质粒转染HEK293细胞,并按照上述相同条件通过

蛋白印迹分析表达产物。在存在和不存在蛋白酶抑制剂MG132的条件下进行转染。此处再一次用抗Flag M2过氧化物酶 (HRP) 抗体、单克隆抗c-myc过氧化物酶抗体和单克隆抗His过氧化物酶抗体以及抗Mtb特异性抗体进行免疫检测。

[0478] 标签融合物的预期大小如下所示：

[0479] -融合物n°2 (pTG18266) :63.6kDa

[0480] -融合物n°3 (pTG18267) :49.0kDa

[0481] -融合物n°4 (pTG18268) :99.7kDa

[0482] -融合物n°5 (pTG18269) :122.0kDa

[0483] -融合物n°6 (pTG18270) :103.5kDa

[0484] -融合物n°8 (pTG18272) :67.3kDa

[0485] -融合物n°9 (pTG18295) :112.9kDa

[0486] -融合物n°10 (pTG18296) :53.8kDa

[0487] -融合物n°11 (pTG18297) :90.0kDa

[0488] -融合物n°12 (pTG18307) :39.3kDa

[0489] -融合物n°13 (pTG18323) :101.5kDa

[0490] -融合物n°14 (pTG18324) :90.6kDa

[0491] 利用抗Flag和抗His单克隆抗体检测全部Mtb抗原融合物。还利用抗c-myc单克隆抗体检测除pTG18266、pTG18267、pTG18268和pTG18269之外的Mtb融合产物。由于相邻的TM结构域,在这些融合物中c-myc表位可能是难以接近的,因为利用抗myc抗体可以良好检测细胞质对应物 (pTG18296, pTG18307, pTG18297和pTG18295)。图3显示包括潜伏抗原 (pTG18295编码融合物n°9)、活跃抗原 (pTG18296编码融合物n°10)、复苏抗原 (pTG18307编码融合物n°12) 以及复苏和活跃抗原 (pTG18297编码融合物n°11) 的Mtb融合物在抗Flag免疫检测后的蛋白印迹分析。利用抗His抗体的免疫检测得到相同的表达模式。

[0492] 图4显示包括TB10.4 (图4A)、Rv0569 (图4B) 和Rv2626 (图4C) 的Mtb融合物在用相应特异性血清免疫检测后的蛋白印迹分析,分别是包含TB10.4的融合物n°2 (pTG18266), n°10 (pTG18296), n°4 (pTG18268), n°11 (pTG18297), n°14 (pTG18324); 包含Rv0569的融合物n°5 (pTG18269) 和n°9 (pTG18295) 以及包含Rv2626的融合物n°13 (pTG18323), n°6 (pTG18270) 和n°8 (pTG18272)。pGWiz作为阴性对照,编码TB10.4的pTG18315作为阳性对照。

[0493] 无论使用何种免疫检测系统,对全部融合物显示对应于预期大小的条带,在一些情况下,还观察到其他融合产物。具体来说,检测到pTG18270、pTG18272和pTG18323的二聚体。这3种融合物包含Rv2626,其具有形成耐受还原条件的二聚体的能力。利用抗Flag和抗His抗体的免疫检测显示pTG18323和pTG18269的一些其他次要蛋白水解产物。此外,利用抗Flag和抗His抗体,对于pTG18266、pTG18268、pTG18269、pTG18270、pTG18272、pTG18323和pTG18324检测到大于预期大小的其他产物。通过体外用N-糖苷酶F处理证实,这些条带对应于N-糖基化产物 (即在用N-糖苷酶处理细胞提取物后获得预期大小的表达产物)。包含信号肽的所有融合物产生N-糖基化产物,除了融合物n°4 (pTG18267, RpfB-D*)。利用抗原特异性抗体还检测到N-糖基化产物,对于包含Rv2626的融合物pTG18270、pTG18272和pTG18323还检测到二聚体。利用特异性血清还显示一些融合物的蛋白水解产物 (数据未显示),这取决于融合物和血清。例如,利用Rv3407特异性血清检测到pTG18269 \approx 40kDa的其他条带和

pTG18295≈36和38kDa的其他条带,但利用Rv0569特异性血清没有观察到。

[0494] 对于所有融合物都获得类似的高水平表达,在MG132存在条件下检测到更高量的产物。膜锚定融合物(pTG18269,pTG18268)的表达水平与其细胞质对应物(pTG18295,pTG18297)检测到的水平相当,pTG18266除外,其比细胞质融合物(pTG18296)更好的表达。利用Rv1807特异性抗体非常微弱的检测到融合物n°5(pTG18269),而其细胞质融合物(pTG18295)不是这种情况。由于相邻的TM序列,该融合物中的Rv1807特异性表位可能难以接近。

[0495] 实施例5:DNA免疫鉴定

[0496] 在各种小鼠模型中DNA免疫之后鉴定各种Mtb抗原融合物的免疫原性。

[0497] 5.1. 鉴定基于活跃期Mtb抗原的融合物诱导的免疫原性。

[0498] 用表达融合物“Ag85B-TB10.4-ESAT6”(采用细胞膜锚定形式(SS/TM:pTG18266)或细胞质形式(pTG18296))的质粒通过肌内途径免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔3周。为了进行比较,还用编码融合物(pTG18310(Ag85B)+pTG18315(TB10.4)+pTG18308(ESAT6))包括的单个Mtb抗原的质粒的混合物和空pGWiz(作为阴性对照)免疫小鼠。在用如材料和方法部分描述的各种肽库体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0499] 如图5所示,在用pTG18266(表达锚定形式的Ag85B-TB10.4-ESAT融合物)免疫的所有小鼠中都诱导强的抗Ag85B和TB10.4抗原的细胞应答,而8只动物中有6只产生抗ESAT-6的IFN γ 生成细胞(图5a)。在用pTG18296(表达Ag85B-TB10.4-ESAT融合物的细胞质形式)免疫的小鼠中,还检测到抗Ag85B和TB10.4抗原的IFN γ 生成细胞的活化,但与锚定融合物诱导相比水平较低,同时检测到非常弱的抗ESAT-6的应答(图5b)。非常有趣地是,当比较图5a/5b和图5c时,当Ag85B、TB10.4和ESAT-6作为融合蛋白(pTG18266和pTG18296)而不是单个质粒(pTG18310、pTG18315和pTG18308的混合物)独立表达时,检测到抗所有3种抗原的最强应答。与预期一致,利用空质粒的免疫不诱导任何特异性免疫应答(图5d)。

[0500] 因此,至少对于活跃期的Mtb抗原,这些结果显示设计在细胞表面表达的抗原融合物(含SS和TM肽)优化所获Mtb抗原融合物的免疫原性的优点。

[0501] 5.2. 基于活跃期和复苏期Mtb抗原的融合物诱导的免疫原性的鉴定。

[0502] 用表达融合物“RpfB-DHyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6”的质粒(细胞膜锚定形式(SS/TM:pTG18268)或细胞质形式(pTG18297)),通过肌内途径免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔3周。为了进行比较,还用编码融合物包含的单个TB抗原的质粒的混合物(pTG18307(RpfB-DHyb)+pTG18310(Ag85B)+pTG18315(TB10.4)+pTG18308(ESAT6))以及空pGWiz(作为阴性对照)免疫小鼠。利用材料和方法部分描述的各种肽库进行体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0503] 如图6所示,利用pTG18268质粒(表达RpfB-DHyb-Ag85B-TB10.4-ESAT-6融合物的锚定形式)的免疫产生对RpfB-DHyb、Ag85B和TB10.4抗原特异的强应答,其特征在于用相应肽库体外再刺激后检测到高水平的产生IFN γ 的细胞,而在更少的动物和更低的水平诱导抗ESAT-6的产生IFN γ 的细胞(图6a)。在用pTG18297(表达RpfB-DHyb-Ag85B-TB10.4-ESAT-6融合物的细胞质形式)免疫的小鼠中,还检测到抗RpfB-DHyb、Ag85B和TB10.4抗原的IFN γ 生成细胞的活化,但与锚定融合物诱导相比水平较低,同时产生非常弱的抗ESAT-6的应答

(图6b)。除了ESAT-6之外,如图6c所示,当作为融合蛋白(pTG18268和pTG18297,图6a和6b)而不是作为单个质粒(pTG18307+pTG18310+pTG18315+pTG18308的混合物)独立表达时,获得抗RpfB-DHyb、Ag85B和TB10.4的最强抗Mtb应答。与预期一致,利用空质粒的免疫不诱导任何特异性免疫应答(图6d)。

[0504] 5.3. 基于复苏期Mtb抗原的融合物诱导的免疫原性的鉴定。

[0505] 用表达融合物“RpfB-Dhyb”的质粒(细胞膜锚定形式(SS/TM:pTG18267)或细胞质形式(pTG18307)),通过肌肉途径免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔3周。空pGWiz被用作阴性对照。利用材料和方法部分描述的4种肽库体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0506] 如图7所示,在pTG18267(表达含SS/TM肽的RpfB-DHyb融合物的锚定形式)免疫的小鼠中观察到高水平的产生IFN γ 的细胞,表明这些小鼠产生强的特异性细胞应答(图7a)。利用pTG18307(表达RpfB-DHyb融合物的细胞质形式)的免疫,也导致产生IFN γ 细胞的活化,但水平稍微较低(图7b)。此外,与用pTG18307处理的组相比,用pTG18267处理的动物组内应答看起来更均一。与预期一致,利用空质粒的免疫不诱导任何特异性免疫应答(图7c)。

[0507] 5.4. 基于潜伏期Mtb抗原的融合物诱导的免疫原性的鉴定。

[0508] 用表达融合物“Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807”的质粒(细胞膜锚定形式(pTG18269)或细胞质形式(pTG18295)),通过肌肉途径免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔3周。为了进行比较,还用编码融合物包含的单个Mtb抗原的质粒的混合物(pTG18300(Rv3407)+pTG18301(Rv0569)+pTG18302(Rv1807)+pTG18303(Rv1813)+pTG18304(Rv3478))以及空pGWiz(作为阴性对照)免疫小鼠。利用材料和方法部分描述的各种肽库进行体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0509] 如图8所示,利用pTG18269质粒(表达Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807融合物的锚定形式)的免疫产生对Rv3407和Rv3478抗原特异的强应答,对于Rv1807的应答水平较低(图8a)。在用pTG18295(表达Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807融合物的细胞质形式)免疫的小鼠中获得相似水平的抗这3种抗原的产生IFN γ 的细胞(图8b)。在注射质粒混合物的小鼠中,应答是在相同数量级内的(图8c)。另一方面,在所有情况下都没有检测到抗Rv1813和Rv0569的显著应答(图8a,b和c)。与预期一致,利用空质粒的免疫不诱导任何特异性免疫应答(图8d)。

[0510] 还使用其他小鼠品系研究抗Mtb抗原应答以便覆盖不同的MHC单倍型: BALB/c小鼠是H-2^d, C57BL/6小鼠是H-2^b, CBA/J和C3H/HeN小鼠是H-2^k。

[0511] 利用表达潜伏期“Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111”抗原的pTG18323或空pGWiz(作为阴性对照),通过肌肉途径免疫小鼠3次,每次间隔2周。利用材料和方法部分描述的各种肽库进行体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。如图10所示,利用pTG18323质粒免疫C3H/HeN小鼠产生对Rv2029c(肽n^o1的阳性库)、Rv2626(阳性库n^o2)和Rv1733c抗原(阳性库n^o2)特异的强免疫应答(图10a)。利用pGWiz免疫并且用Rv0111肽库体外再刺激后检测到非特异性的背景应答(图10b),从而使pTG18323免疫后抗Rv0111特异性应答的检测复杂化。

[0512] 还检测到与pTG18323免疫的H-2^k CBA/J小鼠中相似水平的对Rv2029c、Rv2626和Rv1733c抗原特异的免疫应答。与此相反,在BALB/c小鼠中,只有在用Rv2626肽再刺激后特

异性检测到产生IFN γ 的细胞,而在C57BL/6小鼠中没有检测到信号。

[0513] 总的说来,这些结果表明以下事实:被检测的Mtb抗原融合物序列能够在不同单倍型小鼠中诱导有效的基于细胞的免疫应答。

[0514] 5.5.基于生物化学规则的融合物诱导的免疫原性的鉴定。

[0515] 用编码融合物n^o6、8或14(根据Mtb抗原的生物化学特性设计)的质粒,即pTG18270(Ag85B-Rv2626-RpfB-Dhyb-Rv1733c)、pTG18272(Ag85B-Rv2626-Rv1733c)和pTG18324(Rv2029c-TB10.4-ESAT-6-Rv0111),通过肌内途径免疫BALB/c小鼠或C57BL/6小鼠3次,每次间隔2周。为了进行比较,还用空pGWiz免疫小鼠作为阴性对照。在用材料和方法部分描述的各种肽库体外再刺激后,通过ELISpot IFN γ 测定在最后一次DNA注射后2周鉴定细胞免疫应答。

[0516] 在用pTG18270免疫的BALB/c和C57BL/6小鼠中诱导出对Ag85B和RpfB-Dhyb抗原特异的强细胞应答,而只在BALB/c小鼠中检测到高水平的对Rv2626特异的产生IFN γ 的细胞。pTG18272免疫导致BALB/c小鼠中对Ag85B特异的产生IFN γ 细胞的活化以及C57BL/6小鼠中对Ag85B和Rv2626抗原特异的产生IFN γ 细胞的活化,但与pTG18270诱导的应答相比水平较低。在用pTG18324免疫的小鼠中,检测到高水平的对TB10.4和ESAT-6抗原特异的产生IFN γ 的细胞,同时还诱导对Rv2029c和Rv0111特异的产生IFN γ 的细胞,但水平较低。与预期一致,利用空质粒的免疫不诱导任何特异性免疫应答。

[0517] 总的说来,基于生化基本原理为了增加融合物稳定性和产量而设计的被测融合物显示了对来自不同感染期的Mtb抗原特异的良好免疫原性应答。

[0518] 5.6.Mtb抗原融合物诱导的抗Rv1733c体液应答的鉴定。

[0519] 利用表达融合物“Ag85B*-Rv2626-Rv1733c*”(pTG18270)和融合物“Ag85B*-Rv2626-RPFb-Dhyb*-Rv1733c*”(pTG18272)的质粒,通过肌内途径免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔3周。为了进行比较,还用编码融合物包含的单个Mtb抗原的质粒的混合物(pTG18310(Ag85B*)+pTG18305(Rv2626)+pTG18309(Rv1733c*))以及空pGWiz(作为阴性对照)免疫小鼠。在最后一次DNA注射后2周鉴定体液免疫应答。收集免疫小鼠的血清,并通过蛋白印迹进行分析。具体来说,将100ng/泳道的重组蛋白Rv1733c(由大肠杆菌产生,参见实例8^o)加载于聚丙烯酰胺凝胶,并利用1/200稀释的血清进行免疫检测。结果显示,利用以pTG18270、pTG18272以及编码单个Mtb抗原的质粒的混合物免疫的小鼠的血清,观察到对Rv1733c蛋白的特异性检测。

[0520] 5.7.Mtb抗原融合物诱导的抗Rv1813体液免疫的鉴定。

[0521] 用表达融合物“Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807”的质粒(细胞膜锚定形式(SS/TM:pTG18269)或细胞质形式(pTG18295)),通过肌内途径免疫BALB/c小鼠3次,每次间隔3周。为了进行比较,还用编码融合物包含的单个Mtb抗原的质粒的混合物(pTG18300(Rv3407)+pTG18301(Rv0569)+pTG18302(Rv1807)+pTG18303(Rv1813)+pTG18304(Rv3478))以及空pGWiz(作为阴性对照)免疫小鼠。在最后一次DNA注射后2周鉴定体液免疫应答。收集免疫小鼠的血清,并利用加载于聚丙烯酰胺凝胶的100ng/泳道重组蛋白Rv1813(由大肠杆菌产生,参见实例8^o)通过蛋白印迹进行分析。利用1/200稀释的血清进行免疫检测。结果显示,利用以pTG18269(编码细胞膜锚定形式的融合物)免疫的小鼠的血清特异性检测到Rv1813蛋白。

[0522] 实施例6:表达Mtb抗原的重组MVA的产生

[0523] 将总共10种MVA疫苗候选物改造为表达1种或最多3种Mtb融合物,并通过获自感染的A549细胞的细胞裂解物的蛋白印迹分析各种Mtb抗原的表达。

[0524] 6.1按照TB疾病期的重组MVA的产生

[0525] 构建7种重组MVA候选物,以包含用于表达代表各种TB疾病期的Mtb融合物的1个、2个或3个表达盒。包含活跃和复苏抗原(RPFB-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6)的融合物^{n°4}和融合物^{n°11}表达为锚定于细胞膜(融合物^{n°4},具有N末端信号肽和C末端膜锚定肽)或细胞质中(融合物^{n°11},对应于^{n°4}的细胞质形式)。融合物^{n°13}包含潜伏抗原(Rv2029c*-Rv2626-Rv1733c*-Rv0111*)。融合物^{n°5}和融合物^{n°9}均包含在不同的细胞位置表达的其他潜伏抗原(Rv056-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807),所述细胞位置为锚定于细胞膜(融合物^{n°5}包含N末端信号肽和C末端膜锚定肽)或细胞质(融合物^{n°9})。

[0526] 总而言之,7种MVA候选物如下所示:

[0527] • MVATG18355包含由p7.5K启动子控制的融合物^{n°13}。

[0528] • MVATG18364包含由p7.5K启动子控制的融合物^{n°13}和由pH5R启动子控制的融合物^{n°4}。

[0529] • MVATG18365包含由p7.5K启动子控制的融合物^{n°13}和由pH5R启动子控制的融合物^{n°11}。

[0530] • MVATG18376包含由p7.5k启动子控制的融合物^{n°13},由pH5R启动子控制的融合物^{n°4},和由B2R启动子控制的融合物^{n°5}。

[0531] • MVATG18377包含由p7.5K启动子控制的融合物^{n°13},由pH5R启动子控制的融合物^{n°11}和由B2R启动子控制的融合物^{n°5}。

[0532] • MVATG18378包含由p7.5K启动子控制的融合物^{n°13},由pH5R启动子控制的融合物^{n°4}和由B2R启动子控制的融合物^{n°9}。

[0533] • MVATG18379包含由p7.5K启动子控制的融合物^{n°13},由pH5R启动子控制的融合物^{n°11}和由B2R启动子控制的融合物^{n°9}。

[0534] 6.2根据生化基本原理产生重组MVA

[0535] 构建3种重组MVA候选物以包含用于表达Mtb融合物(相对于生化基本原理设计)的2个或3个表达盒。融合物^{n°6}包含下列抗原Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb*-Rv1733c*,而融合物^{n°14}包含Rv2029c*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*。对这两种融合物添加N末端信号肽而不添加TM结构域,因为这些融合物以Rv0111或Rv1733c(其已经包含膜锚定肽)结尾。

[0536] • MVATG18404包含由p7.5K启动子控制的融合物^{n°14}和由pH5R启动子控制的融合物^{n°6}。

[0537] • MVATG18417包含由p7.5K启动子控制的融合物^{n°14},由pH5R启动子控制的融合物^{n°6}和由B2R启动子控制的融合物^{n°5}。

[0538] • MVATG18418包含由p7.5k启动子控制的融合物^{n°14},由pH5R启动子控制的融合物^{n°6}和由B2R启动子控制的融合物^{n°9}。

[0539] 6.3MVA表达的Mtb抗原和融合物的蛋白印迹分析

[0540] 用如上所述的各种MVA候选物感染(MOI 1)A549细胞,并按照材料和方法部分描述的条件通过蛋白印迹法分析表达产物。利用对本文所述各种Mtb抗原特异的抗体进行免疫

检测。具体来说,使用免疫兔后获得的血清(参见材料和方法部分)检测Rv1733c*, Rv2029c*, Rv0569, Rv1807, Rv0111*, RPFb-Dhyb*, Rv1813*, Rv3407和Rv3478,并使用商品化抗体检测ESAT6, Ag85B*, TB10.4和Rv2626。

[0541] 结果显示,无论检测何种重组MVA,对于所有融合物都显示对应于预期大小的条带。更具体地,在来源于感染MVATG18355、MVATG18364、MVATG18365、MVATG18376、MVATG18377、MVATG18378和MVATG18379的细胞的细胞裂解物中,利用抗Rv2626和抗Rv0111免疫检测检测到大约98.4kDa(融合物n°13的预期大小)的条带。在分别用包含融合物n°4的MVATG18364、MVATG18376和MVATG18378以及包含融合物n°11的MVATG18365、MVATG18377和MVATG18379感染的细胞的细胞裂解物中,利用抗ESAT6免疫检测检测到大约96.7kDa(融合物n°4的预期大小)的条带和大约87kDa(融合物n°11的预期大小)的条带。此外,在分别用包含融合物n°5的MVATG18376和MVATG18377以及包含融合物n°9的MVATG18378和MVATG18379感染的细胞的细胞裂解物中,利用抗Rv3407免疫检测检测到大约119.7kDa(融合物n°5的预期大小)的条带和大约109.9kDa(融合物n°9的预期大小)的条带。最后,在用MVATG18404感染的细胞的细胞裂解物中,分别利用抗Rv2626和抗Rv0111免疫检测检测到大约100.4kDa(融合物n°6的预期大小)的条带和大约87.5kDa(融合物n°14的预期大小)的条带。

[0542] 此外,一些情况下,还观察到其他融合产物。具体来说,对于融合物n°13和融合物n°6检测到二聚体,可能源于Rv2626形成耐受还原条件的二聚体的能力。至于融合物n°13,完整融合物n°13(预期大小98.4kDa)的表达确实检测到了,但水平较低。利用抗Rv2626(大约70kDa)和抗Rv0111(大约30kDa)观察到主要蛋白水解产物,表明融合物n°13的蛋白水解切割。

[0543] 对于融合物n°4和n°11检测到相似水平的表达,它们包含相同抗原(RPFb-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6),但分别是膜锚定的(融合物n°4)或细胞质的(融合物n°11)。对于融合物n°4观察到比预期大小更大的条带(115kDa,而不是96.7kDa),可能对应于N-糖基化产物。对于两种融合物还检测到次要蛋白水解产物。

[0544] 在表达融合物n°5和n°9(均对应于Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807抗原的融合物,但分别表达为膜锚定形式(融合物n°5)或细胞质形式(融合物n°9))的MVA细胞裂解物中利用抗Rv3407也显示相似水平的表达。在表达融合物n°5的细胞裂解物中存在比预期大小更大的条带(120kDa,而不是98.4kDa),可能对应于N-糖基化产物。另一方面,利用抗Rv1807抗体检测到非常弱的融合物n°5,而细胞质形式不是这种情况。可以推定在膜锚定的融合物中,Rv1807特异性表位由于相邻的TMR序列,可能是难以接近的。

[0545] 实施例7:表达Mtb抗原的MVA候选疫苗的免疫原性的鉴定

[0546] 7.1在BALB/c小鼠中鉴定表达Mtb抗原的MVA候选疫苗的免疫原性

[0547] 用均表达“Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111”(对应于融合物n°13)以及“RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6”(对应于融合物n°4或n°11)的MVATG18365和MVATG18364免疫BALB/c小鼠。在融合物n°13中,SS结构域存在于N末端,Rv1733c和Rv0111表达为包含TM结构域,其会指导融合物表达在细胞表面。MVATG18364表达的融合物n°4包含SS和TM结构域两者,而融合物n°11(MVATG18365)则不包含,理论上会保留细胞质表达。用本文描述的肽库再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在注射后1周鉴定特异性细胞免疫应答。还用空MVA载体(MVATGN33.1)作为阴性对照免疫小鼠。

[0548] 分别如图11a和b所示,与MVATGN33.1载体相比,载体MVATG18365和MVATG18364均在BALB/c小鼠中诱导对Rv2626、Rv0111、RpfB-Dhyb、Ag85B和TB10.4特异的IFN γ 阳性应答。与MVATG18365(细胞质融合物)相比,利用MVATG18364(锚定融合物)的这些应答整体上更强,除了Rv2626显示相似应答之外。检测到对Rv2029c、Rv1733c和ESAT6的较弱和偶发应答。

[0549] 此外,将“实施例6”部分描述的所有重组MVA候选疫苗都注射BALB/c小鼠,并通过材料和方法部分描述的IFN γ ELISpot测定评价对所有Mtb抗原特异的细胞免疫应答。BALB/c小鼠中每种MVA候选物诱导的应答范围和强度的概述如图12所示。根据TB疾病期或生化基本原理设计的含Mtb抗原融合物的所有MVA疫苗能够在BALB/c小鼠中诱导对14种抗原中12种特异的IFN γ 应答。没有检测到对2种潜伏抗原Rv1733c和Rv0569特异的阳性细胞应答。

[0550] 7.2在转基因HLA-A2小鼠中鉴定表达Mtb抗原的MVA候选疫苗的免疫原性

[0551] 如同我们在基于DNA的研究中观察到的,小鼠单倍型对所选Mtb抗原的免疫原性具有影响(参见第5节)。为了进一步分析MVA候选物诱导的Rv1733c和Rv0569抗原的免疫原性,用表达上述两种抗原的重组MVA注射表达人MHC I类分子HLA-A2的转基因小鼠。用本文描述的肽库再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在注射后1周鉴定细胞免疫应答。还用空MVA载体(MVATGN33.1)作为阴性对照免疫小鼠。具体来说,用表达“Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111”(对应于融合物n^o13)、“RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6”(对应于融合物n^o4)以及“Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807”(对应于融合物n^o5或n^o9)的MVATG18376或MVATG18378疫苗免疫HLA-A2小鼠。在MVATG18376表达的融合物n^o5中,SS和TM结构域分别表达在N末端和C末端部分。图13显示利用MVATG18376疫苗免疫的HLA-A2小鼠中诱导的IFN γ 应答。检测到对14种抗原中7种特异的免疫应答(图13a)。当用RpfB-Dhyb和Ag85B抗原的特异性肽再刺激脾细胞时,检测到高水平的产生IFN γ 的细胞(分别为1397噬斑/10⁶个细胞和1160噬斑/10⁶个细胞)。与此相反,MVATG18376疫苗诱导较低水平的对Rv1807、Rv1813、Rv3407和ESAT6特异的细胞应答。此外,与利用MVATGN33.1空疫苗检测到的信号(36噬斑/10⁶个细胞,图13b)相比,当用Rv0569特异性肽再刺激细胞时,检测到低的(1x截断值<中值<2x截断值,186噬斑/10⁶个细胞,图13a)但显著水平的产生IFN γ 的细胞。在用MVATG18378候选物(其诱导对Rv0111和TB10.4抗原特异的额外弱应答)接种的HLA-A2小鼠中也诱导类似的结果。由MVATG18376和MVATG18378疫苗诱导的IFN γ 应答概述于图15。无论注射何种MVA候选物,在HLA-A2转基因小鼠中均未观察到对Rv1733c、Rv2029c、Rv2626和Rv3478特异的可检测的应答。

[0552] 7.3在C57B1/6小鼠中鉴定表达Mtb抗原的MVA候选疫苗的免疫原性

[0553] 利用表达“Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111”(对应于融合物n^o13)、“RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6”(对应于融合物n^o11)以及“Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807”(对应于融合物n^o5或n^o9)的MVATG18377或MVATG18379疫苗免疫H-2^b单倍型小鼠,以证明Rv0569和Rv1733c抗原的免疫原性。用本文描述的肽库再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在注射后1周鉴定细胞免疫应答。还用空MVA载体(MVATGN33.1)作为阴性对照免疫小鼠。细胞IFN γ 应答概述于图15。上述两种MVA疫苗均能够引发对Rv1807、RpfB-Dhyb、Rv3478、Ag85B和ESAT6抗原特异的强免疫应答(范围从92到861噬斑/10⁶个细胞),而只在用MVATG18379候选物免疫的小鼠中检测到对TB10.4和Rv0569抗原特异的阳性IFN γ 应答(分别为78和58噬斑/10⁶个细胞)。在免疫的C57BL/6小鼠中未检测到对Rv1733c、Rv2029c、Rv2626、Rv0111、

Rv1813和Rv3407特异的阳性应答。

[0554] 7.4在C3H/HeN小鼠中鉴定表达Mtb抗原的MVA候选疫苗的免疫原性

[0555] 因为已经在用质粒接种的H-2^k单倍型C3H/HeN小鼠中证明了对Rv1733c特异的免疫原性(参见第5.4节),用表达包含Rv1733c蛋白的融合物的MVATG18376、MVATG18378、MVATG18377和MVATG18379注射该小鼠品系。用本文描述的肽库再刺激后,通过IFN γ ELISpot测定在注射后1周鉴定细胞免疫应答。还用空MVATGN33.1载体作为阴性对照免疫小鼠。如图14所示,与MVATGN33.1相比,MVATG18377疫苗在C3H/HeN小鼠中诱导IFN γ 应答。在用Rv2029c和Rv2626肽再刺激脾细胞时检测到高水平的产生IFN γ 的细胞(分别为660和353噬斑/10⁶个细胞)。在免疫的C3H/HeN小鼠中还诱导对RpfB-Dhyb、Rv1813、Rv3407和Rv3478抗原特异的低细胞免疫应答,范围从78到250噬斑/10⁶个细胞。如在DNA接种的C3H/HeN小鼠中所示,与源于注射空MVATGN33.1疫苗的小鼠的信号(9噬斑/10⁶个细胞,图14b)相比,在该小鼠品系中引发Rv1733c特异性IFN γ 应答(183噬斑/10⁶个细胞)。在用MVATGN33.1免疫以及Rv0111、Ag85B和Rv1807肽库体外再刺激后检测到非特异性的背景应答(图14b),使得很难检测用MVATG18377免疫后对这些抗原特异的应答。

[0556] 除了MVATG18377之外,在C3H/HeN小鼠中由MVATG18376、MVATG18378和MVATG18379诱导的免疫应答显示于图15。在检测的4种MVA候选物中,MVATG18377是免疫原性最高的(14种抗原中的7种)。MVATG18376和MVATG18378只诱导对14种抗原中的2种(Rv2029c和Rv2626)特异的细胞免疫应答,而MVATG18379能够引发不只针对这两种抗原还针对Rv1733c的应答。除了融合物“Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807”之外,MVATG18377和MVATG18379表达相同的融合蛋白。在MVATG18377中,SS和TM结构域分别表达在融合物n^o5的N末端和C末端部分,而在MVATG18379中,这两个结构域均不存在。这些融合物中存在的5种抗原中的3种在MVATG18377中是免疫原性的,而在MVATG18379中没有一种是免疫原性的。这些结果表明,将融合蛋白定位于细胞膜提高它们的免疫原性。

[0557] 总的说来,利用MVA载体以及DNA质粒的免疫诱导针对本申请所述融合物包括的所有Mtb抗原的强特异性的细胞应答。在DNA免疫的小鼠中还检测到对两种被测抗原特异的体液免疫应答。如同DNA质粒一样,MVA表达的Mtb融合物的膜锚定在某种程度上提高特异性免疫应答的诱导水平。

[0558] 实施例8:Mtb抗原的产生和纯化

[0559] 8.1用于选择的Mtb抗原生物物质生产的优化条件

[0560] 为了表达单个Mtb抗原检测了4种大肠杆菌菌株,以及不同的培养条件(例如温度)。

[0561] 这些测定突出显示,所有14种选择的抗原可以在至少1种菌株中在给定的温度下表达,但Mtb抗原之间观察到显著差异。实际上,一些Mtb抗原可以在各种大肠杆菌菌株和各种培养条件下容易地产生(例如Rv0111,Rv0569,Rv1807,Rv2029c,Rv2626,RpfB-D融合物),而其他抗原需要非常特异的宿主细胞和条件(例如Rv1733c,Rv1813,TB10.4)。另一方面,在不同的大肠杆菌菌株中可以获得大部分Mtb抗原的高表达水平,除了Rv3407、Ag85B和Rv1813在较低但可检测的水平表达。此外,一些Mtb抗原作为可溶物质产生(例如Rv2626、Rv3407和Ag85B,可以直接从细胞裂解上清液收集),而其他是不溶性物质(例如RPF-B-D,Rv0111,Rv1733c,Rv2029c,Rv3478,Rv1807,ESAT6和TB10.4,可以在细胞裂解后从沉淀物收

集)。有趣地是,当从18℃培养的转化B121细胞产生时,Rv0569是可溶性的,当B121细胞在37℃培养时,Rv0569既有可溶性又有不溶性物质(在上清液和裂解后的沉淀物中)。

[0562] 8.2Mtb抗原的纯化

[0563] 如材料和方法部分所述,在镍柱上通过IMAC层析,最后继之以凝胶过滤柱来纯化Mtb抗原。

[0564] 显示了针对Rv2626(从37℃的C41(DE3)细胞中产生的可溶性物质中纯化)、RPFB-D融合物(从37℃的B121(DE3)中产生的溶解的包涵体中纯化的变性RpfB-D)和TB10.4(从37℃的C41(DE3)中产生的可溶性和不溶性物质中纯化)的典型纯化测定。洗脱组分在SDS-PAGE上测定,分别如图9a,b和c所示。

[0565] 如图9A所示,Rv2626纯化库不显示任何可见的污染物。在预期的Rv2626分子量处观察到一个主要条带,以及一个次要条带(称为B带),通过质谱鉴定其为Rv2626。已知Rv2626形成部分耐受变性和还原的二聚体。因此,推定次要条带B对应于Rv2626的二聚体形式。

[0566] 当在SDS-PAGE上显示时(泳道1到8代表中间纯化组分,泳道9到11代表5、10和15μL的纯化库),RPFB-Dhyb纯化库不显示任何可见的污染物(参见图9B)。

[0567] TB10.4在变性条件下纯化,然后是天然条件下的最终步骤。如图9C所示,纯化库的凝胶分析不显示任何可见污染物(泳道2到6代表中间纯化组分,泳道7到9代表1、3和6μL的纯化库)。

[0568] 在3个例子中,测量纯化库的内毒素水平,证明最高水平为10EU/mg蛋白。

[0569] 因此,纯化得到具有可接受的量、纯度和内毒素水平的3种蛋白。

[0570] 总之,本发明提供一种优化的Mtb抗原组合。在广泛的文献收集、数据采掘评分和生化性质计算机分析后选择14种Mtb抗原,并克隆入质粒载体(单独的或融合形式)。如蛋白印迹所示,所有融合物都以高水平表达,并在利用一系列抗体(针对N末端和C末端存在的标签或融合物中存在的每种Mtb抗原)的免疫检测后检测到正确的预期大小。BALB/c小鼠的免疫测定支持所选Mtb抗原组合和融合物诱导T细胞应答的免疫原性潜能。

[0571] 此外,选择的Mtb抗原(融合物中的RpfB和RpfD)通过重组方式在细菌中单独产生。通过研究标准诸如菌株和培养条件(例如生长温度)对大肠杆菌的表达条件进行优化。所有蛋白都已经成功表达,并在小规模产生。

[0572] 实施例9:在小鼠中鉴定包含Mtb抗原的疫苗抗结核分枝杆菌感染的治疗功效

[0573] 在治疗设置为与抗生素共施用的小鼠(先前已感染Mtb菌株H37Rv)中研究3种表达Mtb的MVA候选物,MVATG18364、MVATG18376和MVATG18377的治疗功效。作为阴性对照,还在1个组中注射MVATGN33.1。在抗生素治疗结束后(感染后第15周)和之后第6周(感染后第21周),鉴定从治疗小鼠收集的脾的细菌载量。小鼠分组、药物用法和免疫程序描述于表5。

[0574] 表5:

组别	小鼠数目	治疗	第0周雾化剂攻击	治疗前CFU(第6周,第1天)	INH/RIF 治疗 (第6周到第15周)			CFU(复发)第21周
					MVA第10周	MVA第14周	CFU第15周	
1	5	无	5	5				
2	20	INH/RIF	20	-			5	15
[0575] 3	20	INH/RIF + MVATG18376	20	-	20	20	5	15
4	20	INH/RIF + MVATG18377	20	-	20	20	5	15
5	20	INH/RIF + MVATG18364	20	-	20	20	5	15
6	20	INH/RIF + MVATGN33.1	20		20	20	5	15

[0576] Mtb感染6周后,开始化疗和MVA免疫前,分枝杆菌在所有小鼠组的脾中生长($2.64\log_{10}$ 总cfu)。与预期一致,分枝杆菌载量在化疗期间减少。在只接受化疗的第2组,Mtb水平逐步降低到 $1.18\log_{10}$ 总cfu(第15周)和 $0.70\log_{10}$ 总cfu(第21周)。有趣地是,在第15周,在接受抗生素和表达Mtb抗原的MVA共治疗的小鼠中分枝杆菌载量($0.70\log_{10}$ 总CFU,第15周,第3-5组)低于只接受抗生素治疗的小鼠(第2组)和对照空MVA结合抗生素治疗的小鼠(第6组),表明表达Mtb的MVA有助于更强的抗菌效果。值得注意的是,在治疗结束后6周(第21周),在接种MVA的小鼠中分枝杆菌不增殖并且载量被控制(范围是 0.70 到 $0.85\log_{10}$ 总cfu),其水平类似于接受抗生素疗法单独治疗的小鼠。作为对照,与药物疗法联合的空MVATGN33.1载体在第15周和第21周不诱导任何优于单用抗生素的抗分枝杆菌效果。

<110> 特兰斯吉恩股份有限公司
 <120> 分枝杆菌抗原疫苗
 <130> 363353D32654
 <150> EP 12305825.7
 <151> 2012-07-10
 <150> EP 12306539.3
 <151> 2012-12-07
 <150> EP 13305737.2
 <151> 2013-06-03
 <160> 102
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 1
 Met Pro Ala Arg Ser Val Pro Arg Pro Arg Trp Val Ala Pro Val Arg
 1 5 10 15
 Arg Val Gly Arg Leu Ala Val Trp Asp Arg Pro Glu Arg Arg Ser Gly
 20 25 30
 Ile Pro Ala Leu Asp Gly Leu Arg Ala Ile Ala Val Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ala Ser His Gly Gly Ile Pro Gly Met Gly Gly Gly Phe Ile Gly Val
 50 55 60
 Asp Ala Phe Phe Val Leu Ser Gly Phe Leu Ile Thr Ser Leu Leu Leu
 65 70 75 80
 Asp Glu Leu Gly Arg Thr Gly Arg Ile Asp Leu Ser Gly Phe Trp Ile
 85 90 95
 Arg Arg Ala Arg Arg Leu Leu Pro Ala Leu Val Leu Met Val Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala Ala Arg Ala Leu Phe Pro Asp Gln Ala Leu Thr Gly Leu
 115 120 125
 Arg Ser Asp Ala Ile Ala Ala Phe Leu Trp Thr Ala Asn Trp Arg Phe
 130 135 140
 Val Ala Gln Asn Thr Asp Tyr Phe Thr Gln Gly Ala Pro Pro Ser Pro
 145 150 155 160
 Leu Gln His Thr Trp Ser Leu Gly Val Glu Glu Gln Tyr Tyr Val Val
 165 170 175
 Trp Pro Leu Leu Leu Ile Gly Ala Thr Leu Leu Leu Ala Ala Arg Ala
 180 185 190
 Arg Arg Arg Cys Arg Arg Ala Thr Val Gly Gly Val Arg Phe Ala Ala

[0001]

	195	200	205
	Phe Leu Ile Ala Ser Leu Gly Thr Met Ala Ser Ala Thr Ala Ala Val 210 215 220		
	Ala Phe Thr Ser Ala Ala Thr Arg Asp Arg Ile Tyr Phe Gly Thr Asp 225 230 235 240		
	Thr Arg Ala Gln Ala Leu Leu Ile Gly Ser Ala Ala Ala Ala Leu Leu 245 250 255		
	Val Arg Asp Trp Pro Ser Leu Asn Arg Gly Trp Cys Leu Ile Arg Thr 260 265 270		
	Arg Trp Gly Arg Arg Ile Ala Arg Leu Leu Pro Phe Val Gly Leu Ala 275 280 285		
	Gly Leu Ala Val Thr Thr His Val Ala Thr Gly Ser Val Gly Glu Phe 290 295 300		
	Arg His Gly Leu Leu Ile Val Val Ala Gly Ala Val Ile Val Val 305 310 315 320		
	Ala Ser Val Ala Met Glu Gln Arg Gly Ala Val Ala Arg Ile Leu Ala 325 330 335		
	Trp Arg Pro Leu Val Trp Leu Gly Thr Ile Ser Tyr Gly Val Tyr Leu 340 345 350		
[0002]	Trp His Trp Pro Ile Phe Leu Ala Leu Asn Gly Gln Arg Thr Gly Trp 355 360 365		
	Ser Gly Pro Ala Leu Phe Ala Ala Arg Cys Ala Ala Thr Val Val Leu 370 375 380		
	Ala Gly Ala Ser Trp Trp Leu Ile Glu Gln Pro Ile Arg Arg Trp Arg 385 390 395 400		
	Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser 405 410 415		
	Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val Val Pro Val Gly Ala Gly Pro Gly 420 425 430		
	Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro Gly Val Ser Ala Val Ala Ala Val 435 440 445		
	Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser Gln Pro Ala Pro Gly Pro Arg Asp 450 455 460		
	Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser Val Phe Gly Asp Ser Ile Gly Trp 465 470 475 480		
	Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro Thr Pro Gly Phe Arg Phe Ile Asp 485 490 495		
	His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu Val Arg Gly Thr Pro Tyr Arg Tyr 500 505 510		

Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg Ala Glu Cys Asp Gly Trp Pro Ala
 515 520 525

Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg Asp Gln Pro Asp Val Ala Leu Leu
 530 535 540

Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val Asp Arg Val Asn Glu Gly Arg Trp
 545 550 555 560

Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Glu Leu
 565 570 575

Gln Arg Ala Leu Ser Ile Val Gly Ser Thr Gly Val Arg Val Met Val
 580 585 590

Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly Gly Glu Lys Pro Asp Gly Arg Leu
 595 600 605

Tyr Pro Glu Asp Gln Pro Glu Arg Val Asn Lys Trp Asn Ala Met Leu
 610 615 620

His Asn Ala Ile Ser Gln His Ser Asn Val Gly Met Ile Asp Leu Asn
 625 630 635 640

Lys Lys Leu Cys Pro Asp Gly Val Tyr Thr Ala Lys Val Asp Gly Ile
 645 650 655

[0003] Lys Val Arg Ser Asp Gly Val His Leu Thr Gln Glu Gly Val Lys Trp
 660 665 670

Leu Ile Pro Trp Leu Glu Asp Ser Val Arg Val Ala Ser
 675 680 685

<210> 2
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2

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
 65 70 75 80

Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
 85 90 95

<210> 3
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 3
 Met Lys Ala Lys Val Gly Asp Trp Leu Val Ile Lys Gly Ala Thr Ile
 1 5 10 15
 Asp Gln Pro Asp His Arg Gly Leu Ile Ile Glu Val Arg Ser Ser Asp
 20 25 30
 Gly Ser Pro Pro Tyr Val Val Arg Trp Leu Glu Thr Asp His Val Ala
 35 40 45
 Thr Val Ile Pro Gly Pro Asp Ala Val Val Val Thr Ala Glu Glu Gln
 50 55 60
 Asn Ala Ala Asp Glu Arg Ala Gln His Arg Phe Gly Ala Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Ala Ile Leu His Ala Arg Gly Thr
 85

<210> 4
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 4

[0004]

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

Gly Leu Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp His Val
 165 170 175
 Val Pro Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val
 180 185 190
 Thr Arg Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu Pro Pro
 195 200 205
 Asn Ala Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val
 210 215 220
 Val Glu Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Glu Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala Asn Val
 245 250 255
 Val Val Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro
 260 265 270
 Gly Thr Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile
 275 280 285
 Ala Gly Cys Glu Ala Gly Gly Asn Trp Ala Ile Asn Thr Gly Asn Gly
 290 295 300
 Tyr Tyr Gly Gly Val Gln Phe Asp Gln Gly Thr Trp Glu Ala Asn Gly
 305 310 315 320
 Gly Leu Arg Tyr Ala Pro Arg Ala Asp Leu Ala Thr Arg Glu Glu Gln
 325 330 335
 Ile Ala Val Ala Glu Val Thr Arg Leu Arg Gln Gly Trp Gly Ala Trp
 340 345 350
 Pro Val Cys Ala Ala Arg Ala Gly Ala Arg
 355 360
 <210> 5
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 5
 Met Ile Ala Thr Thr Arg Asp Arg Glu Gly Ala Thr Met Ile Thr Phe
 1 5 10 15
 Arg Leu Arg Leu Pro Cys Arg Thr Ile Leu Arg Val Phe Ser Arg Asn
 20 25 30
 Pro Leu Val Arg Gly Thr Asp Arg Leu Glu Ala Val Val Met Leu Leu
 35 40 45
 Ala Val Thr Val Ser Leu Leu Thr Ile Pro Phe Ala Ala Ala Ala Gly
 50 55 60
 Thr Ala Val Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln

Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Thr Glu Ala Gln Tyr Ala Glu Met Trp
 130 135 140
 Ser Gln Asp Ala Met Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Ala
 145 150 155 160
 Ala Thr Gln Leu Thr Pro Phe Thr Glu Pro Val Gln Thr Thr Asn Ala
 165 170 175
 Ser Gly Leu Ala Ala Gln Ser Ala Ala Ile Ala His Ala Thr Gly Ala
 180 185 190
 Ser Ala Gly Ala Gln Gln Thr Thr Leu Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ile
 195 200 205
 Pro Ser Val Leu Gln Gly Leu Ser Ser Ser Thr Ala Ala Thr Phe Ala
 210 215 220
 Ser Gly Pro Ser Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Ser Trp
 225 230 235 240
 Leu Asp Lys Leu Trp Ala Leu Leu Asp Pro Asn Ser Asn Phe Trp Asn
 245 250 255
 Thr Ile Ala Ser Ser Gly Leu Phe Leu Pro Ser Asn Thr Ile Ala Pro
 260 265 270
 Phe Leu Gly Leu Leu Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gly Asp
 275 280 285
 Val Leu Gly Glu Ala Thr Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Leu Val Ala
 290 295 300
 Pro Leu Gly Ser Ala Gly Gly Leu Gly Gly Thr Val Ala Ala Gly Leu
 305 310 315 320
 Gly Asn Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr
 325 330 335
 Ala Ala Ala Pro Leu Ala Ser Pro Leu Gly Ser Ala Leu Gly Gly Thr
 340 345 350
 Pro Met Val Ala Pro Pro Pro Ala Val Ala Ala Gly Met Pro Gly Met
 355 360 365
 Pro Phe Gly Thr Met Gly Gly Gln Gly Phe Gly Arg Ala Val Pro Gln
 370 375 380
 Tyr Gly Phe Arg Pro Asn Phe Val Ala Arg Pro Pro Ala Ala Gly
 385 390 395
 <210> 7
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 7
 Met Ile Thr Asn Leu Arg Arg Arg Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Leu

1	5	10	15
Gly Ala Ala	Leu Gly Leu Gly Ile	Leu Leu Val Pro Thr	Val Asp Ala
	20	25	30
His Leu Ala	Asn Gly Ser Met	Ser Glu Val Met Met	Ser Glu Ile Ala
	35	40	45
Gly Leu Pro	Ile Pro Pro Ile	Ile His Tyr Gly	Ala Ile Ala Tyr Ala
	50	55	60
Pro Ser Gly	Ala Ser Gly Lys Ala	Trp His Gln Arg Thr	Pro Ala Arg
	65	70	80
Ala Glu Gln	Val Ala Leu Glu Lys	Cys Gly Asp Lys Thr	Cys Lys Val
	85	90	95
Val Ser Arg	Phe Thr Arg Cys Gly	Ala Val Ala Tyr Asn	Gly Ser Lys
	100	105	110
Tyr Gln Gly	Gly Thr Gly Leu Thr	Arg Arg Ala Ala	Glu Asp Asp Ala
	115	120	125
Val Asn Arg	Leu Glu Gly Gly	Arg Ile Val Asn	Trp Ala Cys Asn
	130	135	140
<210>	8		
<211>	325		
<212>	PRT		
<213>	Mycobacterium tuberculosis		
<400>	8		
Met Thr Asp	Val Ser Arg Lys Ile	Arg Ala Trp Gly Arg	Arg Leu Met
	1	5	10
Ile Gly Thr	Ala Ala Ala Val Val	Leu Pro Gly Leu Val	Gly Leu Ala
	20	25	30
Gly Gly Ala	Ala Thr Ala Gly Ala	Phe Ser Arg Pro Gly	Leu Pro Val
	35	40	45
Glu Tyr Leu	Gln Val Pro Ser	Pro Ser Met Gly Arg	Asp Ile Lys Val
	50	55	60
Gln Phe Gln	Ser Gly Gly Asn Asn	Ser Pro Ala Val Tyr	Leu Leu Asp
	65	70	80
Gly Leu Arg	Ala Gln Asp Asp Tyr	Asn Gly Trp Asp Ile	Asn Thr Pro
	85	90	95
Ala Phe Glu	Trp Tyr Tyr Gln Ser	Gly Leu Ser Ile Val	Met Pro Val
	100	105	110
Gly Gly Gln	Ser Ser Phe Tyr Ser	Asp Trp Tyr Ser Pro	Ala Cys Gly
	115	120	125
Lys Ala Gly	Cys Gln Thr Tyr	Lys Trp Glu Thr Phe	Leu Thr Ser Glu
	130	135	140

[0008]

Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser
 145 150 155 160
 Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala
 165 170 175
 Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu
 180 185 190
 Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met
 195 200 205
 Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser
 210 215 220
 Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro
 245 250 255
 Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe
 260 265 270
 Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly
 275 280 285
 Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp
 290 295 300
 Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser
 305 310 315 320
 Ser Leu Gly Ala Gly
 325
 <210> 9
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 9
 Met Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg Ile Ile Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val Asp Val Val
 20 25 30
 Arg Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr Asp Pro Gly
 35 40 45
 Gly Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu Gly Gly Cys
 50 55 60
 Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ala Gly Gly Ser Thr Gly Ser Leu Leu Met
 65 70 75 80
 Ala Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile Pro Ile Ala

	85	90	95
	Ala Ser Thr Arg 100	Glu Ser Phe Thr Val 105	Asn Glu Ser Arg Thr Ala Lys 110
	Gln Tyr Arg 115	Phe Val Leu Pro Gly 120	Pro Ser Leu Thr Val Ala Glu Gln 125
	Glu Gln Cys 130	Leu Asp Glu Leu Arg Gly 135	Ala Ala Ala Ser Ala Ala Phe 140
	Val Val Ala Ser 145	Gly Ser Leu Pro Pro Gly 150	Val Ala Ala Asp Tyr Tyr 155 160
	Gln Arg Val Ala 165	Asp Ile Cys Arg Arg Ser 170	Ser Thr Pro Leu Ile Leu 175
	Asp Thr Ser 180	Gly Gly Gly Leu Gln His 185	Ile Ser Ser Gly Val Phe Leu 190
	Leu Lys Ala 195	Ser Val Arg Glu Leu Arg 200	Glu Cys Val Gly Ser Glu Leu 205
	Leu Thr 210	Glu Pro Glu Gln Leu Ala 215	Ala Ala Ala His Glu Leu Ile Asp Arg 220
	Gly Arg Ala 225	Glu Val Val Val Ser Leu 230	Gly Ser Gln Gly Ala Leu 235 240
[0010]	Leu Ala Thr Arg 245	His Ala Ser His Arg Phe 250	Ser Ser Ile Pro Met Thr 255
	Ala Val Ser 260	Gly Val Gly Ala Gly Asp 265	Ala Met Val Ala Ala Ile Thr 270
	Val Gly Leu 275	Ser Arg Gly Trp Ser 280	Leu Ile Lys Ser Val Arg Leu Gly 285
	Asn Ala Ala 290	Gly Ala Ala Met Leu Leu 295	Thr Pro Gly Thr Ala Ala Cys 300
	Asn Arg Asp 305	Asp Val Glu Arg Phe Phe 310	Glu Leu Ala Ala Glu Pro Thr 315 320
	Glu Val Gly 325	Gln Asp Gln Tyr Val Trp 330	His Pro Ile Val Asn Pro Glu 335
	Ala Ser Pro		
	<210> 10		
	<211> 143		
	<212> PRT		
	<213> Mycobacterium tuberculosis		
	<400> 10		
	Met Thr Thr Ala Arg 1 5	Asp Ile Met Asn Ala Gly 10	Val Thr Cys Val Gly 15

Glu His Glu Thr Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp
 20 25 30
 Ile Gly Ala Leu Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met
 35 40 45
 Leu Thr Asp Arg Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp
 50 55 60
 Pro Asn Thr Ala Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Val Asp Ala Asn Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu
 85 90 95
 His Gln Val Arg Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly
 100 105 110
 Ile Val Thr Glu Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile
 115 120 125
 Val Gln Phe Val Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser
 130 135 140
 <210> 11
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 [0011] <400> 11
 Met Thr Pro Gly Leu Leu Thr Thr Ala Gly Ala Gly Arg Pro Arg Asp
 1 5 10 15
 Arg Cys Ala Arg Ile Val Cys Thr Val Phe Ile Glu Thr Ala Val Val
 20 25 30
 Ala Thr Met Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Ser Thr Ile Ser Ser Lys
 35 40 45
 Ala Asp Asp Ile Asp Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Glu Ser Gly Gly
 50 55 60
 Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile
 65 70 75 80
 Ser Gln Ala Thr Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala
 85 90 95
 Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr
 100 105 110
 Gln Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp
 115 120 125
 Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu
 130 135 140
 Thr Gly Gly Cys Ser Gly Ser Arg Asp Asp

[0013]

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

Trp Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr
 165 170 175

Asn Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile
 180 185 190

Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu
 195 200 205

Gln Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu
 210 215 220

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

Val Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val
 245 250 255

Ser Met Thr Asn Thr Leu His Ser Met Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala
 260 265 270

Ala Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met
 275 280 285

Ser Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu
 290 295 300

Gly Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro
 325 330 335

Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr
 340 345 350

Ala Pro Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly His Ser Val Asn
 355 360 365

Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro Ala Arg Ala Tyr
 370 375 380

Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly
 385 390

<210> 14
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 14

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

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

<210> 15
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> N-terminal truncated Rv0111 antigen (393-685)

<400> 15

[0014] Glu Gln Pro Ile Arg Arg Trp Arg Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val
 20 25 30
 Val Pro Val Gly Ala Gly Pro Gly Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro
 35 40 45
 Gly Val Ser Ala Val Ala Ala Val Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser
 50 55 60
 Gln Pro Ala Pro Gly Pro Arg Asp Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Val Phe Gly Asp Ser Ile Gly Trp Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro
 85 90 95
 Thr Pro Gly Phe Arg Phe Ile Asp His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu
 100 105 110
 Val Arg Gly Thr Pro Tyr Arg Tyr Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg
 115 120 125
 Ala Glu Cys Asp Gly Trp Pro Ala Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg
 130 135 140
 Asp Gln Pro Asp Val Ala Leu Leu Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Asp Arg Val Asn Glu Gly Arg Trp Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe
 165 170 175
 Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser Ile Val Gly

Asp His Val Val Pro Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln
 145 150 155 160
 Ile Gln Val Thr Arg Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro
 165 170 175
 Leu Pro Pro Asn Ala Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser
 180 185 190
 Arg Glu Val Val Glu Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr
 195 200 205
 Phe Ala Val Ala Glu Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val
 210 215 220
 Ala Asn Val Val Val Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Pro Gly Thr Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser
 245 250

<210> 17
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> N-terminal truncated Rv1733c (63-210) without peptide signal
 <400> 17

[0016]

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

<210> 18
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> C-terminal truncated Rv1807 (1-339)

 <400> 18
 Leu Asp Phe Ala Thr Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr
 1 5 10 15
 Ser Gly Ala Gly Ser Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp His
 20 25 30
 Gly Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ala Ser Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Val
 35 40 45
 Leu Ser Thr Leu Thr Gly Glu Glu Trp His Gly Pro Ala Ser Ala Ser
 50 55 60
 Met Thr Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Glu Gln Ala Gly Ala Gln Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala
 85 90 95
 Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Ala Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Glu Ala
 100 105 110
 [0017] Asn Arg Ala Gln Leu Met Ala Leu Ile Ala Thr Asn Val Leu Gly Gln
 115 120 125
 Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Thr Glu Ala Gln Tyr Ala Glu Met Trp
 130 135 140
 Ser Gln Asp Ala Met Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Ala
 145 150 155 160
 Ala Thr Gln Leu Thr Pro Phe Thr Glu Pro Val Gln Thr Thr Asn Ala
 165 170 175
 Ser Gly Leu Ala Ala Gln Ser Ala Ala Ile Ala His Ala Thr Gly Ala
 180 185 190
 Ser Ala Gly Ala Gln Gln Thr Thr Leu Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ile
 195 200 205
 Pro Ser Val Leu Gln Gly Leu Ser Ser Ser Thr Ala Ala Thr Phe Ala
 210 215 220
 Ser Gly Pro Ser Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Ser Trp
 225 230 235 240
 Leu Asp Lys Leu Trp Ala Leu Leu Asp Pro Asn Ser Asn Phe Trp Asn
 245 250 255
 Thr Ile Ala Ser Ser Gly Leu Phe Leu Pro Ser Asn Thr Ile Ala Pro
 260 265 270

Phe Leu Gly Leu Leu Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gly Asp
275 280 285

Val Leu Gly Glu Ala Thr Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Leu Val Ala
290 295 300

Pro Leu Gly Ser Ala Gly Gly Leu Gly Gly Thr Val Ala Ala Gly Leu
305 310 315 320

Gly Asn Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr
325 330 335

Ala Ala Ala

<210> 19
<211> 109
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> N-terminal truncated Rv1813 (35-143) without signal peptide

<400> 19

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

Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala Pro Ser
20 25 30

[0018]

Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg Ala Glu
35 40 45

Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val Val Ser
50 55 60

Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys Tyr Gln
65 70 75 80

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

Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn
100 105

<210> 20
<211> 286
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> N-terminal truncated Ag85B (40-325) without signal peptide

<400> 20

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

Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn
20 25 30

Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp
 35 40 45
 Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln
 50 55 60
 Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr
 65 70 75 80
 Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr
 85 90 95
 Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala
 100 105 110
 Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met
 115 120 125
 Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe
 130 135 140
 Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met
 145 150 155 160
 Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys
 165 170 175
 Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn
 180 185 190
 Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu
 195 200 205
 Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn
 210 215 220
 Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys
 225 230 235 240
 Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn
 245 250 255
 Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu
 260 265 270
 Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly
 275 280 285
 <210> 21
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> C-terminal truncated (2-314) and mutated D265N Rv2029c
 <400> 21
 Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg Ile Ile Thr Leu
 1 5 10 15

Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val Asp Val Val Arg
 20 25 30
 Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr Asp Pro Gly Gly
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu Gly Gly Cys Ser
 50 55 60
 Thr Ala Leu Phe Pro Ala Gly Gly Ser Thr Gly Ser Leu Leu Met Ala
 65 70 75 80
 Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile Pro Ile Ala Ala
 85 90 95
 Ser Thr Arg Glu Ser Phe Thr Val Asn Glu Ser Arg Thr Ala Lys Gln
 100 105 110
 Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val Ala Glu Gln Glu
 115 120 125
 Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser Ala Ala Phe Val
 130 135 140
 Val Ala Ser Gly Ser Leu Pro Pro Gly Val Ala Ala Asp Tyr Tyr Gln
 145 150 155 160
 [0020] Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro Leu Ile Leu Asp
 165 170 175
 Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly Val Phe Leu Leu
 180 185 190
 Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly Ser Glu Leu Leu
 195 200 205
 Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala Ala His Glu Leu Ile Asp Arg Gly
 210 215 220
 Arg Ala Glu Val Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln Gly Ala Leu Leu
 225 230 235 240
 Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile Pro Met Thr Ala
 245 250 255
 Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asn Ala Met Val Ala Ala Ile Thr Val
 260 265 270
 Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val Arg Leu Gly Asn
 275 280 285
 Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr Ala Ala Cys Asn
 290 295 300
 Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu
 305 310

<210> 22
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> catalytic domain RpfD

 <400> 22
 Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala
 1 5 10 15
 Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala
 20 25 30
 Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln
 35 40 45
 Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly
 50 55 60
 Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly
 85 90 95

[0021]

<210> 23
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> C-terminal truncated Rv3407 (2-66)

 <400> 23
 Arg Ala Thr Val Gly Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Arg Glu Leu Arg
 1 5 10 15
 Gln His Ala Ser Arg Tyr Leu Ala Arg Val Glu Ala Gly Glu Glu Leu
 20 25 30
 Gly Val Thr Asn Lys Gly Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile Pro Val Gln
 35 40 45
 Ala Ala Glu Arg Ser Arg Glu Ala Leu Ile Glu Ser Gly Val Leu Ile
 50 55 60
 Pro
 65

<210> 24
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> C-terminal truncated Rv3478 (2-353)

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

Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp Asp
20 25 30

Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val
35 40 45

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

Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala
65 70 75 80

Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala
85 90 95

Tyr Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu
100 105 110

Asn Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln
115 120 125

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

Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Thr
145 150 155 160

[0022] Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr Asn
165 170 175

Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp
180 185 190

Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln
195 200 205

Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly
210 215 220

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

Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val Ser
245 250 255

Met Thr Asn Thr Leu His Ser Met Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Ala
260 265 270

Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met Ser
275 280 285

Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly
290 295 300

Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu
305 310 315 320

Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala
325 330 335

Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr Ala
340 345 350

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> FLAG tag

<400> 25

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> MYC tag

<400> 26

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

[0023] <210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> His tag

<400> 27

His His His His His His
1 5

<210> 28
<211> 589
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> fusion "SS-Flag-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His tag"

<400> 28

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
20 25 30

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro
35 40 45

Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn
50 55 60

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

[0024]

370	375	380
Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met 385 390 395 400		
Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln 405 410 415		
Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn 420 425 430		
Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr 435 440 445		
Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly 450 455 460		
Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu 465 470 475 480		
Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser 485 490 495		
Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser 500 505 510		
Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala 515 520 525		
Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg 530 535 540		
Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser 545 550 555 560		
Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys 565 570 575		
Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu His His His His His His 580 585		
<210> 29		
<211> 500		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> fusion "Flag-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-His tag"		
<400> 29		
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu 1 5 10 15		
Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile 20 25 30		
Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu 35 40 45		

[0025]

Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn
 50 55 60

Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met
 65 70 75 80

Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala
 85 90 95

Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr
 100 105 110

Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr
 115 120 125

Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile
 130 135 140

Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu
 165 170 175

Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro
 180 185 190

Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro
 195 200 205

[0026]

Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly
 210 215 220

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

Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala
 245 250 255

Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His
 260 265 270

Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu
 275 280 285

Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala
 290 295 300

Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln
 305 310 315 320

Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala
 325 330 335

Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp
 340 345 350

Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser

Ala Met Thr Asp Thr Ala Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val
115 120 125

Pro Leu Ser Gly Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln
130 135 140

Leu Asn Asp Gly Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn
145 150 155 160

Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp
165 170 175

His Val Val Pro Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile
180 185 190

Gln Val Thr Arg Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu
195 200 205

Pro Pro Asn Ala Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg
210 215 220

Glu Val Val Glu Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe
225 230 235 240

Ala Val Ala Glu Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala
245 250 255

Asn Val Val Val Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr
260 265 270

[0028]

Lys Pro Gly Thr Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp
275 280 285

Ala Ile Ala Gln Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly
290 295 300

Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser
305 310 315 320

Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile
325 330 335

Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro
340 345 350

Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr
355 360 365

His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Glu Gln Lys Leu
370 375 380

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu
385 390 395 400

Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val
405 410 415

Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn

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

[0030]

<210> 32
 <211> 938
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> fusion "SS-Flag-RFPB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His tag"
 <400> 32
 Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr
 20 25 30
 Val Asp Gly Thr Ala Met Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile
 35 40 45
 Asp Ile Val Glu Glu Asn Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp Leu
 50 55 60
 Tyr Pro Ala Ala Gly Val Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu
 65 70 75 80
 Arg Arg Ser Arg Pro Leu Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys
 85 90 95
 Gln Val Trp Thr Thr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu
 100 105 110

Ala Met Thr Asp Thr Ala Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val
115 120

Pro Leu Ser Gly Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln
130 135 140

Leu Asn Asp Gly Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn
145 150 155 160

Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp
165 170 175

His Val Val Pro Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile
180 185 190

Gln Val Thr Arg Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu
195 200 205

Pro Pro Asn Ala Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg
210 215 220

Glu Val Val Glu Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe
225 230 235 240

Ala Val Ala Glu Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala
245 250 255

[0031] Asn Val Val Val Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr
260 265 270

Lys Pro Gly Thr Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp
275 280 285

Ala Ile Ala Gln Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly
290 295 300

Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser
305 310 315 320

Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile
325 330 335

Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro
340 345 350

Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr
355 360 365

His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Ala Phe Ser Arg
370 375 380

Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly
385 390 395 400

Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala
405 410 415

Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp
 420 425 430
 Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser
 435 440 445
 Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr
 450 455 460
 Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr
 465 470 475 480
 Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val
 485 490 495
 Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser
 500 505 510
 Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly
 515 520 525
 Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu
 530 535 540
 Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met
 545 550 555 560
 Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln
 565 570 575
 Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys
 580 585 590
 Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu
 595 600 605
 Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala
 610 615 620
 Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn
 625 630 635 640
 Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys
 645 650 655
 Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile Met Tyr Asn
 660 665 670
 Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly
 675 680 685
 Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu
 690 695 700
 Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln
 705 710 715 720
 Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala

[0032]

	725								730										735
	Met	Ser	Ser	Thr	His	Glu	Ala	Asn	Thr	Met	Ala	Met	Met	Ala	Arg	Asp			
				740					745					750					
	Thr	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	Trp	Gly	Gly	Thr	Glu	Gln	Gln	Trp	Asn	Phe			
			755					760					765						
	Ala	Gly	Ile	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Gln	Gly	Asn	Val	Thr	Ser			
		770					775					780							
	Ile	His	Ser	Leu	Leu	Asp	Glu	Gly	Lys	Gln	Ser	Leu	Thr	Lys	Leu	Ala			
	785					790					795					800			
	Ala	Ala	Trp	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Gln	Gly	Val	Gln	Gln			
				805						810					815				
	Lys	Trp	Asp	Ala	Thr	Ala	Thr	Glu	Leu	Asn	Asn	Ala	Leu	Gln	Asn	Leu			
				820					825					830					
	Ala	Arg	Thr	Ile	Ser	Glu	Ala	Gly	Gln	Ala	Met	Ala	Ser	Thr	Glu	Gly			
			835					840					845						
	Asn	Val	Thr	Gly	Met	Phe	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp			
		850					855					860							
	Leu	Ser	Tyr	Val	Leu	Leu	Ser	Ala	Gly	Thr	Leu	Ile	Ala	Leu	Met	Leu			
	865					870					875				880				
[0033]																			
	Ile	Ile	Phe	Leu	Ile	Thr	Cys	Cys	Lys	Arg	Val	Asp	Arg	Pro	Glu	Ser			
				885						890					895				
	Thr	Gln	Arg	Ser	Leu	Arg	Gly	Thr	Gly	Arg	Asn	Val	Ser	Val	Thr	Ser			
				900					905					910					
	Gln	Ser	Gly	Lys	Phe	Ile	Ser	Ser	Trp	Glu	Ser	His	Lys	Ser	Gly	Gly			
			915					920					925						
	Glu	Thr	Arg	Leu	His														
		930					935												
	<210>	33																	
	<211>	849																	
	<212>	PRT																	
	<213>	artificial sequence																	
	<220>																		
	<223>	fusion "Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-His tag"																	
	<400>	33																	
	Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Thr	Val	Asp	Gly	Thr	Ala	Met			
	1				5					10					15				
	Arg	Val	Thr	Thr	Met	Lys	Ser	Arg	Val	Ile	Asp	Ile	Val	Glu	Glu	Asn			
				20					25					30					
	Gly	Phe	Ser	Val	Asp	Asp	Arg	Asp	Asp	Leu	Tyr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val			
			35					40					45						

[0034]

Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu Arg Arg Ser Arg Pro Leu
 50 55 60

Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys Gln Val Trp Thr Thr Ala
 65 70 75 80

Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu Ala Met Thr Asp Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val Pro Leu Ser Gly Met Ala
 100 105 110

Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln Leu Asn Asp Gly Gly Leu
 115 120 125

Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn Val Ala Gly Leu Leu Ser
 130 135 140

Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp His Val Val Pro Ala Ala
 145 150 155 160

Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val Thr Arg Asn Arg
 165 170 175

Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu Pro Pro Asn Ala Arg Arg
 180 185 190

Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val Val Glu Asp Pro
 195 200 205

Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe Ala Val Ala Glu Val Asn
 210 215 220

Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala Asn Val Val Val Thr Pro
 225 230 235 240

Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro Gly Thr Glu Val
 245 250 255

Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Lys
 260 265 270

Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly
 275 280 285

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

Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile
 305 310 315 320

Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser
 325 330 335

Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu
 340 345 350

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

Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly
675 680 685

Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala
690 695 700

Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu
705 710 715 720

Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys
725 730 735

Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala
740 745 750

Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp
755 760 765

Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser
770 775 780

Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala
785 790 795 800

Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu
805 810 815

[0036] Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe
820 825 830

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His
835 840 845

His

<210> 34
<211> 1198
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> fusion "SS-Flag-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-TM-His
tag"

<400> 34

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys
20 25 30

Ala Lys Val Gly Asp Trp Leu Val Ile Lys Gly Ala Thr Ile Asp Gln
35 40 45

Pro Asp His Arg Gly Leu Ile Ile Glu Val Arg Ser Ser Asp Gly Ser
50 55 60

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

[0037]

370	375	380
Ser 385	Ser Ala Gly Leu Met 390	Ala Ala Ala Ala Ser 395
Pro 385	Val Thr Ala Gly Gln Ala Gln 405	Pro Tyr Val Ala Trp 400
Met 385	Val Thr Ala Gly Gln Ala Gln 410	Val Arg 415
Val 385	Ala Ala Tyr Glu Thr Ala 425	Leu Thr Val Pro Pro 430
Pro 385	Val Ile 435	Ala Glu Asn Arg Thr 440
Pro 385	Glu Leu Met Thr 445	Leu Thr Ala Thr 445
Asn 450	Leu Gly Gln Asn Thr 455	Pro Ala Ile Glu Ala 460
Tyr 465	Ser Gln Met Trp Gly 470	Gln Asp Ala Glu Ala 475
Tyr 465	Met Trp Gly Gln Asp Ala Glu 475	Met Tyr Gly Tyr Ala 480
Ala 485	Thr Ala Thr Glu Ala Leu 490	Leu Pro Phe Glu Asp Ala 495
Pro 500	Leu Ile Thr 500	Asn Pro Gly Gly Leu 505
Pro 500	Leu Ile Thr 500	Leu Glu Gln Ala Val Ala Val 510
Glu 515	Glu Ala Ile Asp Thr Ala Ala 520	Ala Asn Gln Leu Met 525
Glu 515	Ala Ile Asp Thr Ala Ala 520	Ala Asn Gln Leu Met 525
[0038]	Pro Gln 530	Ala Leu Gln Gln Leu 535
Pro 530	Ala Leu Gln Gln Leu 535	Ala Gln Pro Ala Gln 540
Ser 545	Ser Lys Leu Gly Gly 550	Leu Trp Thr Ala Val 555
Ser 545	Lys Leu Gly Gly 550	Leu Trp Thr Ala Val 555
Pro 565	Leu Ser Asn Val 565	Ser Ser Ile Ala Asn 570
Pro 565	Leu Ser Asn Val 565	Ser Ser Ile Ala Asn 570
Gly 585	Thr Gly Val Ser Met Thr Asn Thr 585	Leu His Ser Met Leu Lys Gly 590
Gly 585	Thr Gly Val Ser Met Thr Asn Thr 585	Leu His Ser Met Leu Lys Gly 590
Leu 595	Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala 600	Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly 605
Leu 595	Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala 600	Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly 605
Val 610	Trp Ala Met Ser Ser Leu 615	Gly Ser Gln Leu Gly 620
Val 610	Trp Ala Met Ser Ser Leu 615	Gly Ser Gln Leu Gly 620
Ser 625	Ser Gly Leu Gly Ala 630	Gly Val Ala Ala Asn 635
Ser 625	Gly Leu Gly Ala 630	Gly Val Ala Ala Asn 635
Ser 645	Val Gly Ser Leu 645	Ser Val Pro Pro Ala Trp 650
Ser 645	Val Gly Ser Leu 645	Ser Val Pro Pro Ala Trp 650
Ala 660	Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu 665	Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser 670
Ala 660	Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu 665	Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser 670
Ala 675	Ala Gln Thr Ala Pro Gly His 680	Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly 685
Ala 675	Ala Gln Thr Ala Pro Gly His 680	Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly 685

His Ser Val Asn Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro
 690 695 700
 Ala Arg Ala Tyr Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly Asp Phe Ala
 705 710 715
 Thr Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ser Gly Ala Gly
 725 730 735
 Ser Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp His Gly Leu Ser Ala
 740 745 750
 Glu Leu Arg Ala Ser Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Val Leu Ser Thr Leu
 755 760 765
 Thr Gly Glu Glu Trp His Gly Pro Ala Ser Ala Ser Met Thr Ala Ala
 770 775 780
 Ala Ala Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Val Arg Ala Glu
 785 790 795 800
 Gln Ala Gly Ala Gln Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Ala Ala
 805 810 815
 Phe Ala Ala Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Glu Ala Asn Arg Ala Gln
 820 825 830
 [0039] Leu Met Ala Leu Ile Ala Thr Asn Val Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala
 835 840 845
 Ile Ala Ala Thr Glu Ala Gln Tyr Ala Glu Met Trp Ser Gln Asp Ala
 850 855 860
 Met Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Thr Gln Leu
 865 870 875 880
 Thr Pro Phe Thr Glu Pro Val Gln Thr Thr Asn Ala Ser Gly Leu Ala
 885 890 895
 Ala Gln Ser Ala Ala Ile Ala His Ala Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ala
 900 905 910
 Gln Gln Thr Thr Leu Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ile Pro Ser Val Leu
 915 920 925
 Gln Gly Leu Ser Ser Ser Thr Ala Ala Thr Phe Ala Ser Gly Pro Ser
 930 935 940
 Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Ser Trp Leu Asp Lys Leu
 945 950 955 960
 Trp Ala Leu Leu Asp Pro Asn Ser Asn Phe Trp Asn Thr Ile Ala Ser
 965 970 975
 Ser Gly Leu Phe Leu Pro Ser Asn Thr Ile Ala Pro Phe Leu Gly Leu
 980 985 990

Leu Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gly Asp Val Leu Gly Glu
 995 1000 1005

Ala Thr Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Leu Val Ala Pro Leu Gly
 1010 1015 1020

Ser Ala Gly Gly Leu Gly Gly Thr Val Ala Ala Gly Leu Gly Asn
 1025 1030 1035

Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr Ala
 1040 1045 1050

Ala Ala Pro Leu Ala Ser Pro Leu Gly Ser Ala Leu Gly Gly Thr
 1055 1060 1065

Pro Met Val Ala Pro Pro Pro Ala Val Ala Ala Gly Met Pro Gly
 1070 1075 1080

Met Pro Phe Gly Thr Met Gly Gly Gln Gly Phe Gly Arg Ala Val
 1085 1090 1095

Pro Gln Tyr Gly Phe Arg Pro Asn Phe Val Ala Arg Pro Pro Ala
 1100 1105 1110

Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val
 1115 1120 1125

[0040] Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
 1130 1135 1140

Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln
 1145 1150 1155

Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr Ser Gln
 1160 1165 1170

Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly
 1175 1180 1185

Glu Thr Arg Leu His His His His His His
 1190 1195

<210> 35
 <211> 1109
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> fusion "Flag-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-His tag"

<400> 35

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Ala Lys Val Gly Asp Trp
 1 5 10 15

Leu Val Ile Lys Gly Ala Thr Ile Asp Gln Pro Asp His Arg Gly Leu
 20 25 30

Ile Ile Glu Val Arg Ser Ser Asp Gly Ser Pro Pro Tyr Val Val Arg
 35 40 45

Trp Leu Glu Thr Asp His Val Ala Thr Val Ile Pro Gly Pro Asp Ala
 50 55 60
 Val Val Val Thr Ala Glu Glu Gln Asn Ala Ala Asp Glu Arg Ala Gln
 65 70 75 80
 His Arg Phe Gly Ala Val Gln Ser Ala Ile Leu His Ala Arg Gly Thr
 85 90 95
 Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met Ser Glu Ile Ala Gly Leu
 100 105 110
 Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala Pro Ser
 115 120 125
 Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg Ala Glu
 130 135 140
 Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val Val Ser
 145 150 155 160
 Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys Tyr Gln
 165 170 175
 Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala Glu Asp Asp Ala Val Asn
 180 185 190
 [0041] Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn Arg Ala Thr
 195 200 205
 Val Gly Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Arg Glu Leu Arg Gln His Ala
 210 215 220
 Ser Arg Tyr Leu Ala Arg Val Glu Ala Gly Glu Glu Leu Gly Val Thr
 225 230 235 240
 Asn Lys Gly Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile Pro Val Gln Ala Ala Glu
 245 250 255
 Arg Ser Arg Glu Ala Leu Ile Glu Ser Gly Val Leu Ile Pro Ala Arg
 260 265 270
 Arg Pro Gln Asn Leu Leu Asp Val Thr Ala Glu Pro Ala Arg Gly Arg
 275 280 285
 Lys Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Asn Glu Met Arg Asp Glu Gln Val
 290 295 300
 Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala
 305 310 315 320
 Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp Asp Ser
 325 330 335
 Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val
 340 345 350

Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met
 355 360 365
 Ala Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly
 370 375 380
 Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr
 385 390 395 400
 Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn
 405 410 415
 Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn
 420 425 430
 Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met Trp Gly
 435 440 445
 Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 450 455 460
 Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr Asn Pro
 465 470 475 480
 Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp Thr
 485 490 495
 [0042] Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln
 500 505 510
 Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly
 515 520 525
 Leu Trp Thr Ala Val Ser Pro His Leu Ser Pro Leu Ser Asn Val Ser
 530 535 540
 Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val Ser Met
 545 550 555 560
 Thr Asn Thr Leu His Ser Met Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Ala Ala
 565 570 575
 Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met Ser Ser
 580 585 590
 Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Ala
 595 600 605
 Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser
 610 615 620
 Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala
 625 630 635 640
 Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr Ala Pro
 645 650 655

[0043]

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

965	970	975
Ala Asp Ala 980	Ala Gly Asp Val Leu 985	Gly Glu Ala Thr Ser Gly Gly Leu 990
Gly Gly Ala 995	Leu Val Ala Pro Leu 1000	Gly Ser Ala Gly Gly Leu Gly Gly 1005
Thr Val 1010	Ala Ala Gly Leu Gly 1015	Asn Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu 1020
Ser Val 1025	Pro Pro Ser Trp Thr 1030	Ala Ala Ala Pro Leu Ala Ser Pro 1035
Leu Gly 1040	Ser Ala Leu Gly Gly 1045	Thr Pro Met Val Ala Pro Pro Pro 1050
Ala Val 1055	Ala Ala Gly Met Pro 1060	Gly Met Pro Phe Gly Thr Met Gly 1065
Gly Gln 1070	Gly Phe Gly Arg Ala 1075	Val Pro Gln Tyr Gly Phe Arg Pro 1080
Asn Phe 1085	Val Ala Arg Pro Pro 1090	Ala Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile 1095
Ser 1100	Glu Asp Leu His 1105	His His His His

[0044]

<210> 36
 <211> 973
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> fusion "SS-Flag-Ag85B*-Rv2626-RPFb-Dhyb-Rv1733c*-Myc-His tag"

<400> 36

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

Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys
 115 120 125
 Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn
 130 135 140
 Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile
 165 170 175
 Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly
 180 185 190
 Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp
 210 215 220
 Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp
 225 230 235 240
 Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile
 245 250 255
 Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe
 260 265 270
 Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe
 275 280 285
 Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn
 290 295 300
 Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Thr Thr Ala
 305 310 315 320
 Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly Glu His Glu Thr
 325 330 335
 Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met Leu Thr Asp Arg
 355 360 365
 Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala
 370 375 380
 Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn
 385 390 395 400
 Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg
 405 410 415
 Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu

[0045]

420	425	430
Ala Asp Ile 435	Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val 440	
Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Thr Val Asp Gly Thr 450	455	460
Ala Met Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile Asp Ile Val Glu 465	470	475
Glu Asn Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp Leu Tyr Pro Ala Ala 485	490	495
Gly Val Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu Arg Arg Ser Arg 500	505	510
Pro Leu Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys Gln Val Trp Thr 515	520	525
Thr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu Ala Met Thr Asp 530	535	540
Thr Ala Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val Pro Leu Ser Gly 545	550	555
Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln Leu Asn Asp Gly 565	570	575
[0046] Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn Val Ala Gly Leu 580	585	590
Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp His Val Val Pro 595	600	605
Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val Thr Arg 610	615	620
Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu Pro Pro Asn Ala 625	630	635
Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val Val Glu 645	650	655
Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe Ala Val Ala Glu 660	665	670
Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala Asn Val Val Val 675	680	685
Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro Gly Thr 690	695	700
Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln 705	710	715
Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr 725	730	735

Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val
 740 745 750
 Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp
 755 760 765
 Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser
 770 775 780
 Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr
 785 790 795 800
 Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Ala Gly Thr Ala Val Gln Asp Ser
 805 810 815
 Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His Pro Ala Thr
 820 825 830
 Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn Thr Thr Ala
 835 840 845
 Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala Arg Trp Val
 850 855 860
 Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys Pro Gly Thr
 865 870 875 880
 [0047] Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala Gly Gln Leu
 885 890 895
 Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp Ala Ala Leu
 900 905 910
 Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala Gly Ala Leu
 915 920 925
 Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn Ala Ser Trp
 930 935 940
 Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu Gln Lys Leu
 945 950 955 960
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His His His His His His
 965 970
 <210> 37
 <211> 624
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> fusion "SS-Flag-Ag85B*-Rv2626-Rv1733c*-Myc-His tag"
 <400> 37
 Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15
 Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Ala

	20		25		30
	Phe Ser Arg	Pro Gly Leu Pro	Val Glu Tyr Leu Gln	Val Pro Ser Pro	
	35		40	45	
	Ser Met Gly Arg Asp Ile	Lys Val Gln Phe Gln	Ser Gly Gly Asn Asn		
	50	55	60		
	Ser Pro Ala Val Tyr Leu	Leu Asp Gly Leu Arg	Ala Gln Asp Asp Tyr		
	65	70	75	80	
	Asn Gly Trp Asp Ile	Asn Thr Pro Ala Phe	Glu Trp Tyr Tyr Gln	Ser	
	85	90	95		
	Gly Leu Ser Ile	Val Met Pro Val Gly	Gly Gln Ser Ser Phe	Tyr Ser	
	100	105	110		
	Asp Trp Tyr Ser	Pro Ala Cys Gly Lys	Ala Gly Cys Gln Thr	Tyr Lys	
	115	120	125		
	Trp Glu Thr Phe Leu Thr	Ser Glu Leu Pro Gln	Trp Leu Ser Ala Asn		
	130	135	140		
	Arg Ala Val Lys Pro Thr	Gly Ser Ala Ala Ile	Gly Leu Ser Met Ala		
	145	150	155	160	
	Gly Ser Ser Ala Met	Ile Leu Ala Ala Tyr	His Pro Gln Gln Phe	Ile	
	165	170	175		
[0048]	Tyr Ala Gly Ser	Leu Ser Ala Leu Leu	Asp Pro Ser Gln Gly	Met Gly	
	180	185	190		
	Pro Ser Leu Ile Gly	Leu Ala Met Gly	Asp Ala Gly Gly Tyr	Lys Ala	
	195	200	205		
	Ala Asp Met Trp Gly	Pro Ser Ser Asp	Pro Ala Trp Glu Arg	Asn Asp	
	210	215	220		
	Pro Thr Gln Gln Ile	Pro Lys Leu Val Ala	Asn Asn Thr Arg Leu	Trp	
	225	230	235	240	
	Val Tyr Cys Gly	Asn Gly Thr Pro Asn	Glu Leu Gly Gly Ala	Asn Ile	
	245	250	255		
	Pro Ala Glu Phe	Leu Glu Asn Phe Val	Arg Ser Ser Asn Leu	Lys Phe	
	260	265	270		
	Gln Asp Ala Tyr	Asn Ala Ala Gly	Gly His Asn Ala Val	Phe Asn Phe	
	275	280	285		
	Pro Pro Asn Gly Thr	His Ser Trp Glu Tyr	Trp Gly Ala Gln Leu	Asn	
	290	295	300		
	Ala Met Lys Gly Asp	Leu Gln Ser Ser Leu	Gly Ala Gly Thr Thr	Ala	
	305	310	315	320	
	Arg Asp Ile Met	Asn Ala Gly Val Thr	Cys Val Gly Glu His	Glu Thr	
	325	330	335		

Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met Leu Thr Asp Arg
 355 360 365
 Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala
 370 375 380
 Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn
 385 390 395 400
 Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg
 405 410 415
 Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu
 420 425 430
 Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val
 435 440 445
 Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Ala Gly Thr Ala Val
 450 455 460
 Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His
 465 470 475 480
 [0049] Pro Ala Thr Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn
 485 490 495
 Thr Thr Ala Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala
 500 505 510
 Arg Trp Val Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys
 515 520 525
 Pro Gly Thr Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala
 530 535 540
 Gly Gln Leu Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp
 545 550 555 560
 Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala
 565 570 575
 Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn
 580 585 590
 Ala Ser Trp Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu
 595 600 605
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His His His His His
 610 615 620
 <210> 38
 <211> 949
 <212> PRT

<213> artificial sequence
 <220>
 <223> fusion "SS-Flag-Rv2029c*-Rv2626-Rv1733c*-Rv0111*-Myc-His tag"
 <400> 38
 Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asp Tyr Lys Asp
 20 25 30
 Asp Asp Asp Lys Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg
 35 40 45
 Ile Ile Thr Leu Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val
 50 55 60
 Asp Val Val Arg Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr
 65 70 75 80
 Asp Pro Gly Gly Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu
 85 90 95
 Gly Gly Cys Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ala Gly Gly Ser Thr Gly Ser
 100 105 110
 Leu Leu Met Ala Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile
 115 120 125
 Pro Ile Ala Ala Ser Thr Arg Glu Ser Phe Thr Val Asn Glu Ser Arg
 130 135 140
 Thr Ala Lys Gln Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val
 145 150 155 160
 Ala Glu Gln Glu Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser
 165 170 175
 Ala Ala Phe Val Val Ala Ser Gly Ser Leu Pro Pro Gly Val Ala Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Tyr Gln Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro
 195 200 205
 Leu Ile Leu Asp Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly
 210 215 220
 Val Phe Leu Leu Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly
 225 230 235 240
 Ser Glu Leu Leu Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala Ala His Glu Leu
 245 250 255
 Ile Asp Arg Gly Arg Ala Glu Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln
 260 265 270
 Gly Ala Leu Leu Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile
 275 280 285

[0050]

Pro Met Thr Ala Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asn Ala Met Val Ala
 290 295 300

Ala Ile Thr Val Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val
 305 310 315 320

Arg Leu Gly Asn Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr
 325 330 335

Ala Ala Cys Asn Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu Thr Thr Ala
 340 345 350

Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly Glu His Glu Thr
 355 360 365

Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu
 370 375 380

Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met Leu Thr Asp Arg
 385 390 395 400

Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala
 405 410 415

Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn
 420 425 430

[0051] Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg
 435 440 445

Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu
 450 455 460

Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val
 465 470 475 480

Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Ala Gly Thr Ala Val
 485 490 495

Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His
 500 505 510

Pro Ala Thr Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn
 515 520 525

Thr Thr Ala Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala
 530 535 540

Arg Trp Val Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys
 545 550 555 560

Pro Gly Thr Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala
 565 570 575

Gly Gln Leu Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp
 580 585 590

Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala
595 600 605

Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn
610 615 620

Ala Ser Trp Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu
625 630 635 640

Gln Pro Ile Arg Arg Trp Arg Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu
645 650 655

Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val Val
660 665 670

Pro Val Gly Ala Gly Pro Gly Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro Gly
675 680 685

Val Ser Ala Val Ala Ala Val Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser Gln
690 695 700

Pro Ala Pro Gly Pro Arg Asp Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser Val
705 710 715 720

Phe Gly Asp Ser Ile Gly Trp Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro Thr
725 730 735

[0052] Pro Gly Phe Arg Phe Ile Asp His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu Val
740 745 750

Arg Gly Thr Pro Tyr Arg Tyr Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg Ala
755 760 765

Glu Cys Asp Gly Trp Pro Ala Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg Asp
770 775 780

Gln Pro Asp Val Ala Leu Leu Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val Asp
785 790 795 800

Arg Val Asn Glu Gly Arg Trp Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe Asp
805 810 815

Ala Tyr Leu Asn Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser Ile Val Gly Ser
820 825 830

Thr Gly Val Arg Val Met Val Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly Gly
835 840 845

Glu Lys Pro Asp Gly Arg Leu Tyr Pro Glu Asp Gln Pro Glu Arg Val
850 855 860

Asn Lys Trp Asn Ala Met Leu His Asn Ala Ile Ser Gln His Ser Asn
865 870 875 880

Val Gly Met Ile Asp Leu Asn Lys Lys Leu Cys Pro Asp Gly Val Tyr
885 890 895

Thr Ala Lys Val Asp Gly Ile Lys Val Arg Ser Asp Gly Val His Leu
 900 905 910

Thr Gln Glu Gly Val Lys Trp Leu Ile Pro Trp Leu Glu Asp Ser Val
 915 920 925

Arg Val Ala Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His
 930 935 940

His His His His His
 945

<210> 39
 <211> 848
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> fusion "SS-Flag-Rv2029c*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*-Myc-His tag"
 <400> 39

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
 1 5 10 15

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asp Tyr Lys Asp
 20 25 30

Asp Asp Asp Lys Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg
 35 40 45

[0053] Ile Ile Thr Leu Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val
 50 55 60

Asp Val Val Arg Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr
 65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu
 85 90 95

Gly Gly Cys Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ala Gly Gly Ser Thr Gly Ser
 100 105 110

Leu Leu Met Ala Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile
 115 120 125

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

Thr Ala Lys Gln Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val
 145 150 155 160

Ala Glu Gln Glu Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser
 165 170 175

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

Asp Tyr Tyr Gln Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro
 195 200 205

Leu Ile Leu Asp Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly
 210 215 220

Val Phe Leu Leu Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly
 225 230 235

Ser Glu Leu Leu Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala Ala His Glu Leu
 245 250 255

Ile Asp Arg Gly Arg Ala Glu Val Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln
 260 265 270

Gly Ala Leu Leu Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile
 275 280 285

Pro Met Thr Ala Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asn Ala Met Val Ala
 290 295 300

Ala Ile Thr Val Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val
 305 310 315 320

Arg Leu Gly Asn Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr
 325 330 335

Ala Ala Cys Asn Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu Ser Gln Ile
 340 345 350

[0054] Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly
 355 360 365

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

Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln
 385 390 395 400

Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala
 405 410 415

Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met
 420 425 430

Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln
 435 440 445

Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn
 450 455 460

Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr
 465 470 475 480

Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly
 485 490 495

Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu
 500 505 510

Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser
 515 520 525
 Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Glu Gln Pro Ile Arg Arg
 530 535 540
 Trp Arg Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu Ala Ala Ala Thr Val
 545 550 555 560
 Ala Ser Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val Val Pro Val Gly Ala Gly
 565 570 575
 Pro Gly Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro Gly Val Ser Ala Val Ala
 580 585 590
 Ala Val Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser Gln Pro Ala Pro Gly Pro
 595 600 605
 Arg Asp Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser Val Phe Gly Asp Ser Ile
 610 615 620
 Gly Trp Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro Thr Pro Gly Phe Arg Phe
 625 630 635 640
 Ile Asp His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu Val Arg Gly Thr Pro Tyr
 645 650 655
 Arg Tyr Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg Ala Glu Cys Asp Gly Trp
 660 665 670
 [0055]
 Pro Ala Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg Asp Gln Pro Asp Val Ala
 675 680 685
 Leu Leu Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val Asp Arg Val Asn Glu Gly
 690 695 700
 Arg Trp Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe Asp Ala Tyr Leu Asn Ala
 705 710 715 720
 Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser Ile Val Gly Ser Thr Gly Val Arg Val
 725 730 735
 Met Val Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly Gly Glu Lys Pro Asp Gly
 740 745 750
 Arg Leu Tyr Pro Glu Asp Gln Pro Glu Arg Val Asn Lys Trp Asn Ala
 755 760 765
 Met Leu His Asn Ala Ile Ser Gln His Ser Asn Val Gly Met Ile Asp
 770 775 780
 Leu Asn Lys Lys Leu Cys Pro Asp Gly Val Tyr Thr Ala Lys Val Asp
 785 790 795 800
 Gly Ile Lys Val Arg Ser Asp Gly Val His Leu Thr Gln Glu Gly Val
 805 810 815
 Lys Trp Leu Ile Pro Trp Leu Glu Asp Ser Val Arg Val Ala Ser Glu

	820	825	830	
	Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His His His His His His			
	835	840	845	
<210>	40			
<211>	1770			
<212>	DNA			
<213>	artificial sequence			
<220>				
<223>	nucleotide sequence encoding fusion n? "SS-Flag-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His tag" (pTG18266)			
<400>	40			
	atggttcctc aggcctcctc gtttgtaccc cttctggttt ttccattgtg ttttgggaaa			60
	ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggccttct ctagacctgg cctgcccgtg			120
	gaatacctgc aggtcccaag ccccgcatg ggccgggata tcaaggtgca gtttcagagc			180
	ggcggcaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagccca ggacgactac			240
	aacggctggg acatcaaac cctgccttc gagtggtaet accagagcgg cctgtccatc			300
	gtgatgctg tgggcggcca gacgagcttc tacagcgact ggtacagccc cgctgtggc			360
	aaagccggt gccagaccta caagtgggag acattcctga cctccgagct gccccagtgg			420
	ctgagcgcca atagagccgt gaagcctaca ggctctgccg ccatcggact gagcatggcc			480
	ggaagctctg ccatgatcct ggccgctat caccctcagc agttcatcta cgccggcagc			540
	ctgtctgccc tgctggaccc ttctcagggc atgggccctt ctctgatcgg actggctatg			600
[0056]	ggcgacgctg gcgatacaa ggccgccgat atgtggggcc ctacgagcga tcctgcctgg			660
	gagagaaaac accccacca gcagatcccc aagctggtgg ccaacaacac ccggctgtgg			720
	gtgtactgcg gcaacggcac ccctaatgaa ctgggcggag ccaatatccc cgccgagttc			780
	ctggaaaact tcgtgctggag cagcaacctg aagtccagg atgcctaaa cgccgctggc			840
	ggccacaacg ccgtgttcaa ctccctccc aatggcacc acagctggga gtactgggga			900
	gcccagctga acgcatgaa gggcgatctg cagtctctc tgggagccgg cagccagatc			960
	atgtacaact accccgcat gctgggccac gccggcgata tggttgata tgccggcaca			1020
	ctgcagagcc tgggtgccga gattgccgtg gaacaggctg cctccagtc tgccctggcag			1080
	ggcgataacc gcatcacata ccaggcttgg cagggccagt ggaaccagge catggaagat			1140
	ctcgtgcggg cctaccacgc catgagcagc acacacgagg ccaacacat ggccatgatg			1200
	gcccgggata cagccgagc cgctaagtgg ggaggaacc agcagcagtg gaacttcgcc			1260
	ggaattgagg ccgctgccag gcctatccag ggcaacgtga catccatcca cagcctgctg			1320
	gacgagggca agcagagcct gacaaaactg gctgctgct ggggcggctc tggctctgaa			1380
	gcttatcagg gcgtgcagca gaagtgggac gccaccgcca ccgagctgaa caacgccctg			1440
	cagaacctgg cccggacaat ctctgaagcc ggacaggcca tgccagcac cgagggcaat			1500
	gtgaccgcca tgtttgccga acaaaaactc atctcagaag aggatctgag ctatgtatta			1560
	ctgagtgcag gggccctgac tgcccttgat ttgataattt tcctgatgac atgtttgtaga			1620
	agagtcaatc gatcagaacc tacgcaacac aatctcagag ggacagggag ggaggtgtca			1680
	gtcactcccc aaagcgggaa gatcatactc tcatgggaat cacacaagag tgggggtgag			1740
	accagactgc atcatcatca tcatcattga			1770

	<210>	41	
	<211>	1503	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	nt sequence encoding fusion n? "Flag-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-His tag" (pTG18296)	
	<400>	41	
		atggattaca aggatgacga cgataaggcc ttctctagac ctggcctgcc cgtggaatac	60
		ctgcaggtcc caagccccag catgggcccgg gatatcaagg tgcagtttca gageggcggc	120
		aacaacagcc ctgccgtgta tctgctggat ggctgagag cccaggacga ctacaacggc	180
		tgggacatca acaccctgc cttcgagtgg tactaccaga gcggcctgtc catcgtgatg	240
		cctgtgggag gccagagcag cttctacagc gactggtaca gccccgctg tggcaaagcc	300
		ggctgccaga cctacaagtg ggagacattc ctgacctcg agctgcccc gtggtgagc	360
		gccaatagag cegtgaagcc tacaggctct gccccatcg gactgagcat ggccggaagc	420
		tctgccatga tcctggccgc ctatcacctc cagcagttca tctacgccg cagcctgtct	480
		gccctgctgg acccttctca gggcatgggc cttctctga tcggactggc tatggcgagc	540
		gctggcggat acaaggcccg cgatatgtgg ggcctagca gcgacatctc ctgggagaga	600
		aacgaccca cccagcagat cccaagctg gtggccaaca acaccggct gtgggtgtac	660
		tgcggcaacg gcaccctaa tgaactgggc ggagccaata tccccgcca gttcttgaa	720
		aacttctgtc ggagcagcaa cctgaagttc caggatgcct acaacgccg tggcggccac	780
		aacgccgtgt tcaacttccc tccaatggc acccacagct gggagtactg gggagcccag	840
[0057]		ctgaacgcca tgaaggcgca tctgcagtc tctctgggag ccggcagcca gatcatgtac	900
		aactaccccg ccatgctggg ccacgccggc gatatggctg gatatgccg cacactgcag	960
		agcctgggtg ccgagattgc cgtggaacag getgcectcc agtctgectg gcagggcgat	1020
		accggcatca cataccagge ttggcaggcc cagtggaacc aggccatgga agatctctg	1080
		cgggctacc acgccatgag cagcacacac gaggccaaca ccatggccat gatggcccgg	1140
		gatacagccg aggccgctaa gtggggagga accgagcagc agtggaaact cgccggaatt	1200
		gaggccgctg ccagcgcctc ccagggcaac gtgacatcca tccacagcct gctggacgag	1260
		ggcaagcaga gcctgacaaa actggctgct gcctggggcg gctctggctc tgaagcttat	1320
		cagggcgtgc agcagaagtg ggacgccacc gccaccgagc tgaacaacgc cctgcagaac	1380
		ctggcccgga caatctctga agccggacag gccatggcca gcaccgagg caatgtgacc	1440
		ggcatgtttg ccgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgcacatca tcatcatcat	1500
		tga	1503
	<210>	42	
	<211>	1392	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	nt sequence encoding fusion n? "SS-Flag-RPFB-Dhyb-Myc-TM-His tag" (pTG18267)	
	<400>	42	
		atggtaccac aagcgetggt acttgtccca ctgcttggtt tctctttatg ttttgaaaa	60
		ttccaatag attacaagga tgacgacgat aagaccgtgg acggcaccgc catgagagtg	120

accaccatga agtccagagt gatcgacatc gtggaagaga acggttcag cgtggacgac	180
cgggacgacc tgtatcctgc tgetggagtg caggtccacg acgccgatac aatcgtgctg	240
cggagaagca gaccctgca gatcagcctg gatggccacg acgccaagca ggtctggacc	300
acagccagca cagtggatga agccctggcc cagctggcca tgaccgatac agctccagcc	360
gccgctagca gagctagcag agtgcctctg tctggcatgg ccctgcctgt ggtgtctgce	420
aagaccgtgc agctgaacga tggcggcctc gtgcggacag tgcatctgce tgctcctaat	480
gtggccggcc tgctgtctgc agcaggcgtg ccaactgctgc agagcgatca tgtggtgctt	540
gccgccacag cccctatcgt ggaaggcatg cagatccagg tcacacggaa ccgatcaag	600
aaagtgaccg agcggctgce cctgcctccc aacgctagaa gagtgggaaga tcccagatg	660
aacatgagca gagaggtggt cgaggaccct ggcgtgccag gcacacagga tgtgacattc	720
gccgtggccg aagtgaacgg cgtggaaacc ggcagactgc ccgtggccaa tgtggtggtc	780
acaccagccc atgagccgt cgtcagagtg ggcacaaagc ctggcacaga ggtgccacce	840
gtgatcgacg gcagcatctg ggatgccatt gccagtgca agagcggcgg aaactgggcc	900
gccaataccg gcaatggcct ctatggcggc ctgcagatct ctcaggccgc ctgggattct	960
aatggcggcg tgggatctcc tgccgctgcc tctccacagc agcagatcga ggtggccgac	1020
aacatcatga agacagccgg acctggcgc tggcccaagt gtagcagttg ttctcagggc	1080
gacgcccctc tgggcagcct gacacacatc ctgacatttc tggccgccga gacagggcga	1140
gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg agctatgttc ttctctctgc tggaacttta	1200
atagctttaa tgttaataat attcttaata acgtgctgta aaagggtaga ccgtccagag	1260
[0058] tcaactcagc gcagccttag gggtaactggg agaaatgttt ccgtgacatc acagagtgga	1320
aaatttatct cgtcttggga atctcataag agtggaggcg aaacacgtct tcatcatcat	1380
catcatcatt ga	1392
<210> 43	
<211> 1125	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> nt sequence encoding fusion n?2 "Flag-RPFB-Dhyb-Myc-His tag" (pTG18307)	
<400> 43	
atggattaca aggatgacga cgataagacc gtggacggca ccgccatgag agtgaccacc	60
atgaagtcca gagtgatcga catcgtggaa gagaacggct tcagcgtgga cgaccgggac	120
gacctgtatc ctgctgctgg agtgcaggtc cacgacggcg atacaatcgt gctgcggaga	180
agcagacccc tgcagatcag cctggatggc cacgacgcca agcaggtctg gaccacagcc	240
agcacagtgg atgaagccct ggcccagctg gccatgaccg atacagctcc agccgccgt	300
agcagagcta gcagagtgcc tctgtctggc atggccctgc ctgtggtgtc tgccaagacc	360
gtgcagctga acgatggcgg cctcgtgcgg acagtgcate tgctgctcc taatgtggcc	420
ggcctgctgt ctgcagcagg cgtgccactg ctgcagagcg atcatgtggt gcctgccgcc	480
acagccccta tcgtggaagg catgcagatc caggtcacac ggaaccggat caagaaagtg	540
accgagcggc tgcccctgcc tccaacgct agaagagtgg aagatcccga gatgaacatg	600
agcagagagg tggctcagga ccctggcgtg ccaggcacac aggatgtgac attcgcctg	660

	gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga ctgcccgtgg ccaatgtggt ggtcacacca	720
	gcccattgagg cgtctcag agtgggcaca aagcctggca cagaggtgcc acccgtgac	780
	gacggcagca tctgggatgc cattgcccag tgcaagagcg gcggaaactg ggccccaat	840
	accggcaatg gcctctatgg cggectgcag atctctcagg ccgectggga ttctaattg	900
	ggcgtgggat ctctgccgc tgctctcca cagcagcaga tcgaggtgce cgacaacatc	960
	atgaagacag ccggacctgg cgectggccc aagtgtagca gttgttctca gggcgacgcc	1020
	cctctgggca gcctgacaca catcctgaca ttctggccg ccgagacagg cggagaacaa	1080
	aaactcatct cagaagagga tctgcatcat catcatcatt attga	1125
	<210> 44	
	<211> 2817	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> nt sequence encoding fusion n? "SS-Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10. 4-ESAT6-Myc-TM-His tag" (pTG18268)	
	<400> 44	
	atggtaccac aagcgtggtt acttgtccca ctgcttggtt tctctttatg ttttggaaaa	60
	ttccaatag attacaagga tgacgacgat aagaccgtgg acggcaccgc catgagagtg	120
	accaccatga agtccagagt gatcgacatc gtggaagaga acgcttcag cgtggacgac	180
	cgggacgacc tgtatcctgc tgctggagtg caggctccacg acgcccatac aatcgtgctg	240
	cggagaagca gaccctgca gatcagcctg gatggccacg acgccaagca ggtctggacc	300
[0059]	acagccagca cagtggatga agcctggcc cagctggcca tgaccgatac agctccagcc	360
	gccgctagca gagctagcag agtgccctg tctggcatgg cctgcctgt ggtgtctgcc	420
	aagaccgtgc agctgaacga tggcggcctc gtgcggacag tgcatctgcc tgctcctaat	480
	gtggccggcc tgctgtctgc agcaggcgtg cactgctgc agagcgatca tgtggtgctt	540
	gccgccacag ccctatcgt ggaaggcatg cagatccagg tcacacgga ccgatcaag	600
	aaagtaccg agcggctgcc cctgcctccc aacgctagaa gagggaaga tcccagatg	660
	aacatgagca gagaggtggt cgaggacct ggctgccag gcacacagga tgtgacattc	720
	gccgtggccg aagtgaacgg cgtggaacc ggcagactgc ccgtggccaa tgtggtggtc	780
	acaccagccc atgagccgt cgtcagagtg ggcacaaagc ctggcacaga ggtgccacce	840
	gtgatcgacg gcagcatctg ggatgccatt gccagtgca agagcggcgg aaactgggcc	900
	gccaataccg gcaatggcct ctatggcggc ctgcagatct ctcaggccgc ctgggattct	960
	aatggcggcg tgggatctcc tgccgctgcc tctccacagc agcagatcga ggtggccgac	1020
	aacatcatga agacagccgg acctggcgc tgcccgaagt gtagcagttg ttctcagggc	1080
	gacgcccctc tgggcagcct gacacacatc ctgacatttc tggccgccga gacagcgga	1140
	gccttctcta gacctggcct gcccgtggaa tacctgcagg tcccagccc cagcatgggc	1200
	cgggatatac aggtgcagtt tcagagcggc ggcaacaaca gccctgccgt gtatctgctg	1260
	gatggcctga gagcccagga cgactacaac ggctgggaca tcaacacccc tgcttcgag	1320
	tggtactacc agagcggcct gtccatcgtg atgcctgtgg gcggccagag cagcttctac	1380
	agcgactggt acagccccgc ctgtggcaaa gccggctgcc agacctaca gtgggagaca	1440
	ttctgacct ccgagctgcc ccagtggctg agcgccaata gagccgtgaa gcctacaggc	1500

tctgcccca	tcggactgag	catggccgga	agctctgcca	tgatcctggc	cgccatcac	1560
cctcagcagt	tcattctacgc	cggcagcctg	tctgccctgc	tggacccttc	tcagggcatg	1620
ggcccttctc	tgatcggact	ggctatgggc	gacgctggcg	gatacaagge	cgccgatatg	1680
tggggcccta	gcagcgatcc	tgcttgggag	agaaacgacc	ccaccagca	gatccccaag	1740
ctggtggcca	acaacacccg	gctgtgggtg	tactgcgga	acggcacccc	taatgaactg	1800
ggcggagcca	atatccccgc	cgagttcctg	gaaaacttcg	tgcggagcag	caacctgaag	1860
ttccaggatg	cctacaacgc	cgctggcggc	cacaacgcg	tgttcaactt	ccctcccaat	1920
ggcaccacaca	gctgggagta	ctggggagcc	cagctgaacg	ccatgaaggg	cgatctgcag	1980
tcctctctgg	gagccggcag	ccagatcatg	tacaactacc	ccgccatgct	gggccacgcc	2040
ggcgatatgg	ctggatatgc	cggcacactg	cagagcctgg	gtgccgagat	tgccctggaa	2100
caggctgccc	tccagtctgc	ctggcagggc	gataccggca	tcacatacca	ggcttggcag	2160
gcccagtgga	accaggccat	ggaagatctc	gtcggggcct	accacgccat	gagcagcaca	2220
cacgaggcca	acaccatggc	catgatggcc	cgggatacag	ccgaggccgc	taagtgggga	2280
ggaaccgagc	agcagtggaa	cttcgccgga	attgaggccg	ctgccagcgc	catccagggc	2340
aacgtgacat	ccatccacag	cctgctggac	gagggcaagc	agagcctgac	aaaactggct	2400
gctgcctggg	gcggtcttgg	ctctgaaact	tatcagggcg	tgcagcagaa	gtgggacgcc	2460
accgccaccg	agctgaacaa	cgccctgcag	aacctggccc	ggacaatctc	tgaagccgga	2520
caggccatgg	ccagcaccga	gggcaatgtg	accggcatgt	ttgccgaaca	aaaactcacc	2580
tcagaagagg	atctgagcta	tgtttctctc	tctgctggaa	ctttaatagc	tttaatgtta	2640
[0060] ataatattct	taataacgtg	ctgtaaaagg	gtagaccgtc	cagagtcaac	tcagcgcagc	2700
cttaggggta	ctgggagaaa	tgtttccgtg	acatcacaga	gtggaaaatt	tatctcgtct	2760
tgggaatctc	ataagagtgg	aggcgaaaca	cgtcttcacc	atcatcatca	tcattga	2817
<210>	45					
<211>	2550					
<212>	DNA					
<213>	artificial sequence					
<220>						
<223>	nt sequence encoding fusion n?1					
	"Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10. 4-ESAT6-Myc-His tag" (pTG18297)					
<400>	45					
atggattaca	aggatgacga	cgataagacc	gtggacggca	ccgccatgag	agtgaccacc	60
atgaagtcca	gagtgatcga	catcgtggaa	gagaacggct	tcagcgtgga	cgaccgggac	120
gacctgtatc	ctgctgctgg	agtgcaggtc	cacgacggcg	atacaatcgt	gctgcggaga	180
agcagacccc	tgcatgatcag	cctggatggc	cacgacggca	agcaggtctg	gaccacagcc	240
agcacagtgg	atgaagccct	ggcccagctg	gcatgaccg	atacagctcc	agccgccct	300
agcagagcta	gcagagtgcc	tctgtctggc	atggccctgc	ctgtggtgtc	tgccaagacc	360
gtgcagctga	acgatggcgg	cctcgtgcgg	acagtgcacc	tgctgctcc	taatgtggcc	420
ggcctgctgt	ctgcagcagg	cgtgccactg	ctgcagagcg	atcatgtggt	gcctgccgcc	480
acagccccta	tcgtggaagg	catgcagatc	caggtcacac	ggaaccggat	caagaaagtg	540
accgagcggc	tgccctgcc	tccaacgct	agaagagtgg	aagatcccga	gatgaacatg	600
agcagagagg	tggctgagga	ccctggcgtg	ccaggcacac	aggatgtgac	attcgcctg	660

gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga ctgcccgtgg ccaatgtggt ggtcacacca	720
gccccatgagg ccgtcgtcag agtgggcaca aagcctggca cagaggtgcc acccgtgatc	780
gacggcagca tctgggatgc cattgcccag tgcaagagcg gcgaaactg ggccgccaat	840
accggcaatg gcctctatgg cggectgcag atctctcagg ccgctggga ttctaattgc	900
ggcgtgggat ctctgccgc tgcccttcca cagcagcaga tcgaggtggc cgacaacatc	960
atgaagacag ccggacctgg cgcttgccc aagtgtagca gttgttctca gggcgacgcc	1020
cctctgggca gcctgacaca catcctgaca ttcttgccg ccgagacagg cggagccttc	1080
tctagacctg gcctgcccgt ggaataacctg caggtcccaa gccccagcat gggccgggat	1140
atcaaggtgc agtttcagag cggcggcaac aacagccctg ccgtgtatct gctggatggc	1200
ctgagagccc aggacgacta caacggctgg gacatcaaca cccctgcctt cgagtggtag	1260
taccagagcg gcctgtccat cgtgatgcct gtggcgggcc agagcagctt ctacagcgac	1320
tggtacagcc ccgctgtgg caaagccggc tgccagacct acaagtggga gacattcctg	1380
acctccgagc tgccccagtg gctgagcgcc aatagagccg tgaagcctac aggctctgcc	1440
gccatcggac tgagcatggc cggaagctct gccatgatcc tggccgccta tcacctcag	1500
cagttcatct acgccggcag cctgtctgcc ctgctggacc cttctcaggg catggccct	1560
tctctgatcg gactggctat gggcgacgct ggcggataca aggccgccga tatgtggggc	1620
cctagcagcg atcctgcctg ggagagaaac gacccacc agcagatccc caagctggtg	1680
gccaaaca cccggctgtg ggtgtactgc ggcaacggca ccctaata actgggcgga	1740
gccaatatcc ccgccagtt cctggaaaac ttcgtgcgga gcagcaacct gaagtccag	1800
[0061] gatgcctaca acgccgtgg cggccacaac gccgtgttca acttcctcc caatggcacc	1860
cacagctggg agtactgggg agcccagctg aacgccatga agggcgatct gcagtcctct	1920
ctgggagccg gcagccagat catgtacaac taccgccca tgctgggcca cgccggcgat	1980
atggttgat atgccggcac actgcagagc ctgggtgccg agattgccgt ggaacaggct	2040
gccctccagt ctgcctggca gggcgatacc ggcatcacat accaggettg gcagggccag	2100
tggaaccagg ccatggaaga tctcgtcgg gcctaccacg ccatgagcag cacacacgag	2160
gccaacacca tggccatgat ggcccgggat acagccgagg ccgctaagtg gggaggaacc	2220
gagcagcagt ggaacttcgc cggaaattgag gccctgccca gcgccatcca gggcaactg	2280
acatccatcc acagcctgct ggacgagggc aagcagagcc tgacaaaact ggctgtctgc	2340
tggggcggct ctggctctga agcttatcag ggcgtgcagc agaagtggga cgccaccgcc	2400
accgagctga acaacgccct gcagaacctg gcccgacaa tctctgaagc cggacaggcc	2460
atggccagca ccgagggcaa tgtgaccggc atgtttgccg aacaaaaact catctcagaa	2520
gaggatctgc atcatcatca tcatcattga	2550

<210> 46

<211> 3597

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> nt sequence encoding fusion n?

"SS-Flag-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-TM-His tag"

(pTG18269)

<400> 46

	atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttattggtct ttcccctctg tttcggtaag	60
	tttcctatag attacaagga tgacgacgat aagaaggcca aagtcggcga ctggctggtc	120
	atcaagggcg ccaccatcga ccagcccgat cacagaggcc tgatcatcga agtgccgagc	180
	agcgacggca gccctcetta cgtcgtcaga tggctggaaa ccgaccacgt ggccaccgtg	240
	atccctggac ctgatgccgt ggtggtcacc gccgaggaac agaatgccgc cgatgagaga	300
	gcccagcaca gattcggagc cgtgcagagc gccatcctgc acgccagagg aacagccaac	360
	ggcagcatga gcgaagtgat gatgagcgag atcgccggcc tgcccattccc tcccattc	420
	cactatggcg ccattgccta cgcccctagc ggcgctctg gaaaagcctg gcaccagaga	480
	acaccgcca gagccgaaca ggtggccctg gaaaagtgcg gcgacaagac ctgcaagggtg	540
	gtgtcccggc tcaccagatg tggcggcctg gcctacaac gctccaagta tcaggcggc	600
	accggcctga caagaagggc cgctgaggac gacgccgtga acagactgga aggcggcaga	660
	atctgaaact gggcctgcaa cagagccacc gtgggactgg tggaagccat cggcatcaga	720
	gagctgagac agcacgccag cagatacctg gccagagtgg aagccggcga ggaactgggc	780
	gtgaccaaca agggcagact ggtggccaga ctgatccctg tgcaggccgc cgagagaagc	840
	agagagggcc tgattgagag cggcgtgctg atccctgcca gacggcctca gaacctgctg	900
	gatgtgacag ccgagcccgc cagagggcgg aagagaacct tgagcgacgt gctgaacgag	960
	atgcgggatg aacaggtgga cttcggcgcc ctgcctccc agattaatag cgccaggatg	1020
	tacggcgcc ctggcagcgc ttctctggtg gccctgcca agatgtggga tagcgtggcc	1080
	agcgacctgt tctctgcgc cagcgcattt cagagcgtcg tgtggggact cactgtgggc	1140
[0062]	tcttgatcg gatctctgc cggctctgat gccgctgct cctctcctta tgtggcctgg	1200
	atgagcgtga ccgccgaca ggcacagctg acagctgcac aggtccgagt ggctgccgcc	1260
	gcttacgaga cagcctacag actgacagtg cctccaccgc tgatcggcga gaatcggacc	1320
	gagctcatga cctgaccgc caccaatctg ctggccaga acaccctgc catcgaggcc	1380
	aatcaggccg cctactctca aatgtggggc caagatgccg aggctatgta cgctatgca	1440
	gccacagccg cactgctac agaagccctg ctgcccttcg aagatgccc tctgatcaca	1500
	aacctggcg gcctgctgga acagggcctg gctgtggaag aggccatcga taccgctgcc	1560
	gccaaccaac tcatgaacaa cgtgccacag gccctccagc agctggctca gcctgctcag	1620
	ggcgtggctg cttctagcaa gctcggcgga ctgtggaccg ccgtgtctcc tcatctgagc	1680
	cctctgagca acgtgtctc tatcccaac aaccacatga gcatgatggg caccggcgtg	1740
	tccatgacca acaccctgca cagcatgctg aagggactgg ccctgctgc tggccaggt	1800
	gtggaacag ccgccgaaaa tggcgtgtgg gccatgagca gcctgggctc tcagctggga	1860
	agctccctcg gttcttctgg actgggagct ggcgtggccg ccaatctggg aagagctgct	1920
	tctgtcggca gcctgtctgt gcctcctgct tgggccgctg ctaaccagge tgtgacacca	1980
	gctgctagag cctgacctc gaccagcctg acatctgccg ctcagacagc cctggccac	2040
	atgtgggag gactgacctt gggccactct gtgaatgccg gcagcggcat caacaacgcc	2100
	ctgagagtgc ctgccagagc ctaccctac cccagaactc cagccgctgg cgattttgcc	2160
	acctcccac ctgagatcaa ttccgctaga atgtatagcg gagccgggtc tgetcctatg	2220
	ctggctgctg cttctgcctg gcacggactg tctgccgaac tgagagccag cgccctgagc	2280
	tacagcagcg tgetgagtac cctgaccggc gaagagtggc acggacctgc cagcgcctct	2340

atgacagcag cgcctgcccc atatgtcgca tggatgtcag tcaactgcagt gcgggcccga	2400
caggcaggcg ctcaggctga agctgcagca gcagcttatg aagccgcctt tgccctaca	2460
gtcccacctc ctgtcattga ggccaaccgg gccagctga tgctctgat tgccacaaac	2520
gtgtggggac agaatgcccc agccattgcc gctacagaag cccagtatgc cgagatgtgg	2580
tcccaggacg ctatggcaat gtatgggtat gctgggcct cgcgcctgc cacacagctg	2640
acaccttca ccgagcccgt gcagaccacc aatgcctctg gactggccgc ccagtctgcc	2700
gccattgctc atgctacagg cgcctctgct ggggctcagc agacaacct gtcccagctg	2760
atcgccgcca tccctagcgt gctgcaggga ctgagcagct ctaccgccgc cacatttgcc	2820
tctggcccta gcggactgct gggcatcgtg ggcatggaa gctcctggct ggataagctg	2880
tgggcctgc tggaccccaa cagcaacttc tggaacacaa tggccagctc cggcctgttt	2940
ctgcccagca acaccattgc cccatttctg ggcttctgg gcggagtggc tgctgcagat	3000
gctgtgggg atgtgtggg cgaagccaca agcggaggac tgggagcgc tctgtggca	3060
cctctgggat ctgcaggcgg actcggagga acagtggctg caggactggg caatgtgcc	3120
acagtgggca cactgagcgt gccaccatct tggacagctg ccgcccctct ggcttctcct	3180
ctcggatctg ctctgggcgg caccctatg gtgctccac ctctgtctgt ggctccgga	3240
atgcctggca tgcctttcgg cacaatgggc ggacaggctc tggcagagc cgtgctcag	3300
tacgcttcc ggccaaactt cgtggccaga cctctgcag ctggcgaaca aaaactcacc	3360
tcagaagagg atctgagcta cgtactgcta tcggcaggca cgttgatcgc actaatgctt	3420
atcatcttcc taataacctg ctgcaagcgg gttgatagc ccgaaagtac ccaaaggtcc	3480
[0063] ttgagaggta ccggacgcaa cgtatcggta acgtcgcaa gcggcaagtt cattagcagt	3540
tgggagtcgc acaaatcagg tggagagacc cgctgcacc atcatcatca tcattga	3597
<210> 47	
<211> 3330	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> nt sequence encoding fusion n? "Flag-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-His tag" (pTG18295)	
<400> 47	
atggattaca aggatgacga cgataagaag gccaaagtgc gcgactggct ggtcatcaag	60
ggcgccacca tcgaccagcc cgatcacaga ggctgatca tcgaagtgcg gagcagcgc	120
ggcagccctc cttacgtcgt cagatggctg gaaaccgacc acgtggccac cgtgaccct	180
ggacctgatg ccgtgggtgt caccgccgag gaacagaatg ccgccgatga gagagcccag	240
cacagattcg gagccgtgca gagcgcacc ctgcacgcca gaggaacagc caacggcagc	300
atgagcgaag tgatgatgag cgagatcgcc ggctgccc tccctccat catccactat	360
ggcgccattg cctacgcccc tagcggcgcc tctggaaaag cctggcacca gagaacacc	420
gccagagccg aacaggtggc cctggaaaag tgcggcgaca agacctgcaa ggtggtgtcc	480
cggttcacca gatgtggcgc cgtggcctac aacggctcca agtatcaggg cggcaccggc	540
ctgacaagaa gggccctga ggacgacgcc gtgaacagac tggaaaggcg cagaatcgtg	600
aactggcct gcaacagagc caccgtggga ctggtggaag ccatcgcat cagagagctg	660
agacagcacg ccagcagata cctggccaga gtggaagccg gcgaggaact gggcgtgacc	720

aacaagggca gactggtggc cagactgate cctgtgcagg ccgccgagag aagcagagag	780
gccctgattg agagcggcgt gctgatecct gccagacggc ctcagaacct gctggatgtg	840
acagccgagc ccgccagagg ccggaagaga accctgagcg acgtgctgaa cgagatgcgg	900
gatgaacagg tggacttcgg cgccttgcct cccgagatta atagegccag gatgtacgcc	960
ggccttggca gcgtttctt ggtggccgct gccaaatgt gggatagcgt ggccagcgac	1020
ctgtttcttg ccgccagcgc atttcagage gtcgtgtggg gactcactgt gggtctttgg	1080
atcggatctt ctgccggtt gatggccgct gctgcctctc cttatgttgc ctggatgagc	1140
gtgaccgccg gacaggcaca gctgacagct gcacaggctc gactggctgc cgcgccttac	1200
gagacagcct acagactgac agtgcctcca cccgtgatcg ccgagaatcg gaccgagctc	1260
atgaccctga ccgccaccaa tctgctcggc cagaacaccc ctgccatcga ggccaatcag	1320
gccgctact ctcaaatgtg gggccaagat gccgaggcta tgtacggcta tgcagccaca	1380
gccgccactg ctacagaagc cctgctgccc ttggaagatg cccctctgat cacaaacct	1440
ggcggcctgc tggaacaggc cgtggctgtg gaagaggcca tcgataccgc tgcgccaac	1500
caactcatga acaacgtgcc acaggecctc cagcagctgg ctcagcctgc tcagggcgtg	1560
gtgccttcta gcaagctcgg cggactgttg accgccgtgt ctctcatct gagccctctg	1620
agcaacgtgt cctctatcgc caacaaccac atgagcatga tgggcaccgg cgtgtccatg	1680
accaacaccc tgcacagcat gctgaaggga ctggcccctg ctgctgcca ggctgtggaa	1740
acagccgccg aaaatggcgt gtgggccatg agcagcctgg gctctcagct gggaagctcc	1800
ctcggttctt ctggactggg agctggcgtg gccgccaatc tgggaagagc tgcttctgtc	1860
[0064] ggcagcctgt ctgtgcctcc tgcctgggcc gctgtaacc aggctgtgac accagctgct	1920
agagccctgc ctctgaccag cctgacatct gccgetcaga cagccccctg ccacatgctg	1980
ggaggactgc ctctgggcca ctctgtgaat gccggcagcg gcatcaaca cgcctgaga	2040
gtgcctgcca gagcctacgc catccccaga actccagccg ctggcgattt tgcaccctc	2100
ccacctgaga tcaattccgc tagaatgtat agcggagccg ggtctgtctc tatgttggt	2160
gctgcttctg cctggcacgg actgtctgcc gaactgagag ccagcgcctt gagctacagc	2220
agcgtgctga gtaccctgac cggcgaagag tggcacggac ctgccagcgc ctctatgaca	2280
gcagccgctg ccccatatgt cgcattgatg tcagtcactg cagtgcgggc cgaacaggca	2340
ggcgtcagg ctgaagctgc agcagcagct tatgaagccg cctttgccgc tacagtccca	2400
cctctgtca ttgaggccaa ccgggcccag ctgatggctc tgattgccac aaactgtctg	2460
ggacagaatg cccagccat tgccttaca gaagcccagt atgccagat gtggtcccag	2520
gacgtatgg caatgtatgg gtatgttggc gcctccgcc ctgccacaca gctgacacct	2580
ttcaccgagc ccgtgcagac caccaatgcc tctggactgg ccgccagtc tgcgccatt	2640
gctcatgcta caggcgcctc tgcgtgggct cagcagacaa cactgtccca gctgategcc	2700
gccatcccta gcgtgctgca gggactgagc agctctaccg ccgccacatt tgcctctggc	2760
cctagcggac tgctgggcat cgtgggcagt ggaagctcct ggctggataa gctgtgggcc	2820
ctgtggacc ccaacagcaa cttctggaac acaatcgcca gctccggcct gtttctgcc	2880
agcaacacca ttgccccatt tctggcctg ctgggcggag tggctgctgc agatgctgct	2940
ggggatgtgc tgggcgaagc cacaagcgga ggactgggag gcgctctggt ggcacctctg	3000

ggatctgcag gcgactcgg aggaacagtg gctgcaggac tgggcaatgc tgccacagtg	3060
ggcacactga gcggtccacc atcttggaca gctgcgccccc ctctggcttc tcctctcgga	3120
tctgctctgg gcggcacccc tatggtggct ccacctctg ctgtggctgc cggaatgcct	3180
ggcatgcctt tcggcacaat gggcggacag ggcttcggca gagccgtgcc tcagtacggc	3240
ttccggccta acttcgtggc cagacctct gcagctggcg acaaaaaact catctcagaa	3300
gaggatctgc atcatcatca tcatcattga	3330
<210> 48	
<211> 2922	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> nt sequence encoding fusion n?6 "SS-Flag-Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733c*-Myc-His tag" (pTG18270)	
<400> 48	
atggttctc aggcctctc gttgtaccc ctctggttt ttccattgtg ttttggaaa	60
ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggccttct ctagacctgg cctgcccgtg	120
gaatacctgc aggtcccaag ccccagcatg ggccgggata tcaaggtgca gtttcagagc	180
ggcggaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagccca ggacgactac	240
aacggctggg acatcaacac ccctgccttc gagtggctact accagagcgg cctgtccatc	300
gtgatgcctg tgggcggcca gacgacctc tacagcgact ggtacagccc cgctgtggc	360
aaagccggct gccagacct caagtgggag acattcctga cctccgagct gcccagtg	420
[0065] ctgagcgcca atagaccgt gaagcctaca ggctctgcc ccatcgact gagcatggc	480
ggaagctctg ccatgactc ggccgctat caccctcagc agttcateta cgccggcagc	540
ctgtctgccc tgctggacct ttctcagggc atgggccctt ctctgatcgg actggtatg	600
ggcgacgctg gcgatacaa ggccgccgat atgtggggcc ctagcagcga tcctgcctgg	660
gagagaaacg accccaccca gcagatcccc aagctggtgg ccaacaacac ccggctgtgg	720
gtgtactgcg gcaacggcac ccctaatgaa ctggcgagg ccaatatccc cgccgagttc	780
ctggaaaact tcgtgcggag cagcaacctg aagtccagg atgcctacaa cgccgctggc	840
ggccacaacg ccgtgttcaa ctccctccc aatggcacc acagctggga gtactgggga	900
gcccagctga acgccatgaa gggcgatctg cagtctctc tgggagccgg cacaaccgcc	960
agagacatca tgaacccgg cgtgacctgt gtggcgagc acgagacact gacagccgcc	1020
gctcagtaca tgagagagca cgacatcggc gcctgccca tctgcggcga cgatgataga	1080
ctgcacggca tgctgaccga ccgggacatc gtgatcaagg gcctggctgc tggcctggac	1140
cccaatactg ctacagctgg cgagctggca agagacagca tctactacgt ggacccaac	1200
gccagcatec aggaaatgct gaacgtgatg gaagaacacc aggtccgacg ggtgcccgtg	1260
atcagcgaac acagactcgt gggcatcgtg accgagccg atatgccag acatctgccc	1320
gagcagcca tcgtgcagtt cgtgaagcc atctgcagcc ccatggccct ggcctctacc	1380
gtggacggca ccgccatgag agtgaccacc atgaagtcca gactgatcga catcgtggaa	1440
gagaacggct tcagcgtgga cgaccgggac gacctgtatc ctgctgctgg agtgcaggtc	1500
cagcagccg atacaatcgt gctgcggaga agcagacccc tgcagatcag cctggatggc	1560
cagcagcca agcaggtctg gaccacagcc agcacagtgg atgaagccct ggcccagctg	1620

gccatgaccg atacagctcc agccgccct agcagagcta gcagagtgcc tctgtctggc	1680
atggccctgc ctgtggtgtc tgccaagacc gtgcagctga acgatggcgg cctcgtgcgg	1740
acagtgcac tgcctgctcc taatgtggcc ggctgtctgt ctgcagcagg cgtgccactg	1800
ctgcagagcg atcatgtggt gcctgccgcc acagccccta tegtgaagg catgcagatc	1860
caggtcacac ggaaccggat caagaaagt accgagcggc tgcccctgcc tcccaacgct	1920
agaagagtgg aagatcccga gatgaacatg agcagagagg tggtcgagga ccctggcgtg	1980
ccaggcacac aggatgtgac attcgccgtg gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga	2040
ctgcccgtgg ccaatgtggt ggtcacacca gccatgagg ccgtcgtcag agtgggcaca	2100
aagcctggca cagaggtgcc acccgtgac gacggcagca tctgggatgc cattgccag	2160
tgcaagagcg gcgaaactg ggccgccaat accggcaatg gcctctatgg cggcctgcag	2220
atctctcagg ccgctggga ttctaattgc ggcgtgggat ctctgcccgc tgcctctcca	2280
cagcagcaga tcgaggtggc cgacaacatc atgaagacag ccggacctgg cgcctgcccc	2340
aagtgtagca gttgttctca gggcgacgcc cctctgggca gcctgacaca catcctgaca	2400
ttcttgcccg ccgagacagg cggagctgga acagccgtgc aggatagccg gtcccactg	2460
tacgtcacc aggccagac aagacaccct gccacagcca ccgtgatcga ccacgagggc	2520
gtgatcgaca gcaacaccac cgccacatct gccccacccc ggaccaagat cacagtgcct	2580
gctagatggg tggccaacgg catcgagcgg agcggcgaag tgaatgcaa gcccgccacc	2640
aagagcggcg acagagtggg aatctgggtg gactctgccg gccagctggt ggatgaacct	2700
gccctctctg ccagagccat tgccgatgct gctctggctg cactgggcct gtggctgtct	2760
[0066] gtggcagctg tggctggcgc actgctggct ctgacaagag ccacctgat cagagtgcgg	2820
aacgccagtt ggcagcacga tatcgacagc ctgttctgca cccagcggga acaaaaactc	2880
atctcagaag aggatctgag ccacatcat catcatcatt ga	2920
<210> 49	
<211> 1875	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> nt sequence encoding fusion n?	
"SS-Flag-Ag85B*-Rv2626-Rv1733c*-Myc-His tag" (pTG18272)	
<400> 49	
atggttctc aggetctct gttgtacct ctcttggtt ttccattgtg ttttgggaaa	60
ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggccttct ctgacctgg cctgccctg	120
gaatacctgc aggtcccag cccagcatg ggccgggata tcaagtgca gtttcagagc	180
ggcggaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagccca ggacgactac	240
aacggctggg acatcaaac ccctgccttc gagtggtaact accagagcgg cctgtccatc	300
gtgatgctg tgggcggcca gacgacctc tacagcgaact ggtacagccc cgcctgtggc	360
aaagccggt gccagacct caagtgggag acattctga cctccgagct gcccagtg	420
ctgagcgcca atagagccgt gaagcctaca ggctctgccg ccacggact gagcatggcc	480
ggaagctctg ccattgacct ggccgctat caccctcagc agttcatcta cggcgcagc	540
ctgtctgccc tgctggacce ttctcagggc atggccctt ctctgatcgg actggctatg	600
ggcgacgctg gcggatacaa ggccgccgat atgtggggcc ctgacagcga tctgcctgg	660

	gagagaaacg accccaccca gcagatcccc aagctggtgg ccaacaacac cggcgtgtgg	720
	gtgtactgcg gcaacggcac ccctaataaa ctgggcggag ccaatatacc cgccgagttc	780
	ctggaaaact tcgtgctggag cagcaacctg aagttccagg atgcctacaa cgccgctggc	840
	ggccacaacg ccgtgttcaa ctccctccc aatggcacc cagactggga gtactgggga	900
	gcccagctga acgcatgaa gggcgatctg cagtctctc tgggagccgg cacaaccgcc	960
	agagacatca tgaacccgg cgtgacctgt gtggcgagc acgagacact gacagccgcc	1020
	gctcagtaca tgagagagca cgacatcggc gcctgccca tctgcggcga cgatgataga	1080
	ctgcacggca tgctgaccga ccgggacatc gtgatcaagg gcctggctgc tggcctggac	1140
	cccaatactg ctacagctgg cgagctggca agagacagca tctactacgt ggacccaac	1200
	gccagcatcc aggaaatgct gaacgtgatg gaagaacacc aggtccgacg ggtgccctg	1260
	atcagcgaac acagactcgt gggcatcgtg accgagccg atatgccag acatctgcc	1320
	gagcagcca tcgtgcagtt cgtgaaggcc atctgcagcc ccatggccct ggctctgct	1380
	ggaacagccg tgcaggatag ccgggtccac gtgtacgctc accaggccca gacaagacac	1440
	cctgccacag ccaccgtgat cgaccagag ggcgtgatc acagcaacac caccgccaca	1500
	tctgccccac ccggaccaa gatcacagtg cctgctagat ggggtgtcaa cggcatcgag	1560
	cggagcggcg aagtgaatgc caagcccggc accaagagcg gcgacagagt gggaatctgg	1620
	gtggactctg ccggccagct ggtggatgaa cctgccctc ctgccagagc cattgccgat	1680
	gctgctctgg ctgcaactgg cctgtggctg tctgtggcag ctgtggctgg cgcaactctg	1740
	gctctgacaa gagccatcct gatcagagtg cggaacgcca gttggcagca cgatatcgac	1800
[0067]	agcctgttct gcaccagcg ggaacaaaa ctcatctcag aagaggatct gagccatcat	1860
	catcatcatc attga	1875
	<210> 50	
	<211> 2845	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> nt sequence encoding fusion N?3	
	"SS-Flag-Rv2029c*-Rv2626-Rv1733c*-Rv0111*-Myc-His tag" (pTG18323)	
	<400> 50	
	atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcattggcag tactgttaac tctccaaaca	60
	cccaccggtc aaatccattg gggcgattac aaggatgacg acgataagac cgagcctgcc	120
	gcctgggatg agggcaagcc cagaatcatc accctgacca tgaaccccgc cctggacatc	180
	accaccagcg tggacgtcgt gcggcccacc gagaagatga gatgtggcgc ccctagatac	240
	gaccctggcg gcggaggaat caacgtggcc agaategtgc acgtgctggg cggtctgtagc	300
	accgccctgt ttccagctgg cggtctctaca ggctctctgc tgatggccct gctgggagat	360
	gccggcgtgc ccttcagagt gatecctatc gccgccagca cccgcgagag cttcaccgtg	420
	aatgagagcc ggaccgcaa gcagtacaga ttcgtgctgc ctggccccag cctgacagtg	480
	gccgaacagg aacagtgcct ggacgagctg agaggcgcg ctgcctctgc tgcttttgtg	540
	gtggcctctg gctctctgcc tctggcgtg gccgccgact actatcagag agtggccgac	600
	atctgccggc ggagcagcac acctctgac ctggatacaa gcggcggagg cctgcagcat	660
	atcagcagcg gagtgttct gctgaaggcc agcgtccgcg agctgaggga atgtgtggga	720

agcgagctgc tgaccgagcc cgaacagctg gccgctgccc acgagctgat cgatagaggc	780
agagccgagg tgggtggtgt gtctctggga tctcaggcgc ctctgctggc cacaagacac	840
gccagccacc ggttcagcag catccctatg acagccgtgt ctggcgtggg agccggcaat	900
gctatggtgg cegccatcac agtgggcctg tctagaggct ggtccctgat caagtctgtg	960
cggctgggca atgccctgg cgctgctatg ctgctgacac ctggaaccgc cgectgcaac	1020
agggacgacg tggaacggtt cttegagaca accgccagag acatcatgaa cgccggcgtg	1080
acctgtgtgg gcgagcacga gacactgaca gccgccgctc agtacatgag agagcacgac	1140
atcggcgcgc tgeccatctg cggcgacgat gatagactgc acggcatgct gaccgaccgg	1200
gacatcgtga tcaagggcct ggctgctggc ctggacccca ataactgctac agctggcgag	1260
ctggcaagag acagcatcta ctacgtggac gccaacgcca gcatccagga aatgctgaac	1320
gtgatggaag aacaccaggt ccgacgggtg cccgtgatca gcgaacacag actcgtgggc	1380
atcgtgaccg aggccgatat cgccagacat ctgcccgagc acgccatcgt gcagttcgtg	1440
aaggccatct gcagcccat ggccctggcc tctgctggaa cagccgtgca ggatagccgg	1500
tcccacgtgt acgtcacca ggcccagaca agacaccctg ccacagccac cgtgatcgac	1560
cacgagggcg tgatcgacag caacaccacc gccacatctg cccaccccg gaccaagatc	1620
acagtgcctg ctagatgggt ggtcaacggc atcgagcgga gcggcgaagt gaatccaag	1680
cccggacca agagcggcga cagagtggga atctgggtgg actctgccgg ccagctggtg	1740
gatgaacctg cccctctgc cagagccatt gccgatgctg ctctggctgc actgggcctg	1800
tggetgtctg tggcagctgt ggctggcgca ctgctggctc tgacaagagc catcctgac	1860
[0068] agagtgcgga acgccagttg gcagcacgat atcgacagcc tgttctgac ccagcgggag	1920
cagcccatca gaagatggcg gcctgccaga gtgccactgc tgccactggc tgctgtaca	1980
gtgcttctg cgcgcctgt gaccatgctg gtggtgctg tgggagctgg acctggcctg	2040
agagagatcg gactgccacc aggcgtgtca gccgtggctg ctgtgtctcc tagccctct	2100
gaagcctctc agcctgcccc tggcccaaga gatccaaca gacccttac cgtgtccgtg	2160
ttcggcgaca gcacggctg gaccctgatg cactacctgc ctcccacccc tggettccgg	2220
ttcatcgacc acacagtgat cggctgcagt ctctgctggg gcaccctta cagatatatc	2280
ggccagacc tggaacagcg ggccgagtgt gatggatggc ctgctaggtg gtccgcccag	2340
gtcaacagag atcagcccga cgtggcactg ctgatcgtgg gcagatggga gacagtggac	2400
agagtgaacg agggccggtg gaccacatc ggcgacccta cctttgacgc ctacctgaa	2460
gccgagetgc agcgggcctt gtctatcgtg ggaagcacag gcgtcagagt gatggtcacc	2520
accgtgccct acagcagagg cggcgagaag cctgacggca gactgtacc tgaggaccag	2580
cccgagcgcg tgaacaagtg gaacgcatg ctgcacaacg ccatcagcca gcacagcaac	2640
gtggcatga tcgacctgaa caagaagctg tgccccgacg gcgtgtacac cgccaaggtg	2700
gacggaatca aagtgcggag cgacggcgtg cacctgacct aggaaggcgt gaagtggctg	2760
atcccctggc tggaaagatag cgtgcgggtg gcctctgaac aaaaactcat ctcagaagag	2820
gatctgagcc atcatcatca tcate	2845
<210> 51	
<211> 2547	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	

<220>
 <223> nt sequence encoding fusion n?4
 "SS-Flag-Rv2029c*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*-Myc-His tag" (pTG18324)

<400> 51
 atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata tcatggcag tactgttaac tctccaaaca 60
 cccaccggtc aaatccattg gggcgattac aaggatgacg acgataagac cgagcctgcc 120
 gcctgggatg agggcaagcc cagaatcatc accctgacca tgaaccccgc cctggacatc 180
 accaccagcg tggacgtcgt gcgcccacc gagaagatga gatgtggcgc ccctagatac 240
 gaccctggcg gcggaggaat caacgtggcc agaategtgc acgtgctggg cggctgtagc 300
 accgccctgt ttccagctgg cggtctetaca ggctctctgc tgatggccct gctgggagat 360
 gccggcgtgc cttcagagt gatccctatc gccgccagca cccgcgagag cttcaccgtg 420
 aatgagagcc ggaccgcaa gcagtacaga ttctgtctgc ctggccccag cctgacagtg 480
 gccgaacagg aacagtgcct ggacgagctg agaggcgcg ctgcctctgc tgcttttgtg 540
 gtggcctctg gctctctgcc tcttgccgtg gccgcccact actatcagag agtggcccac 600
 atctgccggc ggagcagcac acctctgacg ctggatacaa gcggcggagg cctgcagcat 660
 atcagcagcg gagtgttctt gctgaaggcc agcgtccgcg agctgaggga atgtgtggga 720
 agcagctgctg tgaccgagcc cgaacagctg gccgctgccc acgagctgat cgatagagge 780
 agagcccagg tgggtggtgt gtctctggga tctcagggcg ctctgctggc cacaagacac 840
 gccagccacc ggttcagcag catccctatg acagccgtgt ctggcgtggg agccggcaat 900
 gctatggtgg ccgccatcac agtgggctg tctagaggct ggtccctgat caagtctgtg 960
 [0069] cggctgggca atgccgctgg cgctgctatg ctgctgacac ctggaacegc cgctgcaac 1020
 agggacgacg tggaaacggtt cttegagagc cagatcatgt acaactacce cgccatgctg 1080
 ggccacgccc gcgatatggc tggatatgcc ggcacactgc agagcctggg tgccgagatt 1140
 gccgtggaac aggctgccct ccagtctgcc tggcagggcg ataccggcat cacataccag 1200
 gcttggcagg ccagtgga aacaggccatg gaagatctcg tgcgggccta ccacgccatg 1260
 agcagcacac acgaggccaa caccatggcc atgatggccc gggatacagc cgaggcccgt 1320
 aagtggggag gaaccgagca gcagtggaac ttccgccgaa ttgaggccgc tgccagcgc 1380
 atccagggca acgtgacatc cateccacagc ctgctggacg agggcaagca gagcctgaca 1440
 aaactggctg ctgcctgggg cggtctctggc tctgaagctt atcagggcgt gcagcagaag 1500
 tgggacgcca ccgccaccga gctgaacaac gccctgcaga acctggcccg gacaatctct 1560
 gaagccggac aggccatggc cagcaccgag ggcaatgtga ccggcatggt tgccgagcag 1620
 cccatcagaa gatggcggcc tgccagagtg cactgctgc cactggctgc tgctacagtg 1680
 gcttctgccg ccgctgtgac catgctggtg gtgcctgtgg gagctggacc tggcctgaga 1740
 gagatcggac tgccaccagg cgtgtcagcc gtggtgctg tgtctctag ccctcctgaa 1800
 gcctctcagc ctgcccctgg cccaagagat cccaacagac cctcaccgt gtccgtgttc 1860
 ggcacagca tcggctggac cctgatgcac tacctgcctc ccaccctgg cttccggttc 1920
 atcgaccaca cagtgatecg ctgcagtctc gtgcggggca cccttacag atatatcggc 1980
 cagaccctgg aacagcgggc cgagtgtgat ggatggcctg ctaggtggtc cgcccaggtc 2040
 aacagagatc agcccagctg ggcactgctg atcgtgggca gatgggagac agtggacaga 2100
 gtgaacgagg gccggtggac ccacatcggc gaccctacct ttgacgcta cctgaacgcc 2160

	gagctgcagc gggccctgtc tatkgtggga agcacaggcg tcagagtgat ggtcaccacc	2220
	gtgccctaca gcagaggcgg cgagaagcct gacggcagac tgtaccctga ggaccagccc	2280
	gagcgcgtga acaagtggaa cgccatgctg cacaacgcca tcagccagca cagcaacgtg	2340
	ggcatgatcg acctgaacaa gaagctgtgc cccgacggcg tgtacaccgc caaggtggac	2400
	ggaatcaaag tgcggagcga cggcgtgcac ctgaccagg aaggcgtgaa gtggctgac	2460
	ccctggctgg aagatagcgt gcgggtggcc tctgaacaaa aactcatctc agaagaggat	2520
	ctgagccatc atcatcatca tcattga	2547
	<210> 52	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 52	
	cgcgcccgca ccatggatta caagatgac gacg	34
	<210> 53	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 53	
	cgctgctcgc cttgtaatcc atggtgcggc cgcg	34
[0070]	<210> 54	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 54	
	catctcagaa gaggatctgc atcatcatca tcatcattg	39
	<210> 55	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 55	
	caatgatgat gatgatgatg cagatcctct tctgagatg	39
	<210> 56	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 56	
	gatgacgacg ataaggctag cagagccacc gtgggactgg	40
	<210> 57	

	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 57	
	gatgagtttt tgttcgctag cctgttcac cgcacatctcg t	41
	<210> 58	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 58	
	gatgacgacg ataaggctag caaggccaaa gtcggcg	37
	<210> 59	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 59	
	gatgagtttt tgttcgctag ctgttctctt ggcgtgc	37
	<210> 60	
	<211> 41	
	<212> DNA	
[0071]	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 60	
	gatgacgacg ataaggctag cgattttgcc accctccac c	41
	<210> 61	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 61	
	gagatgagtt tttgttcgct agcgccagct gcaggagtc tgg	43
	<210> 62	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 62	
	gatgacgacg ataaggctag cgccaacggc agcatgagcg	40
	<210> 63	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	

	<223> primer	
	<400> 63 gagatgagtt tttgttcgct agcgttgcag gccagttca cga	43
	<210> 64 <211> 40 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 64 gatgacgacg ataaggetag cgtggacttc ggcgcctgc	40
	<210> 65 <211> 43 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 65 gagatgagtt tttgttcgct agcggcagcg gctggagttc tgg	43
	<210> 66 <211> 42 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
[0072]	<400> 66 gatgacgacg ataaggetag cacaaccgcc agagacatca tg	42
	<210> 67 <211> 40 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 67 gatgagtttt tgttcgctag cagaggccag ggccatgggg	40
	<210> 68 <211> 35 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 68 gttttgaaa attccaata accgtggacg gcacc	35
	<210> 69 <211> 35 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 69 ggtgccgtcc acggttattg ggaattttcc aaaac	35

	<210> 70	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 70	
	gaccgcatg tttgccagct atgttcttct ctctg	35
	<210> 71	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 71	
	cagagagaag aacatagctg gcaaacatgc cggtc	35
	<210> 72	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 72	
	gtttcggtaa gtttcctata aaggccaaag tcggcgac	38
[0073]	<210> 73	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 73	
	gtcgccgact ttggccttta taggaaactt accgaaac	38
	<210> 74	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 74	
	cctcctgcag ctggcagcta cgtactgcta tc	32
	<210> 75	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 75	
	gatagcagta cgtagctgcc agctgcagga gg	32
	<210> 76	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	

	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	76	
		gttttgggaa attccctatt gcctttctcta gacctg	36
	<210>	77	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	77	
		caggtctaga gaaggcaata gggaatttcc caaac	36
	<210>	78	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	78	
		gatcagatat cgcgccgcc gtagcaccat ggtaccacaa gcgc	44
	<210>	79	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
[0074]	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	79	
		ggcggcaggc tcggtgcccc aatggatttg ac	32
	<210>	80	
	<211>	124	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	promoter p7.5K	
	<400>	80	
		ccaccactt tttatagtaa gtttttcacc cataaataat aaatacaata attaatttct	60
		cgtaaaagta gaaaatatat tctaatttat tgcacggtaa ggaagtagaa tcataaagaa	120
		cagt	124
	<210>	81	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	81	
		gctggtagat ctcccaccca ctttttatag	30
	<210>	82	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	

	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	82	
		ccttgagacc catggtggac tgttctttat gattctactt cc	42
	<210>	83	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	83	
		gtagaatcat aaagaacagt ccaccatggg tctcaagggtg aac	43
	<210>	84	
	<211>	55	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	84	
		gagtcattct cgacttgcgg ccgcacaaaa atcaagaggc caccgcacg ctatc	55
	<210>	85	
	<211>	114	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
[0075]	<220>		
	<223>	promoter pH5R	
	<400>	85	
		tttattctat acttaaaaa tgaaaataaa tacaaagggtt cttgagggtt gtgttaaatt	60
		gaaagcgaga aataatcata aattatttca ttatcgcat atccgtaag tttg	114
	<210>	86	
	<211>	56	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	86	
		cctcttgatt tttgtgcggc cgctttatc tatacttaaa aatgaaaat aaatac	56
	<210>	87	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	87	
		ggacattaat taacaaactt aacggatata gcgataatg	39
	<210>	88	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	

	<400> 88 ggcaacttaat taaccacccat ggtaccacaaa gcgctg	36
	<210> 89 <211> 48 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 89 gttaacgcta gcctcgagac aaaaatcaaa gacgtgtttc gcctccac	48
	<210> 90 <211> 42 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 90 ggcaacttaat taaccacccat gaccgtggac ggcaccgcca tg	42
	<210> 91 <211> 51 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
[0076]	<400> 91 gttaacgcta gcctcgagac aaaaatcagg caaacatgcc ggtcacattg c	51
	<210> 92 <211> 100 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> promoter B2R	
	<400> 92 tatattatta agtgtggtgt ttggtcgatg taaaattttt gtcgataaaa attaaaaaat	60
	aacttaattt attattgatc tcgtgtgtac aaccgaaatc	100
	<210> 93 <211> 35 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 93 ggatcctcga gtatattatt aagtgtggtg tttgg	35
	<210> 94 <211> 48 <212> DNA <213> artificial sequence	
	<220> <223> primer	
	<400> 94 cttgcggtac catggtgggc tagcgatttc ggtgtgtacac acgagatc	48

	<210> 95	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 95	
	gtgtgtacaa ccgaaatcgc tagcccacca tggtagcgca agccc	45
	<210> 96	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 96	
	ctttccggat ccacaaaaat cacaggcggg tctc	34
	<210> 97	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 97	
	gtgtgtacaa ccgaaatcgc tagcccacca tgaaggccaa agtcggcgac tg	52
[0077]	<210> 98	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 98	
	gagtcggatc cacaaaaatc agccagctgc agg	33
	<210> 99	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 99	
	gagtcattct cgacttgccg ccgcacaaaa atcaagaggc caccgcac	49
	<210> 100	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 100	
	gctgtggat cccaccact ttttatagta agttttcac	40
	<210> 101	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	

	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	101	
		ggcacttaat taaccacat ggttcctcag gctctcc	37
[0078]	<210>	102	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial sequence	
	<220>		
	<223>	primer	
	<400>	102	
		gttaacgcta gcctcgagac aaaaatcacc gctgggtgca gaac	44

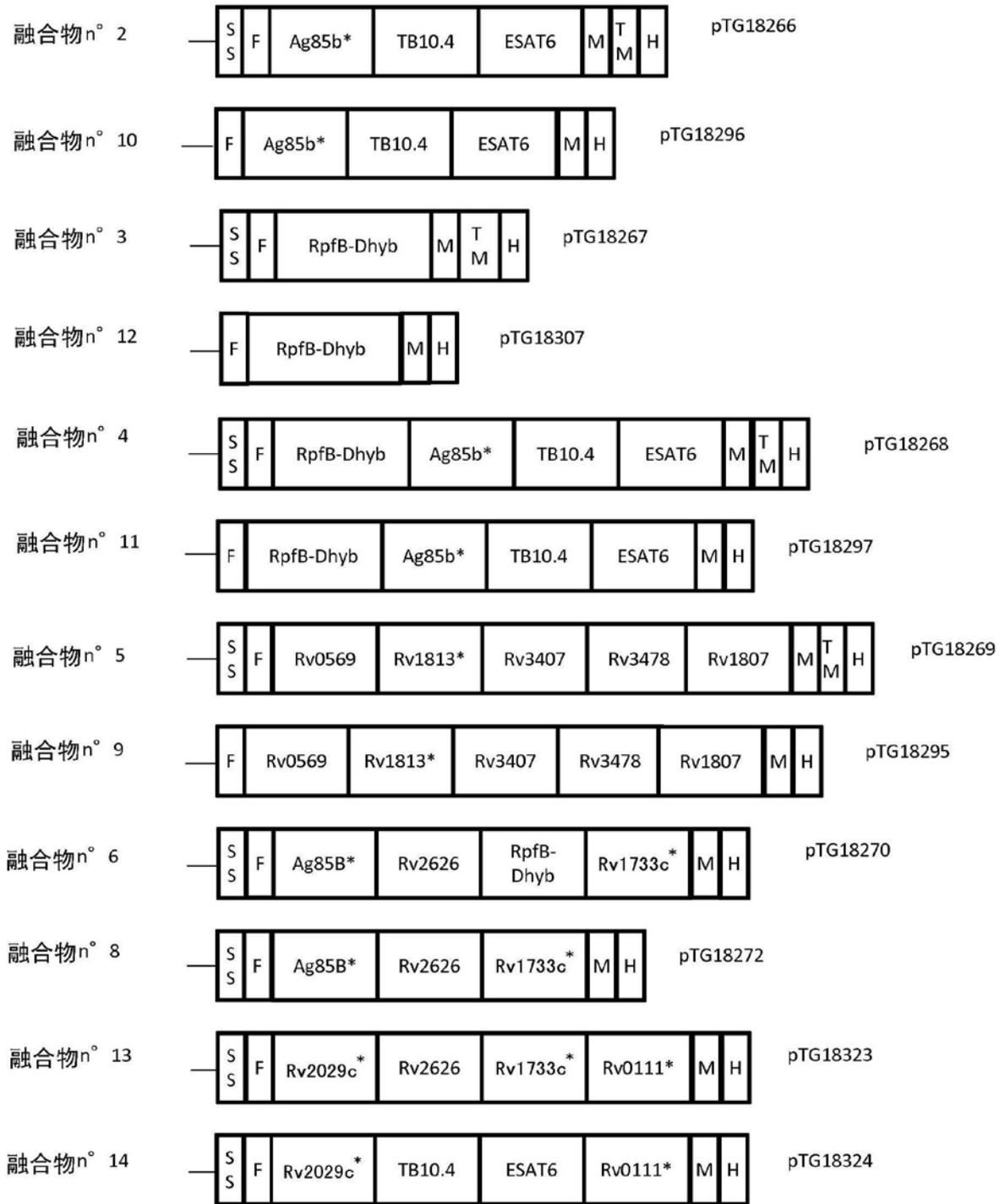


图1

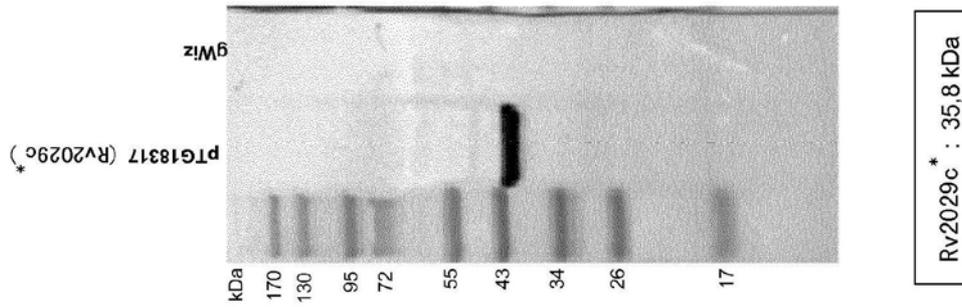


图2A

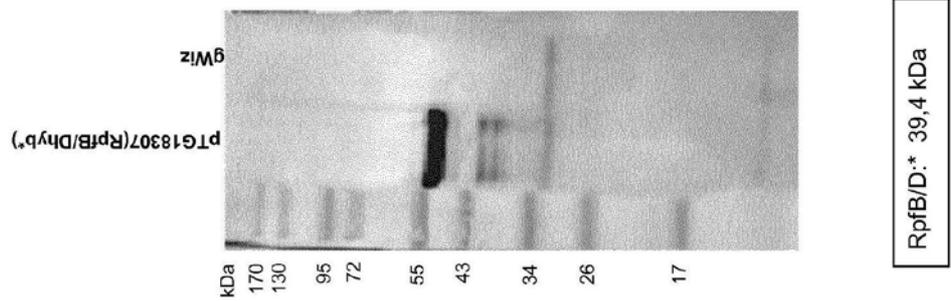


图2B

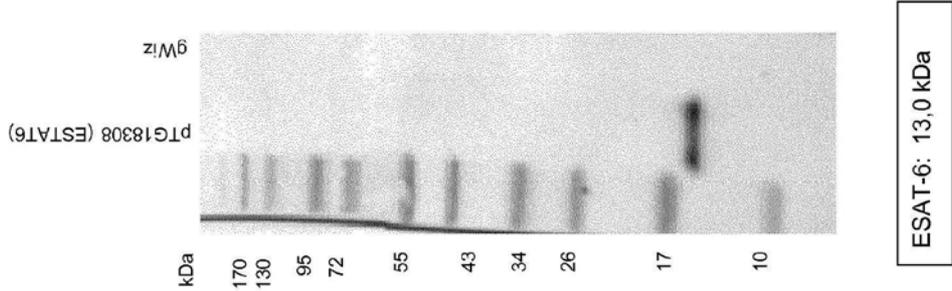


图2C

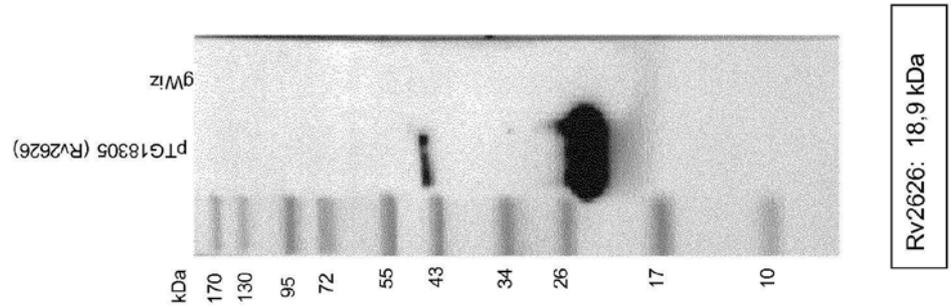
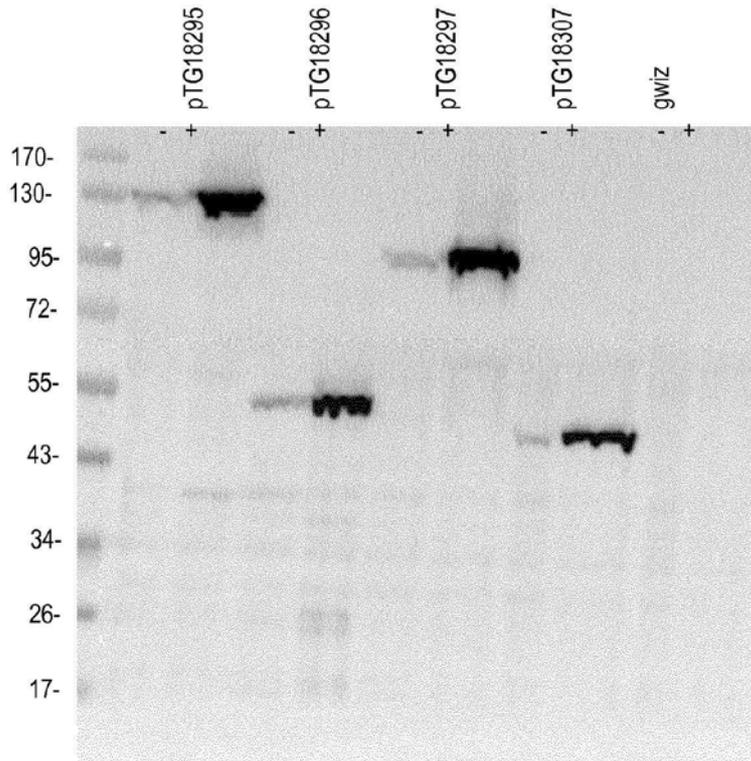


图2D



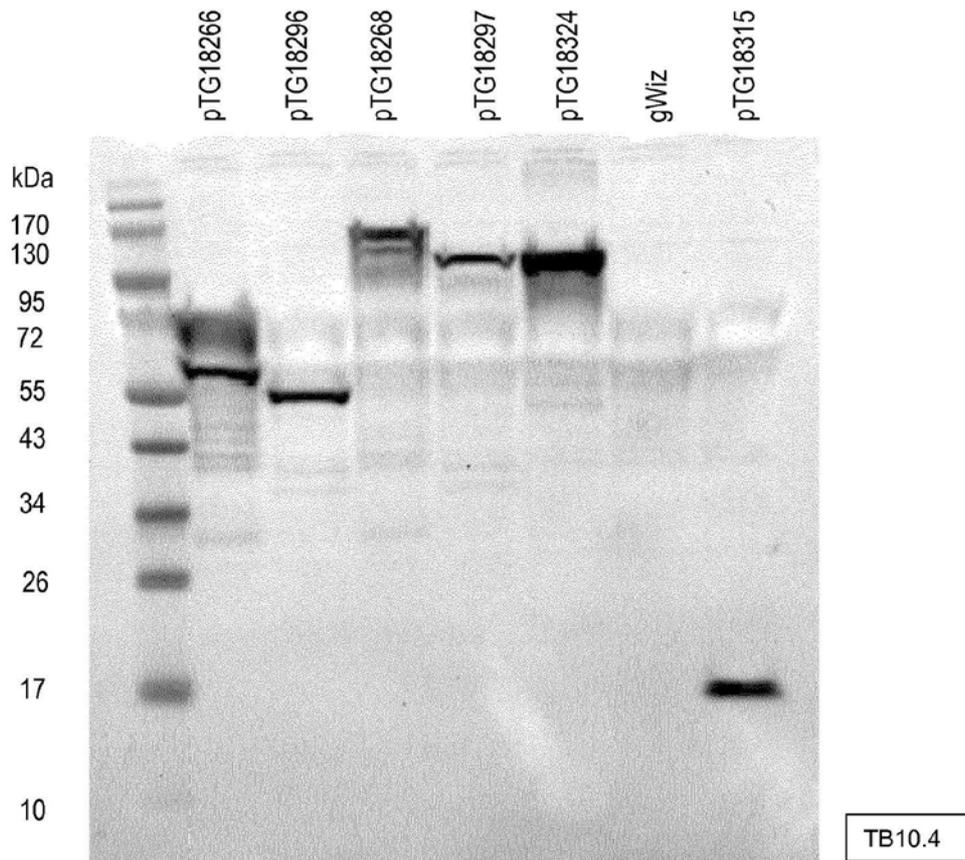
pTG18295: Flag-Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807-cMyc-His (pTg18269的细胞质形式) : 112,9 KDa

pTG18296: Flag-Ag85B-TB10.4-ESAT6-cMyc-His (pTg18266的细胞质形式) : 53,8 Kda

pTG18297: Flag-RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6-cMyc-His (pTg18268的细胞质形式) : 90 KDa

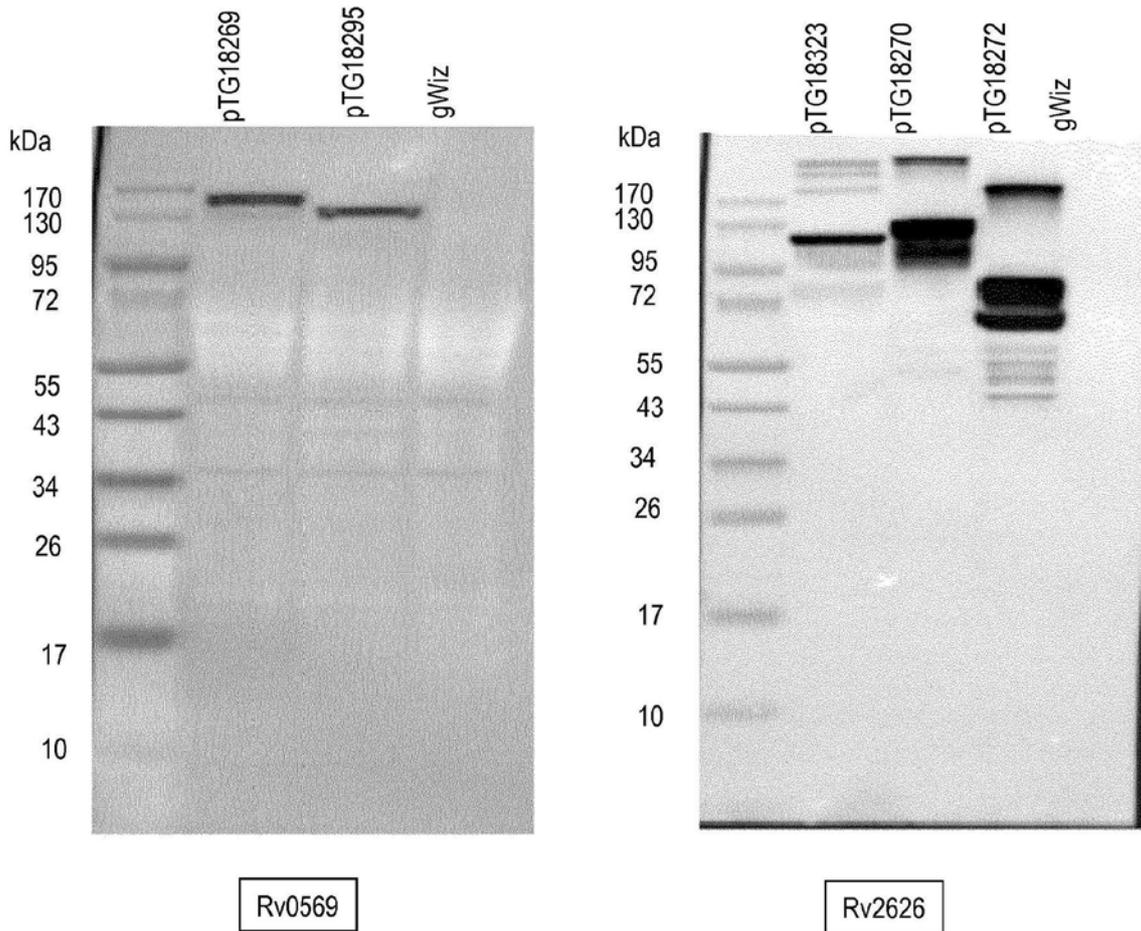
pTG18307: Flag-RpfB-Dhyb-cMyc-His (pTg18267的细胞质形式) : 39,3 KDa

图3



pTG18268: SR-Flag-RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10,4-ESAT6-cMyc-TMRv1-His/ **MW: 99,7kDA**
 pTG18266: SR-Flag-Ag85B-TB10,4-ESAT6-cMyc-TMR-His **MW:63,6kDa**
 pTG18296: Flag-Ag85B-TB10,4-ESAT6-cMyc-His (表达盒 2delSR-TMR) **MW:53,8kDA**
 pTG18297: Flag-RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10,4-ESAT6-cMyc-His (表达盒 4 delSR-TMR) **MW: 90kDA**
 pTG18324: SF-Flag- Rv2029c -TB10,4-ESAT6-Rv0111del1TM-cMyc-His/ **MW:90,6 kDa**
 pTG18315: TB10,4 **MW:13,5kDA**

图4A



pTG18269: SR-Flag-Rv0569-Rv1813-Rv3407-RV3478-Rv1807-cMyc-TMRv2-His/ **MW: 122kDA**
 pTG18295: Flag-Rv0569-Rv1813-RV3407-Rv3478-Rv1807-cMyc-His (表达盒 5 del SR-TMR) **MW: 112,9kDA**

pTG18323: SF-Flag-Rv2029c-Rv2626-Rv1733c-Rv0111del1TM-cMyc-His/ **MW:101,5kDa**
 pTG18270: SR-Flag-Ag85B-RV2626-RpfB-Dhyb-RV1733c-cMyc-His/ **MW:103,5kDa**
 pTG18272: SR-Flag-Ag85B-Rv2626-Rv1733c-cMyc-His/ **MW:67,3kDa**
 pTG18324: SF-Flag- Rv2029c-TB10.4-ESAT6-Rv0111del1TM-cMyc-His/ **MW:90,6 kDa**

图4B

图4C

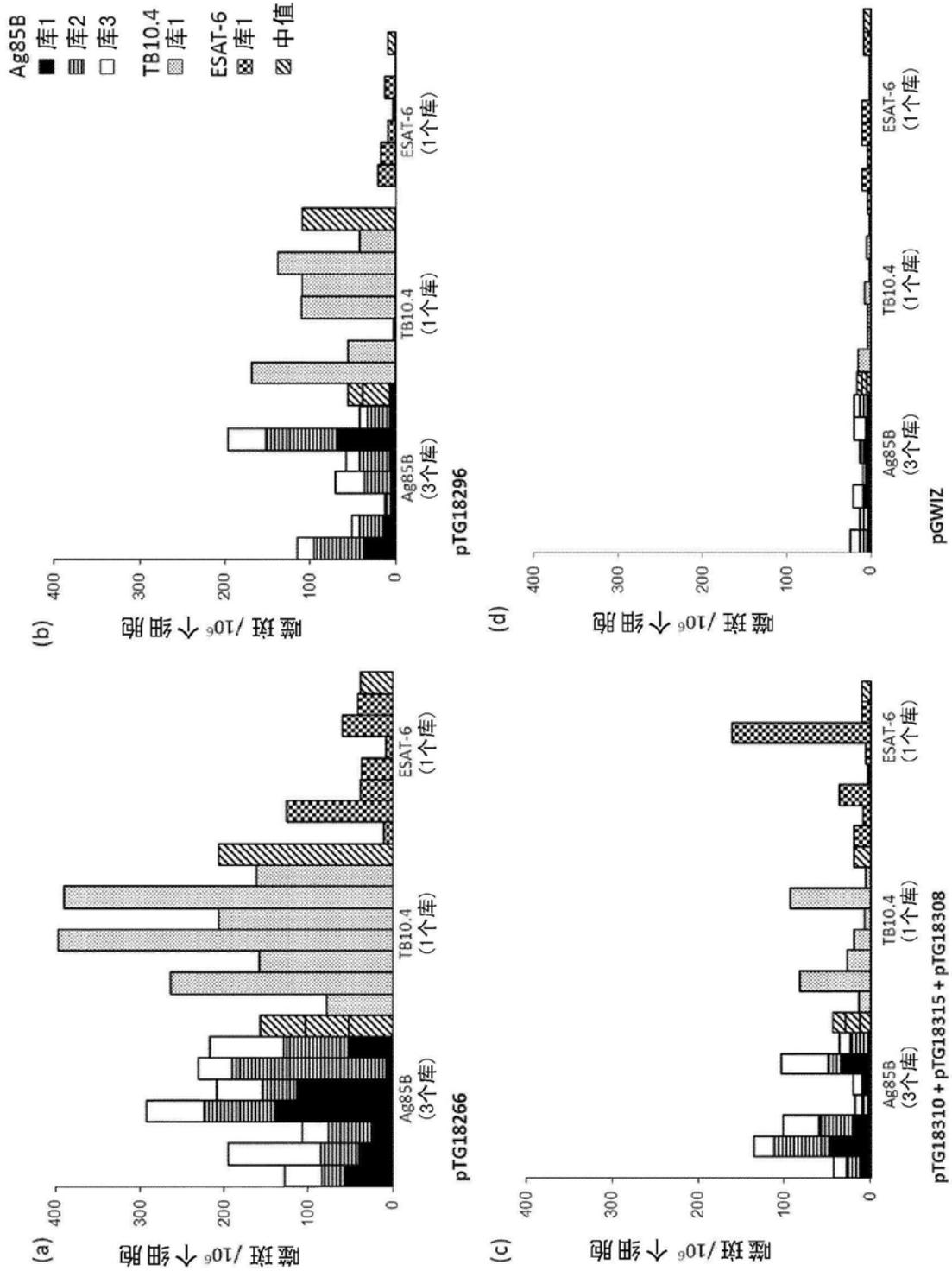


图5

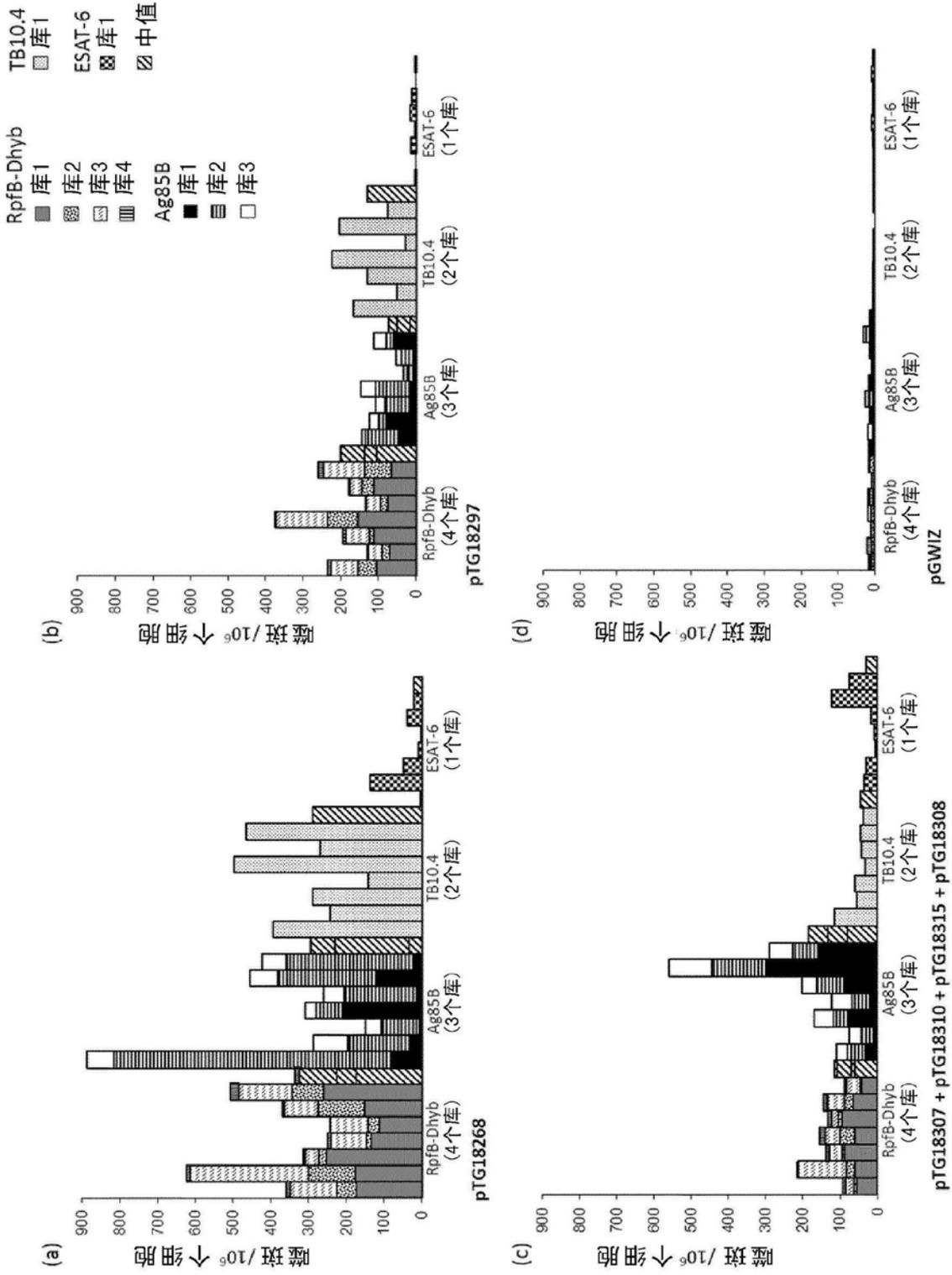


图9

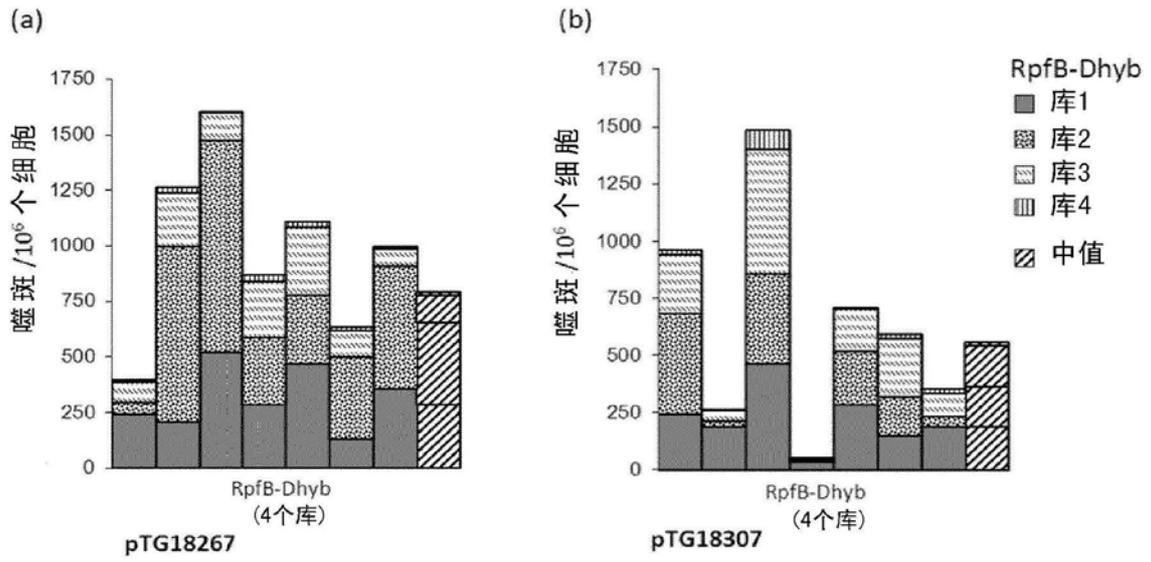


图7A

图7B

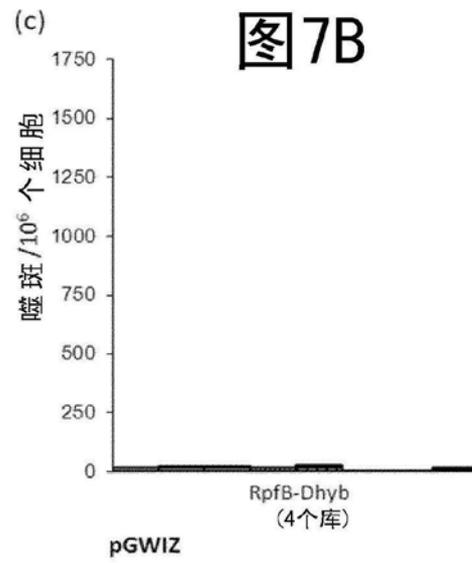


图7C

图7

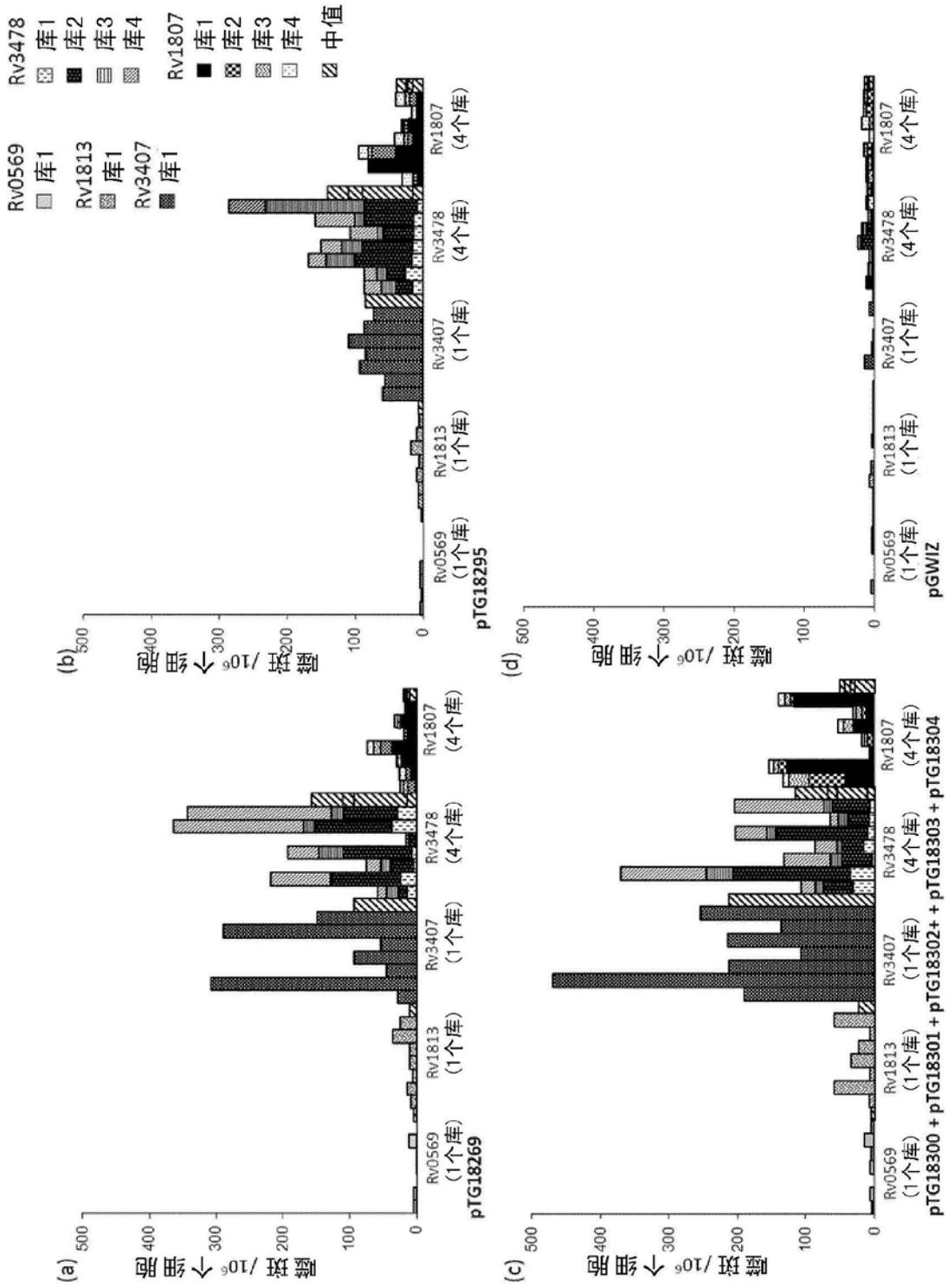
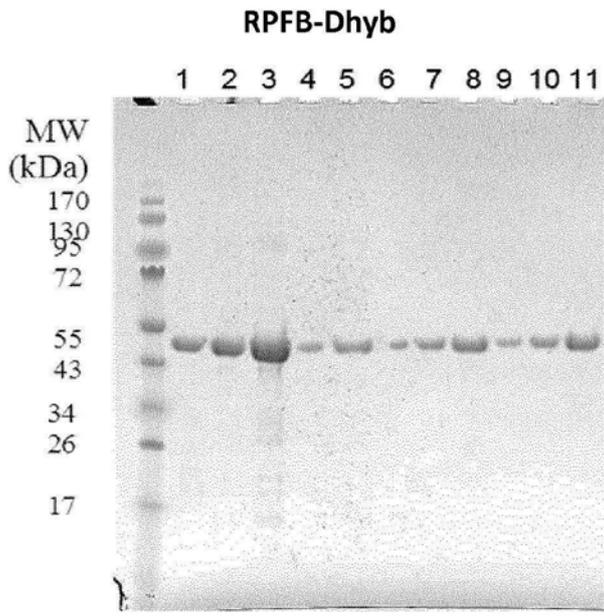
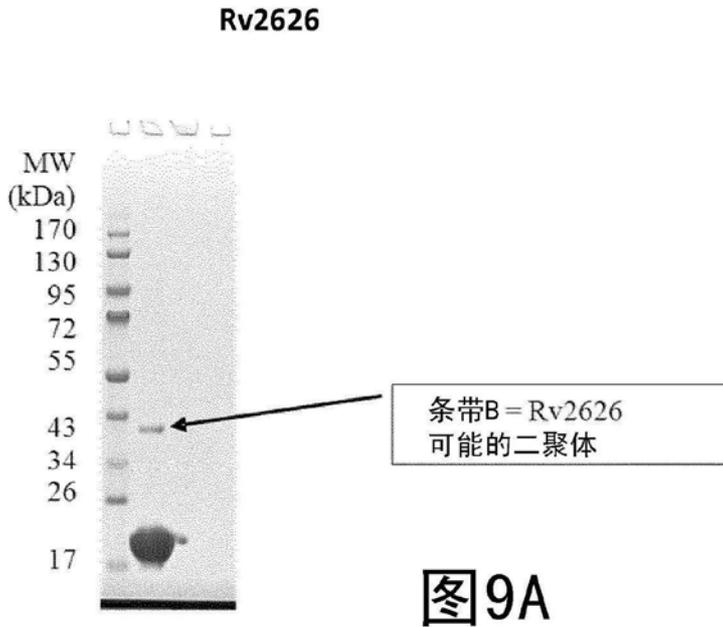
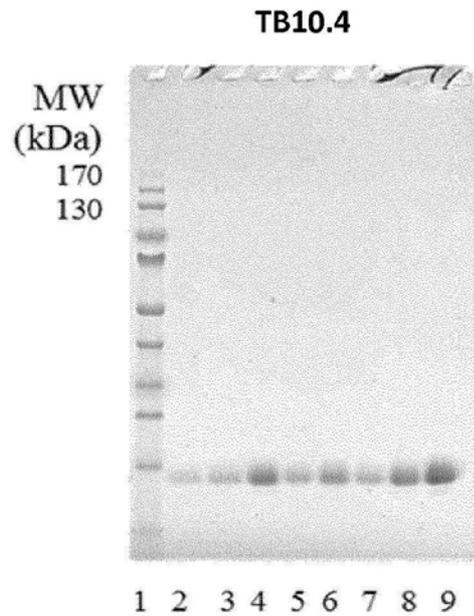


图8



泳道1到8: 纯化的中间产物部分
泳道9到11: 终产物库5, 10和15 μ L

图9B



Lane 1: MW
泳道1到6: 纯化的中间产物部分
泳道7到9: 终产物库1, 3和6 μ L

图9C

图9

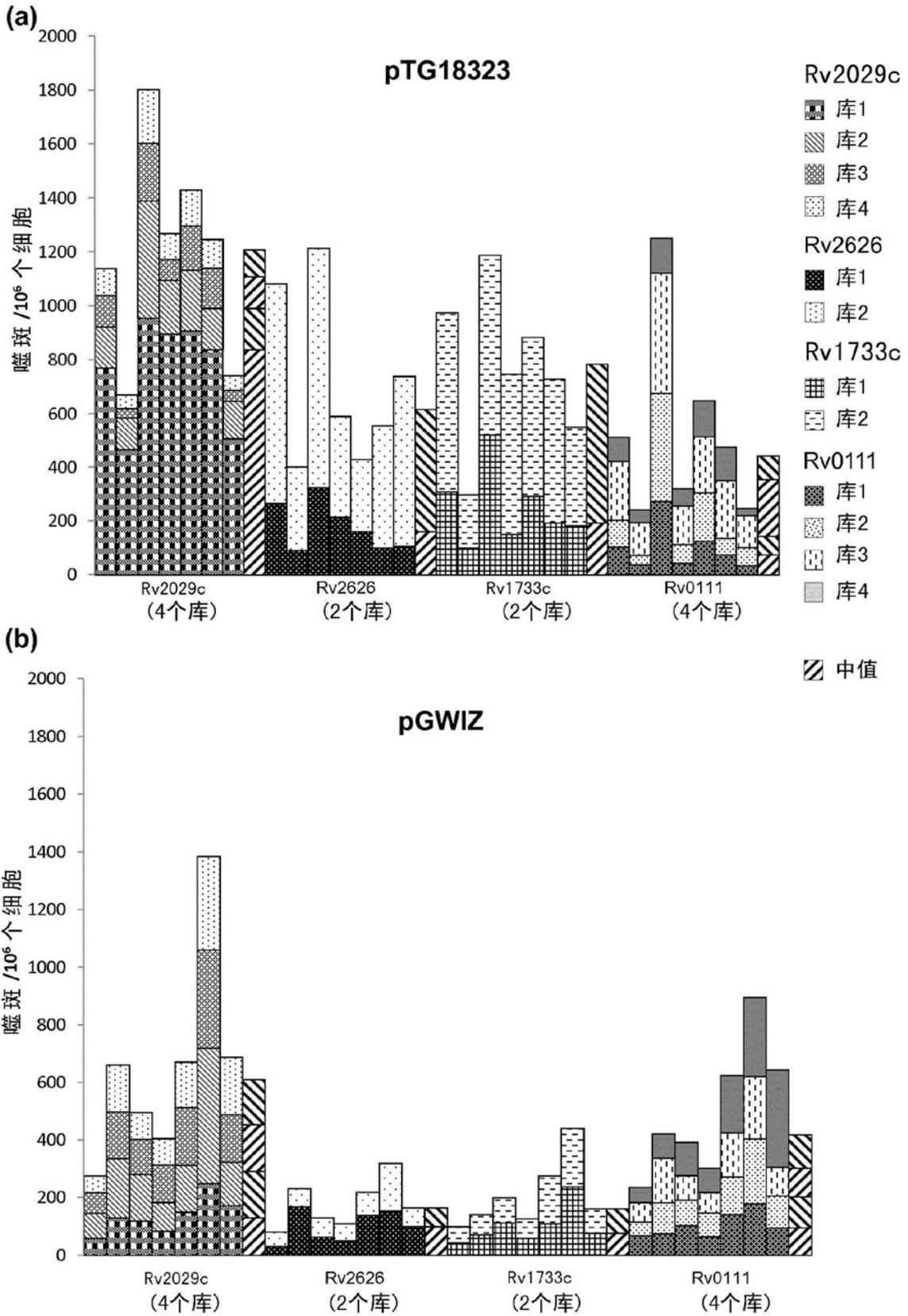


图10

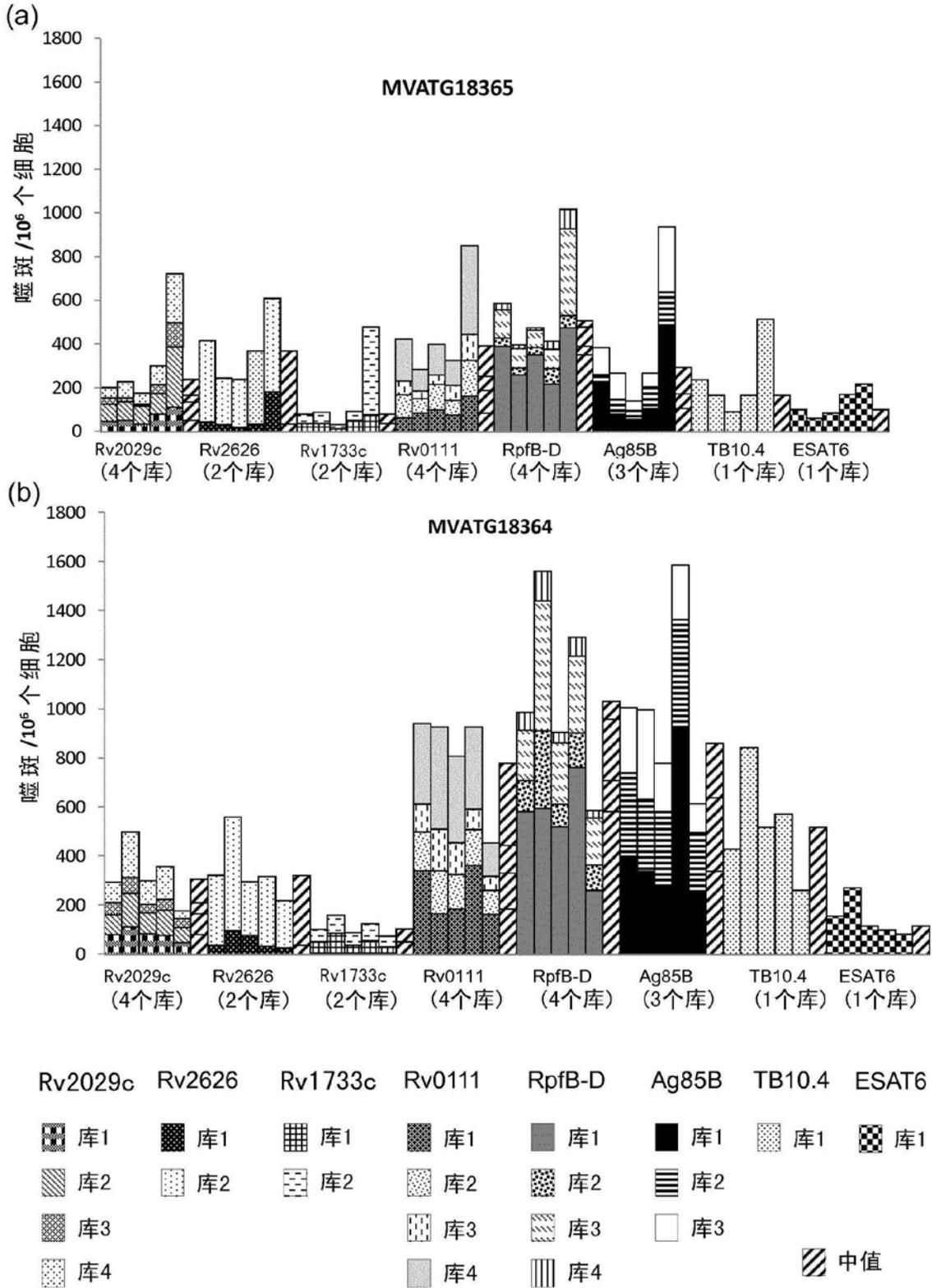


图11

-	中值 < 截断值
+	x1 < 中值 < x2截断值
++	x2 < 中值 < x3截断值
+++	中值 > x3截断值

疫苗	潜伏期							复苏期	活跃期				
	Rv1733c	Rv2029c	Rv2626	Rv0111	Rv0569	Rv1807	Rv1813	Rv3407	RpfB-D hyb	Rv3478	Ag85B	ESAT6	TB10.4
MVATG18355	-	-	++	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MVATG18364	-	-	++	+++	/	/	/	/	+++	/	+++	-	+++
MVATG18365	-	-	+++	-	/	/	/	/	+++	/	-	-	+
MVATG18377	-	+	++	++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	++
MVATG18379	-	-	++	++	-	-	-	-	+++	+	+	+	++
MVATG18376	-	-	+	+	-	+	-	+	+++	++	++	+	+++
MVATG18378	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	+	++	-	+++
MVATG18404	-	+	+++	++	/	/	/	/	/	/	+++	++	++
MVATG18417	-	-	+++	+	-	+	-	++	+++	+++	+++	+	+++
MVATG18418	-	-	+++	+++	-	+	-	+	+++	+	+++	+	+++

通过 TB 期

通过生物化学
基本原理

图12

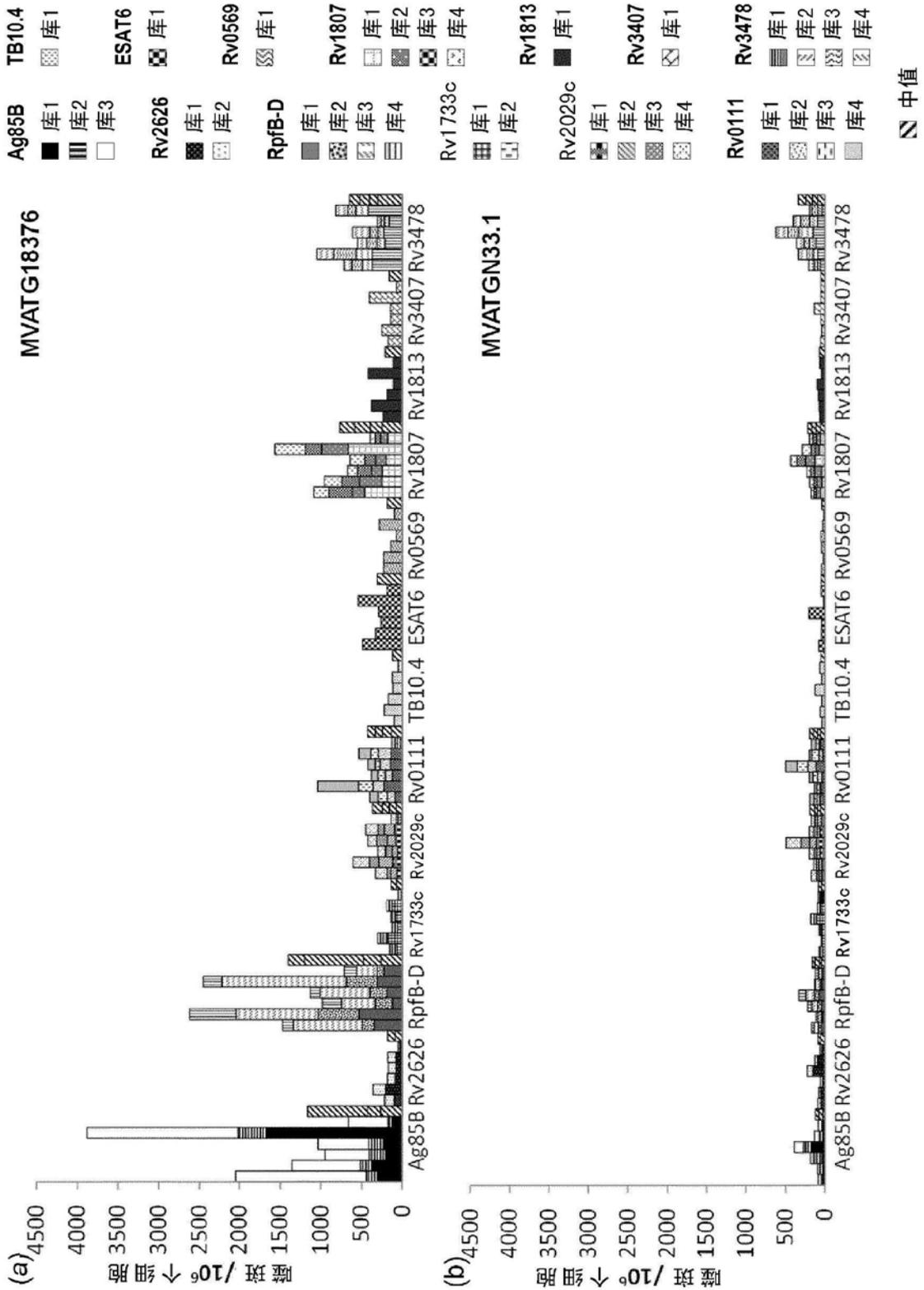


图13

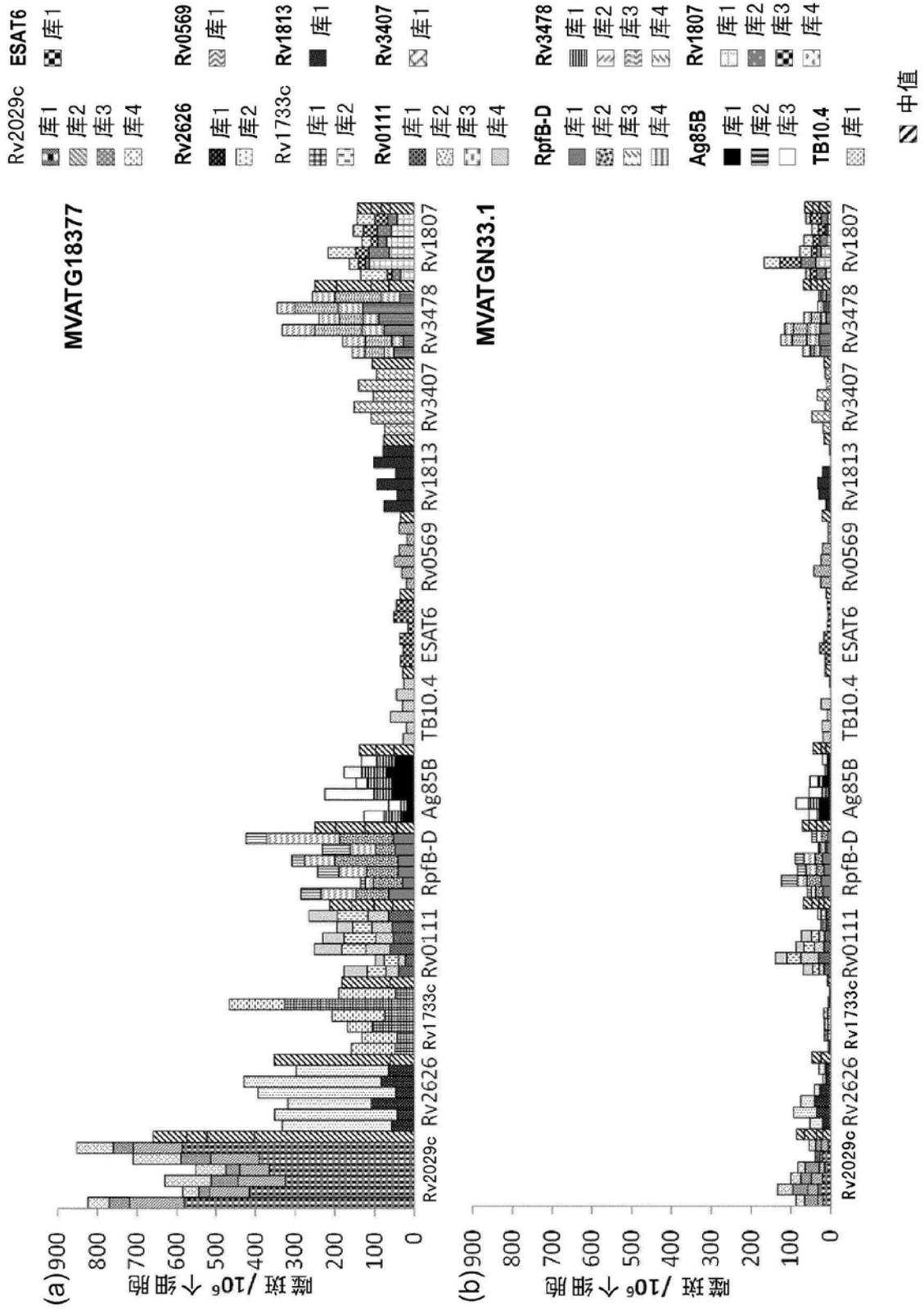


图14

-	中值 < 截断值
+	x1 < 中值 < x2截断值
++	x2 < 中值 < x3截断值
+++	中值 > x3截断值

疫苗	潜伏期							复苏期	活跃期					
	Rv1733c	Rv2029c	Rv2626	Rv0111	Rv0569	Rv1807	Rv1813	Rv3407	RpfB-D hyb	Rv3478	Ag85B	ESAT6	TB10.4	
HLA-A2	MVATG18376	-	-	-	-	+	+	+	+	+++	+	+++	+	-
	MVATG18378	-	-	-	+	+	+	++	-	+++	+	+++	+++	+
C57BL/6	MVATG18377	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	++	+++	+	-
	MVATG18379	-	-	-	-	+	++	-	-	++	+	+++	++	+
C3H/HeN	MVATG18376	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MVATG18378	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MVATG18377	+	+++	+++	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	MVATG18379	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图15