



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년05월19일
(11) 등록번호 10-1035053
(24) 등록일자 2011년05월09일

(51) Int. Cl.

A61K 38/39 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01) A61P 31/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7001874

(22) 출원일자(국제출원일자) 2006년06월20일

심사청구일자 2008년01월23일

(85) 번역문제출일자 2008년01월23일

(65) 공개번호 10-2008-0027877

(43) 공개일자 2008년03월28일

(86) 국제출원번호 PCT/DK2006/000356

(87) 국제공개번호 WO 2006/136162

국제공개일자 2006년12월28일

(30) 우선권주장

PA2005 00924 2005년06월23일 덴마크(DK)

PA2005 01393 2005년10월05일 덴마크(DK)

(56) 선행기술조사문헌

WO2003004520 A2

WO2004006952 A2

Mol Microbiol 43(3): 717-731 (2002)

Microbiol 148(Pt 10): 2967-2973 (2002.10)

전체 청구항 수 : 총 14 항

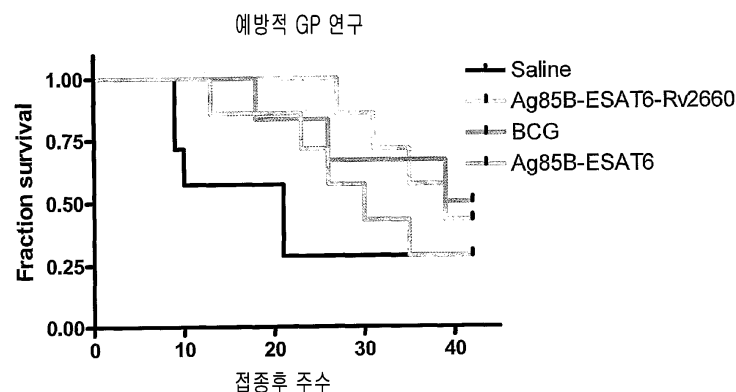
심사관 : 조경주

(54) 감염 잠복기 동안 발현되는 항원을 포함하는 결핵 백신

(57) 요약

본 발명은 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물, 상세하게 결핵균 복합체 (결핵균, 소결핵균, M 아프리카눔, M 미크로티) 중에 의한 감염 예방, 촉진 또는 치료에 관한 것이다. 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물은 융합 폴리펩타이드, 상세하게 결핵균으로부터의 한 개 또는 그 이상의 기아 유도 항원, 융합 폴리펩타이드의 유닛은 결핵균 항원을 포함한다. 더 나아가 본 발명은 융합 폴리펩타이드 서열 또는 본 발명의 핵산 서열을 포함한 백신 사용에 관한 것이다. 상기 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물은 BCG와 동시에, BCG와 혼합하여 또는 다른 곳 또는 방법 (different sites or routes)으로 개별적으로 투여한다.

대표도 - 도8



특허청구의 범위

청구항 1

SEQ ID NO. 12에 따른 기아 유도 항원을 포함하는, 결핵균 복합체에 의한 감염의 예방 또는 치료용 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 기아 유도 항원은 ESAT6, Ag85B, TB10.4 및 Ag85A로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리펩타이드에 융합된 융합 폴리펩타이드에 포함되는 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 예방용, 치료용, 다상 백신, 또는 BCG 백신의 면역 촉진용인 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 4

제 1항에 있어서, 피내, 경피, 피하, 근육 또는 점막 투여되는 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 융합 폴리펩타이드는 ESAT6, Ag85B, TB10.4 및 Ag85A로 이루어진 군에서 선택되는 2종의 상이한 면역원성 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 융합 폴리펩타이드는 ESAT6, Ag85B, TB10.4 및 Ag85A로 이루어진 군에서 선택되는 3종의 상이한 면역원성 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 7

제 2항에 있어서, 상기 융합 폴리펩타이드는 ESAT6, Ag85B, TB10.4 및 Ag85A로 이루어진 군에서 선택되는 4종의 상이한 면역원성 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 8

제 1항에 있어서, ESAT6-Ag85A-X, ESAT6-Ag85B-X, Ag8A-X, Ag85B-X, TB10.4-Ag85A-X 및 TB10.4-Ag85B-X의 조합을 갖는 융합 폴리펩타이드(여기서 X는 SEQ ID NO. 12에 따른 기아 유도 항원이고, 항원 단위들의 배열은 임의의 조합일 수 있음)를 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 9

제 8항에 있어서, Ag85B-ESAT6-Rv2660c; Ag85B-TB10.4-Rv2660c; Ag85B-Rv2660c; Ag85A-Rv2660c; Ag85A-ESAT6-Rv2660c; Ag85A-TB10.4-Rv2660c; 및 Rv2660c-Rv2659c를 상기 폴리펩타이드 단위들의 임의의 배열로 포함하는 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항의 기아 유도 항원을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 결핵균 복합체에 의한 감염의 예방 또는 치료용 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 12

제 11항에 있어서, 예방용, 치료용, 예방 및 치료용, 다상 백신, 또는 BCG 백신의 면역 촉진용인 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제 1항에 있어서, 악성 마이코박테리움에 의한 활성 또는 잠복성 결핵균이 있는 동물 치료용 또는 BCG 백신으로 부터의 면역성 촉진용인 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 18

제 1항에 있어서, 악성 마이코박테리움에 의한 감염의 예방용인 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 19

제 17항 또는 제 18항에 있어서, 마이코박테리움은 결핵균, 소결핵균, 마이코박테리움 아프리카눔, 나병균 또는 마이코박테리움 열서란스로부터 선택된 것인 면역원성 조성물 또는 백신.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 기아 유도 항원, 기아 동안 유도된 결핵균(Mycobacterium tuberculosis) 유래 폴리펩타이드를 기초로 하는 면역원성 폴리펩타이드의 새로운 융합 폴리펩타이드, 및 인간/동물 투여용 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물의 제조를 위한 본원의 하나 이상의 융합 폴리펩타이드 또는 기아 유도 항원의 용도 및 그 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물을 개시한다.

배경기술

[0002] 결핵균으로 인한 인간의 결핵은 심각한 세계적 건강 문제로서 세계건강보건기구(WHO)에 의하면 연간 약 300만명을 사망에 이르게 한다. 세계적으로 새로운 결핵(TB)의 발병률이 1960년대와 1970년대에 감소하였으나 이와 같은 동향이 최근에는 AIDS의 출현과 결핵균 (M. tuberculosis)의 다약제 저항 변종의 등장으로 현저히 변화되었다.

- [0003] 현재 임상사용이 가능한 유일한 백신은 그 효능이 논쟁의 대상인 BCG이다. BCG는 일반적으로 동물 TB 모델에서는 높은 저항력을 유도하나 인간의 경우 뇌수막염(meningitis)과 속립결핵(miliary tuberculosis)과 같은 파종성 형태의 결핵에 한하여 보호효능이 있다. 소아에게 투여시 결핵에 대하여 몇 년간 방어적이거나 그 후 효능이 변화된다. 다양한 관리된 실험 비교를 통하여 성인의 BCG 효능은 효과가 없는 경우부터 80%의 방어까지 그 범위가 극적으로 다양하다. 이러한 이유로 WHO가 가장 우선적이고 긴급한 문제라고 한 결핵균에 대항하는 새롭고 개선된 백신 개발을 하였다.
- [0004] 항산균성의 보호 물질(protective mycobacterial substances)을 정의하기 위한 많은 시도가 있었으며 다른 조사는 실험적 예방접종 후 저항이 증가함을 보고하였다. 결핵균 및 그 분비물은 새로운 결핵균 백신 생산에 잠재적으로 관련 가능성이 있는 몇몇 단백질을 소유한다. 후보 분자에 관한 실험은 분화 박테리아로부터 방출된 단백질에 주요 초점을 맞추고 있다. 다량의 그러한 단백질의 특징에도 불구하고 단지 일부 아단위의 백신, 가장 눈에 띄게는 ESAT-6 및 Ag85B 만이 동물 모델에서 보호 면역 반응의 유도를 보였다 (Brandt et al 2000). 그러나 BCG의 효능과 더불어 특정 장기 보호 면역 반응에 대한 설명 또는 BCG 예방접종한 사람에 있어 촉진 가능성은 아직 이루어지지 않았다. BCG와 함께하는 BCG 효능 촉진제는 효능을 보이지 않았다 (Colditz, 1994). BCG 면역 촉진제와 Ag85a가 타고난 쥐 품종에서 일부 보호기능을 보였으나 (Brooks et al IAI 2001; W00204018) BCG 단독과 비교하였을 때 두드러진 차도가 있는 것은 아니다. BCG가 보호 면역 반응 유도하기 위하여 단백질의 분화와 분비를 필요로 하기 때문에 면역 촉진 효과의 결핍은 항산균 환경의 증감 또는 초기 BCG 백신의 잔여 면역원성 반응에 의한 것이다. 이 두 가지는 BCG를 상대로 한 신속한 면역 반응을 이끌며 그로 인해 BCG의 배출 및 신속한 성장 억제제가 나타난다.
- [0005] 결핵균의 감염은 3단계 구성이다. 급성시기에 박테리아는 장기에서 면역 반응이 증가 될 때까지 증가한다. 민감해진 CD4 T 림포사이트 (CD4 T Lymphocyte)가 감염 조절을 매개하며 가장 중요한 매개 분자는 인터페론 감마 (IFN-감마)로 보인다. 박테리아의 양이 감소하기 시작하고 박테리아의 양이 낮은 단계에서 일정하게 유지 되면, 잠복시기가 형성된다. 이 기간에 결핵균은 활발한 증식을 하지 않고 육아종 내에 남아있는 비활동 상태로 전환한다. 일부의 경우, 감염이 재활동 시기로 전환되며 잠복중인 박테리아가 다시 복제를 시작한다. 결핵균이 초기 감염에서 잠복기로 전환할 때 유전자 발현 변화가 동반하는 것으로 제시되었다 (Honer zu Bentrup, 2001). 또한, 박테리아가 활성 복제기에서 잠복기로 전환하는 동안 박테리아가 유전자 발현을 조절하여 면역 반응에 관한 항원 특이성에 변화가 나타날 가능성이 있다. 잠복기 감염 조절에 관한 면역 반응 전체 및 재활동 요인에 관하여 상당 부분이 알려지지 않았다. 그러나 우성 세포 종류의 변경에 의한 것이라는 일부 증거가 있다. CD4 T 세포는 급성시기에 감염 조절에 필수적이고 충분하며 CD8 T 세포는 잠복기에 더 중요하게 반응한다고 알려졌다. 1998 Cole 등은 결핵균의 게놈 배열 전체를 발표하였으며 뉴클리오티드 배열 및 추정된 단백질 배열을 밝히는 약 4,000의 오픈 리딩 프레임 (open reading frame)(Cole et al 1998)의 존재를 예측하였다. 그러나 중요한 것은 만약 DNA가 생체 조건 안에서 단백질로 번역 및 발현되는 경우에 이 배열 정보는 예측에 사용될 수 없다는 것이다. 일부 결핵균의 유전자는 잠복기를 모방한 환경에서 증가 조절이 된다고 알려졌다. 그러나 이점은 잠복 감염 시기의 전체 유전자 발현 중 제한된 일부일 뿐이다. 나아가 본 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 유전자의 표현이 좋은 백신 후보를 만드는데 충분하지 않음을 쉽게 알 수 있다. 결핵균의 감염 잠복 기간 동안 단백질이 면역 시스템에 인지되는지의 판단 여부는 주어진 단백질을 생산하고 여기에서 설명된 적합한 분석 테스트를 통해서 유일하게 가능하다. 일부 몇몇의 단백질이 특별히 중요하며 후기의 항원이 될 가능성(잠복기에 인지되는 항원)이 있다. 이는 그들이 감염 이후 비교적 긴 시간이 지난 후, 면역원성 시스템이 첫 번째 적응할 수 있는 방어에 고정되며 환경이 항산균에서 보다 적대적일 때 나타난다. 본 내용과의 관련성은 사전에 추측된 저산소 환경을 흉내 낸 저산소 배양 시험관 환경이 유전 발현 변화의 분석을 위하여 사용된 것이다. 일부 몇몇 개의 항원은 이와 같은 환경에서 유도 및 확연하게 향상조정되었음이 밝혀졌다. 예, 16KDa 항원 알파-크리스탈린 (Sherman 2001), Rv2660c 및 Rv2659c (Betts, 2002). (본 독자적 사용) 특별히 관심 있는 기아에 관한 다른 환경적 자극으로는 기아에 의한 것이며, 이는 글레뉴로마(Granuloma) (잠복기 감염 장소)에 영양공급을 차단하고 기아 기간 동안 발현 증가된 유전자 생성물을 반영하여 고안되었다. 그리하여, 감염 잠복기 기간의 목적 항원으로 특별하게 관심을 갖게 된다.
- [0006] 초기 감염기간 동안 발현되는 항원은 200여 개 이상으로 알려져 있으며 백신으로서 실험되었을 때 반 다스(half dozen) 미만이 효과적인 가능성을 보였다. 지금까지 단 하나의 항원만이 치료용 백신의 가능성을 보였다 (Lowire, 1999). 그러나, 이 백신은 DNA 백신으로 투여시에만 효능이 있으며, 다른 그룹에서는 백신의 비특이성 보호 및 심지어는 병의 악화를 주장하여 논쟁의 여지가 있다(Turner, 2000). 이에 비하여, 본 발명에 설명된 폴리펩타이드 융합은 제공된 실시예에서 설명한 것처럼 잘 알려진 백신기술을 사용한 백신에 혼합될 수

있다.

[0007] 또한, TB 백신이 불임 면역(sterilizing immunity)의 결과를 초래하지 않으며 준임상 단계에서 감염을 조절하기에 (따라서 다음의 감염 잠복기 형성의 결과), 예방 및 치료성분이 혼합된 다상(multiphase) 백신이 본 발명에서 설명되었다. 일반적인 예방 백신 이후, 일차 면역원성 반응 회피 및 추후 잠복기 발전은 아마 적어도 침략하는 박테리아의 항원 프로파일 변화에 따른 것이라 여겨진다. 따라서, 잠복 TB에 연관된 항원을 포함한 백신은 잠복기 형성을 예방 및 감소시키며 이에 따라서 첫 번째 대수(logarithmic) 성장시기 및 잠복기 기간의 박테리아에 발현된 항원을 포함한 백신을 예방 백신으로 사용하였을 때 장기간 면역원성이 향상될 것이다. 또한, 이와 같은 다상의 백신은 제삼세계의 대다수의 잠복감염자가 미래 TB 백신을 접종하였을 경우 치료 백신으로도 효과적이다.

발명의 상세한 설명

[0008] 본 발명은 일종의 결핵균 복합체 예를 들어 결핵균(M. tuberculosis), 소결핵균(M. bovis), 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum) 등에 의해 유발된 감염의 예방(촉진 백신 및 다상 백신 포함) 또는/및 치료용 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물에 관한 것으로서, 상기 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물은 기아 유도된 항원, 또는 융합 폴리펩타이드 단위가 결핵균 항원인 하나 이상의 기아 유도된 결핵균 항원을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함한다. 또한, 본 발명은 상기 융합 폴리펩타이드, 및 상기 융합 폴리펩타이드를 부호화하는 핵산 서열과 관련된다. 게다가, 본 발명은 합성적으로 제조된 짧거나 긴, 겹쳐지거나 겹쳐지지 않은 폴리펩타이드, 또는 제조합형의 용도와 관련된다. 또한, 본 발명은 상기 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물의 제조를 위한 본원의 기아 유도된 항원 또는 융합 폴리펩타이드 서열 또는 핵산 서열의 용도 및 이에 따라 제조된 백신 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물의 제조를 위해, BCG와 동시 투여 또는 BCG와 혼합되거나 다른 자리 또는 경로로 분리 투여되는 본원의 기아 유도된 항원 또는 융합 폴리펩타이드 서열 또는 핵산 서열을 포함하는 백신의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 BCG 촉진제로 투여되는 기아 유도된 항원 또는 융합 폴리펩타이드 서열 또는 핵산 서열을 포함하는 백신의 용도와 관련된다. 더불어, 자연 감염의 초기 및 말기에 발현되는 항원을 포함함으로써, 백신은 면역 체계가 잠복기 동안을 포함하는 특정 시기에 가장 효율적인 임의의 항원 결정기가 있는 병원균을 박멸하도록 하는 두 단계 면역 반응을 유도한다.

[0009] 본 발명은 기아 유도된 항원 또는 하나 이상의 기아 유도된 항원을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물을 개시한다.

[0010] 이러한 기아 유도된(기아 동안 6.5배 초과 상향 조절되거나 유전적으로 기아 유도된 유전자와 연결된) 항원의 아미노산 및 핵산 서열은 다음과 같이 서열 목록으로 나타난다:

기아 유도 항원	DNA 연속 ID 번호	aa 연속 ID 번호
Rv2655	1	2
Rv2656	3	4
Rv2657	5	6
Rv2658	7	8
Rv2659c	9	10
Rv2660c	11	12
Rv2661	13	14
Rv2662	15	16
Rv2663	17	18
Rv0188	19	20
Rv3290c	21	22
Rv3289c	23	24
Rv2034	25	26
Rv2169c	27	28
Rv0116c	29	30
Rv2558	31	32
Rv1152	33	34
Rv3291c	35	36

Rv1284	37	38
Rv1954c	39	40
Rv3810	41	42
Rv2517c	43	44
Rv3288c	45	46
Rv0789c	47	48
Rv1955	49	50
Rv3735	51	52
Rv3675	53	54
Rv2270	55	56
Rv2050	57	58
Rv3287c	59	60
Rv2557	61	62
Rv0122	63	64
Rv2497c	65	66
Rv1250	67	68
Rv1552	69	70
Rv2526	71	72
Rv1809	73	74
Rv0918	75	76
Rv0516c	77	78
Rv2745c	79	80
Rv1472	81	82
Rv1660	83	84
Rv2302	85	86

[0012] 위 내용에서, 결핵균 유래 폴리펩티드에 기초한 각 면역성 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 "단위(unit)"로 명명하였다. 융합은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 심지어 10개의 상이한 단위를 포함할 수 있다.

[0013] 융합 폴리펩티드 단위의 순서는 어떠한 조합도 가능하다. 순서의 조건에 있어서, 임의로 조합된 모든 항원의 융합 폴리펩티드는 본 발명의 범위에 속한다. 본 발명의 융합 폴리펩티드는 다음에서 상세하게 기재될 바와 같이 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물, 특히 BCG 촉진제 백신(booster vaccin)을 제조하는데 유용하다.

[0014] 기아 폴리펩티드와 함께, 융합 폴리펩티드의 바람직한 폴리펩티드 구성 단위는 다음과 같은 생어 (Sanger) 고유 번호와 아미노산 서열을 갖고 있다.

[0015]

종명	생어 ID
ESAT6	Rv3875
TB10.4	Rv0288
Ag85A	Rv3804c
Ag85B	Rv1886c
ORF2c	Rv3871 (c-말단)
TB13.0	Rv1036
TB9.56	Rv0285
TB9.8	Rv0287

[0016]

폴리펩타이드	아미노산 서열
ESAT6	MTEQQWNFAG IEAAASAIQG NVTSIHSLLD EGKQSLTKLA AAWGGSGSEA YQGVQQKWDA TATELNALQ NLARTISEAG QAMASTEGRV TGMFA

Ag85A	SRGPLP VEYLQVSPS MGRDIKVQFQ SGGANSPALY LLDGLRAQDD FSGWDINTPA FEWYDQSGLS VVMFVGGQSS FYSDWYQAC GKAGCQTYKW ETFLTSELPG WLQANRHVKP TGSAAVGLSM AASSALTLAI YHPQQFVYAG AMSGLLDPSQ AMGPTLIGLA MGDAGGYKAS DMWGPKEDEPA WQRNDPLLNV GKLIANNTRV WVYCGNGKPS DLGGNNLPAK FLEGFVRTSN IKFQDAYNAG GGHNGVDFDP DSGTHSWEYW GAQLNAMKPD LQRALGATPN TGPAPQGA
Ag85B	SRGPLPVEY LQVSPSPMGR DIKVQFQSGG NNSPAVYLLD GLRAQDDYNG WDINTPAFEW YYQSGLSIVM PVGGQSSFY S DWYSPACGKA GCQTYKWETF LTSELPQWLS ANRAVKPTGS AAIGLSMAGS SAMILAAHYHP QQFIYAGSLS ALLDPSQGMG PSLIGLAMGD AGGYKAADMW GPSSDPAWER NDPTQQIPKL VANNTLWVY CGNGTPNELG GANIPAEFLE NFVRSSNLKF QDAYNAAGGH NAVFNFPNG THSWEYWAQ LNAMKGLQS SLGAG
TB10.4	MSQIMYNYP MLGHAGDMAG YAGTLQSLGA EIAVEQAALQ SAWQGDGTIT YQAWQAQWNQ AMEDLVRAYH AMSSTHEANT MAMMARDTAE AAKWGG
ORF2c	MIVGAAGGMP PMAPLAPLLP AAADIGLHII VTCQMSQAYK ATMDKFVGAA FGSGAPTMLF SGKEQEFPS EFKVKRRPPG QAFLVSPDGK VIQAPYIEPP EEVFAAPSA G
Rv1036	LIPGRMVLNW EDGLNALVAE GIEAIVFRTL GDQCWLWESL LPDEVRRLE ELARVDALLD DPAPFAPFVP FFDPRRGRPS TPMEVYLQML FVKFRYRLGY ESLCREVADS IT
Rv0285	MTLRVVEPEL AAASAAVEAL TARLAAHAS AAPVITAVP PAADPVSLQT AAGFSAQGV E HAVVTAEGVE ELGRAGVG V ESGASYLAGD AAAATYGVV GG
Rv0287	MSLLDAHIPQ LVASQSAFAA KAGLMRHTIG QAEQAAMSAQ AFHQGESSAA FQAHAHFVA AAAKVNTLLD VAQANLGEAA GTYVAADAAA ASTYTGTF

- [0017] 융합 폴리펩티드의 바람직한 조합은 하나 이상의 기아 유도 항원 (X)을 가진 다양한 배열 단위 서열을 갖는 다음의 폴리펩타이드를 포함한다: ESAT6-Ag85A-X, ESAT6-Ag85B-X, Ag8A-X, Ag85B-X, TB10-Ag85A-X, TB10-Ag85B-X; (여기서 X는 임의의 기아 유도 항원이며, 여기서 항원 단위의 배열은 역방향의 배열 또는 X가 중앙에 위치한 경우와 같이 임의의 조합일 수 있음)
- [0018] 그러나 융합 폴리펩타이드는 하나 이상의 기아 유도 항원과 하나 이상의 결핵균 항원의 어떠한 조합으로도 구성이 가능하다.
- [0019] 본 발명의 임의의 융합 폴리펩티드의 임의의 부분과 적어도 80%의 서열 상동성을 가지고, 면역력을 가지는, 융합 폴리펩티드의 유사체(analogue) 및 상기 폴리펩타이드를 부호화하는 핵산 서열은 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 유사체는 본 명세서와 청구항에서 상호 교환적으로 사용되는 "본 발명의 폴리펩타이드" 또는 "본 발명의 융합 폴리펩타이드"에 포함된다. "본 발명의 핵산 서열"은 위와 같은 폴리펩티드를 부호화하는 아미노산 서열을 의미한다. 또한, 본 발명의 임의의 융합 폴리펩티드에 적어도 80%의 아미노산 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가지는 겹치거나 겹치지 않는 짧은거나 또는 긴 펩타이드는 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예는 이전의 BCG 백신의 면역성을 촉진하는 백신으로서, 즉 상기 백신은 BCG로 사전 접종된 개체에 투여된다.
- [0021] 본 발명의 첫 번째 관점은 폴리펩타이드의 자조(self-adjuvating)효과가 가능하게 하기 위해 지질화된, 상기 지질적 기아 유도 항원 또는 융합 폴리펩티드의 변이체를 포함한다.
- [0022] 본 발명의 면역성 조성물, 백신, 약학 조성물은 점막 전달 예를 들어 경구적, 비강적 또는 전통적인 근육적, 피부적으로, 피부 주사 또는 경피적 또는 임의의 다른 적당한 경로 예를 들어 항문적으로 투여될 수 있다.
- [0023] 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 마이코박테리움 예를 들어, 결핵균(Mycobacterium tuberculosis), 마이코박테리움 아프리카눔(Mycobacterium africanum), 소결핵균(Mycobacterium bovis), 나병균(Mycobacterium lepra) 또는 마이코박테리움 얼(Mycobacterium ulcerans)에 의해 유도된 감염에 대한, BCG, 촉진제 백신 또는 치료 백신과 함께 사용되는 예방 백신용 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물의 제조를 위한, 상기 정의한 기아 유도 항원 또는 융합 폴리펩티드의 용도를 개시한다.
- [0024] 본 발명의 두 번째 관점에 있어 본 발명은, 상기 정의된 기아 유도 항원 또는 융합 폴리펩티드를 부호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 엄격한 조건 하에서 본 발명의 핵산 서열 교배가 가능한 상보성 핵산 서열을 포함하는 면역성 조성물, 백신 또는 약학 조성물을 개시한다.
- [0025] 핵산 단편은 바람직하게는 DNA 단편이다. 단편은 다음의 설명과 같이 약학적인 사용이 가능하다.
- [0026] 한 구현예에 있어서, 본 발명은 선택적으로 박터에 삽입되는 본 발명에 의한핵산 단편, 면역원성 조성물, 백신

또는 약학 조성물에 관한 것이다. 백신이 투여된 사람을 포함한 동물에 의해 생체 조건 내 발현이 유도되며, 발현된 항원의 양은 악성 항산성균, 예를 들어, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*Mycobacterium africanum*), 소결핵균(*Mycobacterium bovis*), 나병균(*Mycobacterium lepra*) 또는 마이코박테리움 얼서란스(*Mycobacterium ulcerans*)에 의해 유발되는 결핵에 대한 저항성을 실질적으로 증가시키는데 효과적이다.

[0027] 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 마이코박테리움에 의한 결핵에 대항하는 치료용 백신 개발을 목적으로 하는 핵산 단편을 포함한 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서 본 발명은 악성 마이코박테리움 예를 들어, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*Mycobacterium africanum*), 소결핵균(*Mycobacterium bovis*), 나병균(*Mycobacterium lepra*) 또는 마이코박테리움 얼서란스(*Mycobacterium ulcerans*)에 의해 유발된 감염에 의해 유발된 결핵에 대하여 사람을 포함한 동물에 있어 면역성을 위하여 이미 BCG로 예방접종된 사람에게 예방을 촉진하기 위한 것으로서, 또는 BCG와 함께 예방 백신으로 사용할 수 있는 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물은 우두 (*vaccinia*), 아데노바이러스 (*adenovirus*), 소결핵균 BCG (*Mycobacterium bovis* BCG)와 같이 비병원성 미생물의 효과적인 성분으로서, 어느 정도 융합 폴리펩타이드를 발현하고 선택적으로 분비하는 미생물을 허용하는 앞서 정의된 바와 같은 융합 폴리펩타이드를 부호화하는 DNA 서열을 포함한다.

[0028] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 의한 핵산 단편을 포함하고 있는 우두, 아데노바이러스 또는 소결핵균 BCG와 같은 감염 발현 벡터 및 상기 벡터를 적어도 하나 이상 가지고 있는 형질 전환 세포를 개시한다.

[0029] 본 발명의 세 번째 관점은 악성 항산성균 예를 들어, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*Mycobacterium africanum*), 소결핵균(*Mycobacterium bovis*), 나병균(*Mycobacterium lepra*) 또는 마이코박테리움 얼서란스(*Mycobacterium ulcerans*)에 의해 유도된 결핵에 있어서, 인간/동물용 면역 방법 및 면역 촉진 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 동물 투여용으로서, 상기 정의된 융합 폴리펩티드, 본 발명에 의한 면역원성 조성물 또는 본 발명에 의한 백신을 포함한다.

[0030] 본 발명의 네 번째 관점은 악성 항산성균 예를 들어, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*Mycobacterium africanum*), 소결핵균(*Mycobacterium bovis*), 나병균(*Mycobacterium lepra*) 또는 마이코박테리움 얼서란스(*Mycobacterium ulcerans*)에 의해 유도된 활동기 또는 잠복기의 결핵을 가지는 인간/동물용 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 동물 투여용으로서, 앞서 정의한 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물을 포함한다.

[0031] 본 발명의 다섯 번째 관점은 악성 마이코박테리움 예를 들어, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*Mycobacterium africanum*), 소결핵균(*Mycobacterium bovis*), 나병균(*Mycobacterium lepra*) 또는 마이코박테리움 얼서란스(*Mycobacterium ulcerans*)에 의해 유도된 감염에 대한 예방용 백신 (촉진 포함) 또는 치료용 백신과 같은, 소결핵균 BCG와 조합한 면역성 조성물, 백신 또는 약학 조성물의 제조를 위하여, 상기 정의한 기아 유도 항원 또는 융합 폴리펩티드 또는 핵산 단편의 용도를 개시한다.

[0032] 본 발명에 의한 백신, 면역원성 조성물, 백신과 약학 조성물은 악성 마이코박테리움에 감염이 되지 않은 환자 또는 이전에 결핵균 BCG 백신을 맞은 환자에 대한 예방용 또는 악성 마이코박테리움에 감염된 환자에 대한 치료 용을 포함한다..

[0033] 본 발명의 첫 번째 관점의 구현예, 예를 들어 면역원성 폴리펩타이드는 본 발명의 다른 관점에도 모두 적용되며 그 반대도 마찬가지이다.

[0034] 본 명세서 전체에서, 본문의 내용이 특정 단어를 지칭하지 않는 경우에, 단어 "포함하다(comprise)" 또는 그 외 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"은 정해진 원소, 정수 또는 원소 및 정수의 그룹을 포함하며, 다른 원소 및 정수 또는 원소 및 정수의 그룹을 배제하지 않는다.

[0035] 정의

[0036] 기아 (starvation)

[0037] "기아"는 유기체에서 탄소, 질소 또는 에너지 원천, 이들의 어떠한 결합 또는 위 전체를 제거하는 것으로 이해된다.

- [0038] 기아 유도 단백질 (starvation induced proteins)
- [0039] "기아 유도 단백질"은 항산성균에 기아로 인한 스트레스를 가한 후 어떠한 단백질의 전사 (transcription)또는 단백질 수준이 최소한 6.5배 유도 (증가) 되는 것으로 이해된다.
- [0040] 소결핵균 BCG 결합 (Combination with M. bovis BCG)
- [0041] "소결핵균 BCG 결합"은 파스테르(Pasteur), 필립스(Phipps), 프라피어(rappier), 코나우트(Connaught), 타이스(Tice), 덴마크(Denmark), 글락소(Glaxo), 프라그(Prague), 버크하우그(Birkhaug), 스웨덴(Sweden), 일본(Japan), 모리아우(Moreau) 및 러시아(Russia) 균주를 다량 포함한 소결핵균BCG와 함께 투여하는 것으로 현저한 특정 면역성 반응 증가 또는 동물 모델 또는 인간에게 현저한 보호 기능을 이르게 하는 투여량이 앞서 정의한 융합 폴리펩티드 또는 한 개 및 그 이상의 핵산 단편과 동시에 다른 위치 및 방법으로 함께 투여되는 것으로 이해된다.
- [0042] 소결핵균 BCG 촉진 (Boost of M. bovis BCG)
- [0043] "소결핵균 BCG 촉진"은 앞서 정의한 한 개 또는 그 이상의 융합 폴리펩티드와 한 개 또는 그 이상의 핵산 단편이 파스테르(Pasteur), 필립스(Phipps), 프라피어(rappier), 코나우트(Connaught), 타이스(Tice), 덴마크(Denmark), 글락소(Glaxo), 프라그(Prague), 버크하우그(Birkhaug), 스웨덴(Sweden), 일본(Japan), 모리아우(Moreau) 및 러시아(Russia) 균주를 다량 포함한 M 보비스 BCG가 현저한 특정 면역성 반응 증가 또는 동물 모델 또는 인간에게 현저한 보호 기능을 이르게 하는 투여량의 백신 이후에 투여되는 것으로 이해된다.
- [0044] 폴리펩티드 (Polypeptide)
- [0045] 본 발명의 융합 폴리펩티드 단위로서 바람직한 폴리펩티드는 결핵균의 면역원성 폴리펩티드다. 그와 같은 폴리펩티드의 예는 결핵균 세포 또는 결핵균 배양 여과액으로부터 유도된 폴리펩타이드를 기본으로 한다. 본 폴리펩티드는 일반적으로 재조합형 또는 합성 폴리펩티드이며 면역성 폴리펩티드를 포함 할 수 있으며 면역성 일부를 포함할 수 있음으로 추가 서열을 포함할 수 있다. 추가 서열은 순수한 결핵균 항원 및 이중 조직의 서열일 수 있으나, 그러한 서열은 면역원성일 수도 있으나, 면역성일 필요는 없다.
- [0046] "융합 폴리펩티드"는 결핵균의 두 개 또는 그 이상의 면역원성 폴리펩티드의 임의의 서열 또는 임의의 길이 및 서열의 아미노산 스페이스를 포함 또는 불포함하여 연합된 유사체로 이해된다.
- [0047] "폴리펩티드"는 본 발명에 관하여 통상적인 의미를 가진다. 이는, 아미노산 체인으로 어떠한 길이, 표준길이의 단백질, 올리고펩티드, 짧은 펩티드 그리고 그 단편과 아미노산 잔류물이 공유 결합으로 연결되는 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0048] 폴리펩티드는 글라이코실화, 지질화 (모왓 등 1991에 의해 기술된 팔미토일옥시 숙신이미드[palmitoyloxy succinimide] 또는 러스팅 등 1976에 의해 기술된 도데카노일 클로라이드 [dodecanoyl chloride])를 가지는 화학적 지질화, 또는 보조 분자족을 구성하거나 또는 히스-태그 (his-tag) 또는 신호 펩티드와 같은 추가 아미노산을 포함하는 것에 의하여 화학적으로 변형될 수 있다.
- [0049] 각각의 면역원성 폴리펩티드는 특정한 아미노산에 의하여 특정지어질 수 있고, 특정 핵산 서열에 의하여 부호화 될 수 있다. 본 발명의 범위 내에서 그와 같은 서열과 유사체 그리고 유전자 재조합 및 합성 방법을 통한 변이를 포함한다. 여기에서 기술된 어떠한 생물학적 분석으로 면역원성이며, 재조합 폴리펩티드의 한 개 또는 그 이상의 아미노산 잔류물의 치환, 삽입, 추가 또는 삭제에 의하여 변형될 수 있다.
- [0050] 치환은 "보존적(conservation)"이 바람직하다. 이는 아래 도표에 따라서 정의된다. 두 번째 칼럼의 동일 블록의 아미노산은 세 번째 칼럼의 같은 줄의 것과 각각 치환되는 것이 바람직하다. 세 번째 칼럼의 아미노산은 한 개의 단어 코드 (one-letter code)로 지시된다.

지방성(ALIPHATIC)	무극성(Non-polar)	GAP
	극성 없음(Polar-uncharged)	ILV
		CSTM
		NQ
	극성(Polar-charged)	DE
방향성(AROMATIC)		KR
		HFVY

- [0052] 각각의 폴리펩티드는 특정한 핵산 서열에 의하여 부호화된다. 본 발명의 범위 내에는 한 개 또는 그 이상의 핵산의 치환, 삽입, 추가 또는 삭제로 변형된 핵산 서열이 포함된다. 치환은 아미노산 서열의 어떠한 변화도 미치지 않으나 단백질 발현 증가 도입이 가능한 코돈 사용인 침묵치환(silent substitution)이 바람직하다.
- [0053] 핵산 단편 (Nucleic acid fragment)
- [0054] "핵산 단편" 및 "핵산 서열"은 DNA, RNA, LNA (locked nucleic acids), PNA, RNA, dsRNA and RNA-DNA-하이브리드를 포함한 어떠한 핵산 분자로 이해된다. 또한 뉴클레오사이드에 인위적으로 발생하는 핵산분자를 포함한다. 본 용어는 사용에 따라서 어떠한 길이의 핵산 분자 (예. 10-10000 뉴클레오타이드)를 포함한다. 핵산 분자가 약학적으로 사용(예. DNA 치료)되거나 본 발명에 따른 폴리펩타이드 생산 방법에 사용될 때, 18-1000 뉴클레오타이드 길이를 가지며 분자가 벡터에 선택적으로 삽입되어 있는 최소한 한 개의 항원결정인자(epitope)가 암호화된 분자가 바람직하게 사용된다. 핵산 분자가 프로브, 프라이머 또는 안티센스 치료로 사용되는 경우, 분자 길이 10-100가 바람직하게 사용된다. 본 발명에 의하여, 다른 분자 길이 예. 최소한 12, 15, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 또는 1000 뉴클레오타이드 (또는 뉴클레오타이드 유도체) 또는 최대한 10000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30 또는 20 뉴클레오타이드 (또는 뉴클레오타이드 유도체) 또한 사용될 수 있다.
- [0055] "엄격한(stringent)" 본 기술분야에서 정의된 이종교배 (hybridization) 상태 (예. 이종교배는 온도가 녹는점 T_m으로부터 15-20도 미만, cf. Sambrook et al, 1989, pages 11.45-11.49)에서 실시된다. 바람직하게 "고도로 엄격한"한 상태는 예를 들어 녹는점 T_m으로부터 5-10 미만이다.
- [0056] 서열 동일성 (Sequence identity)
- [0057] "서열 동일성"은 실질상 동일 길이의 두 개의 아미노산 서열 또는 실질상 동일 길이의 두 개의 핵산 서열의 상동성(homology) 정도를 양으로 측정하는 것을 가리킨다. 비교되는 두 개의 서열은 간격의 삽입 또는 선택적으로 최고로 일치 가능하게 정렬되어야 하며 선택적으로는 단백질 서열 끝 절단이 있다. 서열 동일성은 $\frac{(N_{ref}-N_{dif})100}{N_{ref}}$, N_{dif} 가 두 개의 서열을 배열하였을 때 동일하지 않은 잔기의 전체 합계이며 N_{ref} 는 한 개의 서열의 잔기 숫자일 때 계산될 수 있다. 따라서, DNA 서열 AGTCAGTC는 AATCAATC와 75% 서열 동일성을 갖는다 (N_{dif}=2 and N_{ref}=8). 차이는 특정한 잔기의 비동일성으로 세어 질 수 있다. 예. DNA 서열 AGTCAGTC는 DNA 서열 AGTCAGTC와 75% 서열 동일성을 갖는다 (N_{dif}=2 and N_{ref}=8). 서열 동일성은 선택적으로 BLASTP 프로그램을 통하여 계산될 수 있다. 예. BLASTP 프로그램 (Pearson W.R and D.J. Lipman (1988))(www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). 본 발명의 하나의 구현으로 서열 정렬 방법 (ClustalW <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>.에서 입수할 수 있는 Thompson J., et al 1994)에서 설명된 디폴트 매개변수와 함께 정렬이 실행되었다.
- [0058] 바람직하게는 최소한의 서열 동일성은 최소한 80%, 그와 비슷한 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 91%, 최소한 92%, 최소한 93%, 최소한 94%, 최소한 95%, 최소한 96%, 최소한 97%, 최소한 98%, 최소한 99%, 그리고 최소한 99.5%이다. 바람직하게는 융합 폴리펩타이드에서 한 개 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 치환, 삽입, 추가 또는 삭제는 다음과 같이 한정된다. 예. 결핵균 폴리펩타이드를 바탕으로 하는 면역원성 폴리펩타이드 유닛과 비교시 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 미만의 치환; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 미만의 삽입; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 미만의 추가; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 미만의 삭제.
- [0059] 면역원성 일부 (Immunogenic portion)
- [0060] 본 발명의 폴리펩타이드는 면역원성 일부, B 세포 또는 T 세포의 항원결정인자를 포함한다.
- [0061] 면역원성 폴리펩타이드의 면역원성 일부는, 폴리펩타이드의 부분이며, 동물 및 인간의 면역 반응을 이끌어내며 또한/및 본 내용에서 설명되는 생물학적 분석으로 결정되는 생물학적 건본이다. 폴리펩타이드의 면역원성 일부는 B 세포 항원결정인자 또는 T 세포 항원결정인자일 수 있다. 면역원성 일부는 한 개 또는 비교적 작은 부분의 폴리펩타이드와 연관 될 수 있으며 폴리펩타이드 서열에 흩어져 있거나 또는 폴리펩타이드의 특별한 부분에 위치할 수 있다. 일부 폴리펩타이드 항원결정인자는 서열 전체를 뒤덮은 폴리펩타이드에 흩어져있는 경우

도 증명되었다 (Ravn et al 1999).

[0062] 면역 반응 동안 인지되는 관련된 T-세포 항원결정인자를 밝히기 위해서 "브루트 압력 (brute force)" 방법 사용이 가능하다. T-세포 항원결정인자는 일직선 모양이므로 돌연변이 폴리펩타이드 삭제시, 체계적으로 구성된 경우, 폴리펩타이드의 어떠한 부분이 면역 반응에 필요로 하는지 밝혀진다. (예. 삭제된 돌연변이를 주체로 함. 예. IFN-(여기 설명된 분석검사). 다른 방법은 폴리펩타이드로부터 유래된 20 아미노산 폴리펩타이드 잔기를 가지는, 바람직하게는 합성된 MHC 클래스 II 항원결정인자의 발현을 위하여 겹쳐지는(overlapping) 올리고펩타이드를 이용하는 것이다. 이 펩타이드를 생물학적 분석 (예, IFN 여기 설명된 분석검사)과 이중 일부는 양성 반응 (따라서 면역원성)으로 T-세포 항원결정인자 존재의 증거이다. MHC 클래스 I 항원결정인자 발현을 위하여 펩타이드 결합 예상이 가능하며 (Stryhn et al. 1996) 또한 합성 펩타이드 생산 및 생물학적 분석 (예, IFN- 여기 설명된 분석검사)이 가능하다. 바람직한 펩타이드의 길이는 예를 들어 폴리펩타이드의 아미노산 잔기 8-11을 선호한다. B-세포 항원결정인자는 관심있는 폴리펩타이드를 덮고 있는 겹치는 펩타이드를 인지하는 B 세포 분석을 통하여 결정된다. (예. Harboe et al 1998 설명)

[0063] 폴리펩타이드의 면역원성 부분은 유전적으로 이중의 인구분포의 넓은 부분 (높은 빈도) 또는 소수 부분 (낮은 빈도)를 통하여 인지된다. 추가로, 일부 면역원성 부분은 높은 면역 반응을 유도하며 (우성), 다른 부분은 낮은, 그러나 의미 있는, 반응 (아우성 (subdominant))을 유도한다. 높은 빈도, 낮은 빈도는 면역원성 부분이 널리 분포되어 있는 MHC 분자 또는 복합 MHC 분자 연결과 관련될 수 있다 (Kilgus et al. 1991, Sinigaglia et al 1988).

[0064] 유사체 (analogues)

[0065] 본 발명의 융합 폴리펩타이드의 공통된 특징은 실시예에 보여지는 바와 같이 면역 반응 유도 가능성이 다. 본 발명의 범위로 융합 폴리펩타이드의 유사체는 치환, 삽입, 추가, 삭제 또는 여기서 기술하는 어떠한 분석에 의하여 결정되는 면역원성으로 이해된다.

[0066] 실질적 순수함 (Substantially pure)

[0067] 본 내용에 관한 용어 "실질적으로 순수한 폴리펩타이드" 는 폴리펩타이드 준비에서 선천적, 재조합적 또는 합성적 폴리펩타이드 외 다른 물질을 최고 질량의 5% 포함한다. (다른 폴리펩타이드 물질의 낮은 퍼센티지는 바람직하게는 최대한 4%, 최대한 3%, 최대한 2%, 최대한 1% 및 최대한 1/2%). 실질적으로 순수한 폴리펩타이드는 최소한 96% 순수한 것이 바람직하다. 예. 준비과정의 폴리펩타이드 물질 전체 질량의 최소한 96%를 구성하는 폴리펩타이드, 최소한 97%, 최소한 98%, 최소한 99%, 최소한 99,25%, 최소한 99,5%, 및 최소한 99,75%와 같은 높은 퍼센티지가 바람직하며, 특히 폴리펩타이드는 "본질적으로 순수한 상태"가 바람직하다. 예. 천연적으로 결합한 다른 어떠한 항원이 없는 경우 예. 결핵균 군에 속한 박테리아 또는 악성 마이코박테리움에 관한 어떠한 항원도 없는 경우. 그리고 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에게 널리 알려진 적절한 정제과정을 통한 방법과 같은 재조합 방법에 의한 폴리펩타이드의 제조에 의하여 달성된다. 이는 아래에서 기술할 항산균 종류가 아닌 호스트 세포 내에서 재조합 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 메리필드 (Merrifield) 에 의해 설명된 방법 또는 그의 변화방법 및 본 발명이 속하는 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려진 적절한 정제 과정을 사용한 이미 잘 알려진 고체 또는 액체 상태의 펩타이드 생산 방법에 의하여 달성될 수 있다. .

[0068] 악성 마이코박테리움, 현재 감염된 개인 및 면역된 개인 (Virulent mycobacterium, individual currently infected and immune individual)

[0069] "악성 마이코박테리움은 동물 및 인간에게 결핵 병균을 일으킬수 있는 가능성이 있는 박테리아로 이해된다. 악성 항산균 예를 들어, 결핵균(Mycobacteuum tuberculosis), 마이코박테리움 아프리카눔(Mycobacterium africanum), 소결핵균(Mycobacterium bovis), 나병균(Mycobacterium lepra) 또는 마이코박테리움 열서란스(Mycobacterium ulcerans)가 있다. 관련된 동물의 예로 소, 주머니쥐, 오소리, 물소, 사자, 쿠루시 및 캥거루이다.

[0070] "악성 마이코박테리움에 현재 감염된 동물 및 인간 (an animal or human currently infected with a virulent mycobacterium)"은 배양 또는 현미경상으로 악성 마이코박테리움 감염이 확인된 개인 또는/및 임상학적으로 TB 진단을 받고 항TB 약물 치료에 반응을 보이는 자이다. TB 배양, 현미경, 임상진단은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에게 널리 알려져 있다.

- [0071] 면역된 개인은 인간 또는 동물이 악성 마이코박테리움 감염이 전혀 없거나 억제되었거나 또는 소결핵균 BCG 백신을 받은자로 정의된다.
- [0072] 면역원성 (Immunogenic)
- [0073] 면역원성 폴리펩타이드는 면역 반응을 유도하는 폴리펩타이드로 정의된다. 면역 반응은 다음과 같은 방법 중 하나로 모니터 될 수 있다.
- [0074] 시험관 조건에서 (in vitro) 세포 반응은 관련된 사이토카인 (cytokines) 예를 들어 IFN-감마 현재 또는 이전에 악성 마이코박테리움에 감염된 인간 및 동물로부터 얻은 림프구에서 추출 또는 이러한 T 세포 증식에서 검출함에 의하여 결정된다. 유도는 면역원성 부분을 1×10^5 세포부터 3×10^5 세포를 부유물 (well)에 추가하여 이행한다. 혈액, 비장, 간 또는 폐에서 분리한 세포와 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 면역원성 부분의 추가는 그 농도가 20 이상이 아니어야 한다 (부유물 ml 당 g, 자극이 2일에서 5일간 이행) 세포 증식 모니터를 위해 세포는 방사성 표지된 티미딘 (Thymidine)으로 펄스 (pulsed)된 세포를 16-22시간 분아 증식 배양 이후에 액체 신틸레이션 계산으로 파악된다. 양성 반응은 배경보다 추가 일반 편차를 2 더한 것보다 많은 반응이다. IFN-방출은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에게 널리 알려져 있는 ELISA 방법으로 간과가 가능하다. 양성 반응은 바탕의 추가 2 일반 편차 반응이다. IL-12, TNF-(, IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF-(같은 IFN-감마-(이외의 사이토카인은 폴리펩타이드에 관한 면역 반응을 모니터할 때 관련될 수 있다. 또 다른, 사이토카인 (예. IFN-감마-(존재 감지의 더욱 민감한 방법은 ELISPOT 방법이다. 혈액, 비장, 간 또는 폐에서 분리한 세포를 바람직하게는 1부터 4×10^6 세포/ml의 농도로 희석하고 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 면역원성 일부가 실재하는 가운데 18-22시간 배양하여 농도가 ml당 20g 가 넘지 않게 한다. 그 후, 세포의 부유물을 1부터 2×10^6 /ml로 희석하고 맥시소프 (Maxisorp) 플레이트에 anti-IFN 로 코팅하고, 바람직하게는 4부터 16 시간 배양한다. IFN-감마-(생산 세포는 표지된 2차적인 항 IFN-감마 항원을 이용하여 결정하며 관련된 기질 (substrate)이 점 (spots)을 증가하여 해부용 현미경을 사용하여 낱알이 셀 수 있다. 또한, PCR 기술을 이용하여 관련된 사이토카인의 mRNA 코드의 존재 확인이 가능하다. 일반적으로 한 개 또는 그 이상의 사이토카인이 예를 들어 PCR, ELISPOT 또는 ELISA를 이용하여 측정된다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자는 특정한 폴리펩타이드에 의하여 유도된 사이토카인의 양의 현저한 증가 또는 감소가 폴리펩타이드의 면역원성 활동성 평가에 사용됨을 높이 평가할 것이다.
- [0075] 시험관 조건에서 (in vitro) 세포 반응은 면역된 개인의 T 세포 라인 또는 결핵균 감염자, T 세포 라인이 살아 있는 항산균, 박테리아 세포 또는 IL-2추가 후 10부터 20일 배양 여과물에서 추출되는 경우를 통해 감지될 수 있다. 유도는 웰당 1×10^5 부터 3×10^5 세포를 포함하는 T세포주에 ml부유물 당 폴리펩타이드를 20g 넘지 않게 추가함에 의하여 수행되었고, 배양은 2-6일 동안 수행하였다. T세포 유도는 위에서 설명한 방사성 표지된 티미딘 (Thymidine)을 통하여 세포 증식을 탐지함으로써 모니터 할 수 있다. 두 가지 방식의 양성 반응은 배경보다 추가 일반 편차를 2 더한 것보다 많은 반응이다.
- [0076] 시험관 조건에서 (in vitro) 세포 반응은 임상 또는 준임상적으로 악성 마이코박테리움에 감염된 개인에게 최고 100g의 폴리펩타이드 또는 면역원성 일부를 피내 주사 또는 국소 적용 패취 적용 후 양성 DTH 반응으로 감지할 수 있다. 양성반응은 주사 또는 적용 72-96시간 이 후 최소한 지름 5mm 반응이다.
- [0077] 시험관 조건에서 (in vitro) 체액반응은 면역 또는 감염된 개인의 특정한 항체 반응으로 단정한다. 항체의 존재 여부는 ELISA 기술 또는 폴리펩타이드 또는 면역원성 일부를 니트로셀룰로오스 세포막 (nitrocellulose membrane) 또는 폴리스티렌 표면 (polystyrene surface)에 부착시켜, 웨스턴 블랏 (Western blot)를 통해 결정될 수 있다. 혈청은 가급적이면 PBS에서 1:10에서 1:100으로 희석하고 흡수된 폴리펩타이드에 추가하여 1에서 12시간 배양한다. 표지한 제2의 항체를 사용하여 특별하게 표지의 존재 여부를 ELISA로 측정하여 특정 항체 존재를 결정한다. 예를 들어 양성 반응은 바탕의 추가 일반 편차를 2 더한 것보다 많은 반응이거나, 선택적으로 웨스턴 블랏에서 시각적 반응이다.
- [0078] 또 다른 관련 파라미터는 보조약에 폴리펩타이드 포함된 백신 또는 DNA 백신 투여 이후 동물 모델의 보호 유도 측정이다. 적당한 동물모델은 다음을 포함한다: 악성 마이코박테리움 감염에 대처한 영양류, 기니아피그, 쥐. 유도보호는 목표 장기 기관의 박테리아 감소량과 백신 하지 않은 동물 비교, 백신 하지 않은 동물과 비교하여 연장된 수명, 그리고 체중감소 또는 백신 하지 않은 동물과 병상 비교 등이 있다.
- [0079] 제조방법 (preparation method)

- [0080] 일반적으로 본 발명의 융합 폴리펩타이드, 이와 같은 융합 폴리펩타이드를 부호화하는 DNA 서열은 다음과 같은 다양한 방법 중 하나를 이용하여 제조할 수 있다.
- [0081] 융합 폴리펩타이드는 알맞은 호스트에 발현되고, 발현벡터에 삽입된 폴리펩타이드를 부호화하는 DNA 서열을 사용하여 재조합하여 생산할 수 있다. 호스트 세포의 예는 대장균 (*E. coli*)이다. 융합 폴리펩타이드는 또한 100 미만의 아미노산, 일반적으로 50개 미만의 아미노산을 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자의 기술, 증가하는 아미노산 체인에 아미노산이 순차적으로 추가되는 경우에 상업적으로 입수할 수 있는 고체-상태 기술 (solid-phase techniques)을 이용하여 합성하여 생산할 수 있다.
- [0082] 융합 폴리펩타이드는 또한 추가 융합 파트너와 함께 생산될 수 있다. 이는 본 발명이 성취할 수 있는 우수한 특징의 방법이다. 예를 들어, 재조합적으로 생산되는 폴리펩타이드를 밖으로 전달을 용이하게 하는 융합 파트너, 폴리펩타이드 정제를 용이하게 하는 융합 파트너, 폴리펩타이드의 면역원성을 증가시키는 융합 파트너는 모두 본 발명의 관심이다. 본 발명은 결핵균으로부터 유래한 폴리펩타이드를 바탕으로 하는 2개 또는 그 이상의 면역원성 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드에 특별히 관련한다.
- [0083] 다른 생산품의 면역원성을 향상시키는 다른 융합 파트너는 IFN-, IL-2 그리고 IL-12 와 같은 림포카이네이즈이다. 발현 및/또는 정제를 용이하게 하기 위한 융합 파트너는 다음과 같다. 병원성 펙브리알 단백질 (bacterial fimbrial protein) 예. 필루스 성분 필린 (pilus components pilin) 그리고 펩A (papA) 단백질 A (protein A), ZZ 펩타이드 (ZZ-peptide) (ZZ 융합은 스웨덴 파마시기가 판매), 말토스 결합 단백질 (maltose binding protein), 글루타티온 S 트랜스퍼레이스 (glutathione S-transferase), 갈락토시데이스 (-galactosidase) 또는 폴리-히스타딘 (poly-histidine)이다. 융합 단백질은 호스트 세포, 예를 들어 대장균 (*E. coli*)에서 재조합적으로 생산이 가능하며 각각 다른 융합 파트너의 연계 부분 (linker region) 유도가 가능하다. 연계부분은 예. 각각의 면역원성 폴리펩타이드 단위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 관심을 갖는 융합 폴리펩타이드는 지질화되어 면역 시스템에서 알맞은 형태로 존재하는 면역원성 폴리펩타이드다. 예로는 WO 96/40718 A에 설명된 보렐리아 버그도페리 OspA 폴리펩타이드 (*Borrelia burgdorferi* OspA polypeptide)를 바탕으로 하는 백신 또는 수도나스 에루기노사 OprI 리포프로틴 (*Pseudomonas aeruginosa* OprI lipoprotein (Cote-Sierra J 1998) 을 바탕으로 하는 백신이 있다. 또 다른 가능성은 알려진 시그널 서열의 N-말단 융합과 면역원성 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 (cystein) 이다. 이와 같은 융합은 알맞은 생산 호스트 안의 N-말단 시스테인 부분에서 면역원성 융합 폴리펩타이드의 지질화를 초래한다.
- [0085] 백신 (vaccine)
- [0086] 본 발명의 중요한 부분은 본 발명에 따른 융합 폴리펩타이드를 포함한 백신에 관련한다. 그와 같이 백신의 성분의 최상의 수행을 확보하기 위해서, 면역적 및 약학적으로 가능한 담체, 매개체 또는 보조물 포함을 선호한다.
- [0087] 동물 모델에서 효력 있는 백신은, 본 발명의 융합 폴리펩타이드가 동물에서 인정된, 목표 장기기관의 박테리아 양이 감소하며, 수명 연장, 그리고 악성 마이코박테리움에 대해 이후 체중감소 또는 건강이상 등 백신 하지 않은 동물과 비교하여 인지할 수 있다.
- [0088] 적당한 담체는 다음과 같은 폴리머를 포함한 그룹에서 선택한다. 플라스틱과 (예. 폴리스티렌 (polystyrene))과 같은 소수성 비공유성 상호작용으로 연결된 폴리펩타이드, 또는 폴리사카라이드 또는 폴리펩타이드(예. 보빈 혈청 알부민, 오발부민 (ovalbumin) 또는 키홀 림펍 해모사이닌 (keyhole limpet haemocyanin))과 같은 소수성 비공유성 상호작용으로 연결된 폴리머를 포함한다. 적당한 매개체는 희석 및 부유액제를 포함한 그룹에서 선택한다. 보조제는 바람직하게는 다음과 같은 그룹에서 선택한다. 다이메틸옥타데실암모늄 브로마이드 [dimethyloctadecylammonium bromide (DDA)], 다이메틸옥타데실닐암모늄 브로마이드 [dimethyloctadecenylammonium bromide (DODAC)], 큐일 A [Quil A], 폴리 I:C [poly I:C], 알루미늄 하이드록사이드 [aluminium hydroxide], 프르드 [Freund]의 불완전 보조물, IFN-(, IL-2, IL-12, 모노포스포릴 지질 A [monophosphoryl lipid A] (MPL), 트레호로즈 다이마이코레이트 [Treholose Dimycolate] (TDM), 트레할로즈 다이베헨네이트 [Trehalose Dibehenate] 그리고 뮤라밀 다이펩타이드 [muramyl dipeptide] (MDP) 또는 PCT/DK2004/000488에서 설명된 마이코박테리알 지질 추출물, 특히 무극 지질 추출물을 포함한다.

- [0089] 백신 제조는 본 발명이 속하는 기술분야에서 일반적으로 알려진 활성화 성분과 같은 폴리펩타이드 예를 들어, 미국 특허 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231 및 4,599,230를 포함하며, 또는 앞의 참조문헌에 의한 구체화를 포함한다.
- [0090] 다른 보조 역할의 백신 성취 방법은 다음과 같다. 알루미늄 하이드록사이드 [aluminum hydroxide] 또는 포스페이트 (알룸) [phosphate (alum)], 당류의 합성 폴리머 (카보폴) Carbopol), 백신에서 열 처리로 인한 단백질 응집, 알부민에 펩신 처리된 (Fab) 항체의 재활성으로 인한 단백질 응집, 예를 들어 C 파름 [C. parvum] 또는 엔도톡신 [endotoxins] 또는 그램 - 네게티브 박테리아 리포폴라카라이드 성분 [lipopolysaccharide components of gram-negative bacteria] 등의 박테리아 세포와의 혼합 [mixture with bacterial cells such as C. parvum or endotoxins or lipopolysaccharide components of gram-negative bacteria], 예를 들어 맨나이드 모노-오리에이트 (에라셀 A) [Mannide mono-oleate (Aracel A)]과 같은 생리학적으로 가능한 기름 매개체와 유제 또는 20 퍼센트의 퍼플루오로카본 (프루솔 -DA) [perfluorocarbon (Fluosol-DA)] 액체가 토막 치환된 유제가 사용될 수 있다. 또 다른 가능성은 사이토키네즈 (cytokines)와 같은 면역 조절 물질 또는 위에서 말한 보조물과 결합하는 폴리 I:C (poly I:C)와 같은 IFN-감마 (IFN-감마) 합성 유도물을 포함한다.
- [0091] 보조 효과를 달성하는 또 다른 흥미로운 가능성은 고세린 등, 1992 [Gosselin et al] (본 참조문헌에 의하여 구체화됨)이 설명한 테크닉을 사용하는 것이다. 간단하게, 본 발명의 항원과 같이 관련된 항원은 단핵세포/대식세포의 Fc 수용체에 대항하는 항체 (또는 항원이 연결된 항체 단편)와 결합할 수 있다. BCG 백신의 효과를 향상하기 위하여, 한 개 또는 그 이상의 관련된 항원, 예를 들어서 한 개 또는 그 이상의 본 발명의 융합 폴리펩타이드가 투여 이전의 BCG 백신과 혼합될 수 있으며 또한 BCG 백신과 함께 투여하여 향상된 보호를 위하여 시너지 효과를 가질 수 있다. 시너지 효과를 성취하기 위한 또 다른 흥미로운 가능성은 BCG 백신을 본 발명의 융합 폴리펩타이드와 개별적으로 또는 다른 위치나 방법으로 동시에 투여하는 것이다.
- [0092] 현재 사용되는 BCG 백신의 축진을 위하여 BCG 백신이 일반적으로 감퇴되기 시작, 또는 그 이전, 예를 들어 BCG 백신 이후 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65 또는 70년 이후에, 예를 들어 본 발명의 한 개 또는 그 이상의 융합 폴리펩타이드와 같은 관련된 항원을 투여할 수 있다. 이는 규칙적인 기간, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 또는 10년 기간 동안 최고 5번이 될 수 있다.
- [0093] 백신은 그와 같은 양이 예방적 또는 치료적으로 효과적이고 면역원성인 것과 같이 투여 제형에 맞는 방법으로 투여된다. 투여량은 개인의 면역 반응을 일으키는 면역 시스템 수용력과 원하는 보호의 정도에 따라 치료받는 환자에 좌우된다. 알맞은 복용량 범위는 0.1 μ g부터 1000 μ g 범위 내에서, 예를 들어 1 μ g부터 300 μ g, 특별히 10 μ g부터 100 μ g 범위와 같이 바람직한 범위내에서 백신당 본발명의 융합 폴리펩타이드 수백 마이크로그램이다. 적당한 초기 투여와 축진제 주사의 투약계획은 변동할 수 있으나 첫 번째 투여 이후 추가 접종 및 다른 투여에 의하여 예시된다.
- [0094] 적용 방법은 폭넓게 다양하다. 백신을 투여하는 전통적인 방법은 전부 적용 가능하다. 이것은 입, 코 또는 점막 투여를 포함하며 활성 성분을 포함한 고체의 형태 (예를 들어 알약, 좌약 및 캡슐) 또는 스프레이, 파우더 및 액체와 같은 생리적으로 수용 가능한 살포, 또는 비경구 주입, 피하적, 피내적 또는 근육내적 또는 경피적 투여와 같은 장관 외 주입이다. 백신의 복용량은 투여 경로에 따라 결정되며 백신 투여받을 사람의 나이, 적게는 백신 투여받을 사람의 크기에 따라 다양하다. 현재는, 대부분의 백신은 근육 내 주사를 통하여 투여되며 이는 일반적인 투여경로로 지속 될 것이다. 그러나, 일반적으로 구강 또는 비강을 통한 점막 면역체를 유도하는 백신 처방법이 개발되었다. 가장 넓게 연구된 점막 면역체의 유도를 위한 전달 시스템은 콜레라 독소 (CT) 또는 이의 B 서브유닛을 포함한다. 이와 같은 단백질은 점막 면역체 반응을 강화하여 백신 제형 안에 투여되었을 때 IgA 생산을 유도한다. 장점은 구강 및 비강 백신의 전달이 용이한 것이다. 독성은 감소 하였으나 면역 자극성은 유지하는, 그램-네게티브 박테리아 또는 스태필로코칼 엔테로톡신 (staphylococcal enterotoxins)의 열민감 독소와 같이 다른 미생물 종으로부터 변형된 독소가 비슷한 효과를 초래하기 위해서 사용될 수 있다. 이와 같은 분자는 점막 투여에 특히 적합하다.
- [0095] 백신은 비경구적으로, 예를 들어 피하적, 또는 근육 내 주사와 같이 주사에 의하여 전통적으로 투여되었다. 좌약 때로는 구강 처방법을 포함한 다른 추가 투여방법도 적합하다. 좌약은, 전통적인 결합제 또는 담체는 폴리알카린 글라이콜 (polyalkylene glycols) 또는 트라이글라이세라이드 (triglycerides)을 포함하고 0.5%에서 10% 범위, 바람직하게는 1-2%의 활성 성분을 포함하는 혼합물의 형태이다. 구강 처방법은 매니톨 (mannitol), 락토스 (lactose), 전분 (starch), 마그네슘 스테레이트 (magnesium stearate), 소듐 사카린 (sodium saccharine), 셀룰로스 (cellulose), 마그네슘 카보네이트 (magnesium carbonate) 및 이와 같은 약학적 첨가제

를 일반적으로 사용한다. 이와 같은 조성물은 액체, 현탁액, 정제, 알약, 캡슐, 지속 방출 제형 또는 파우더 형태이며 더 나아가 10-95%, 바람직하게는 25-70%의 활성성분을 포함한다.

- [0096] 많은 경우, 백신은 복합 투여의 필요가 있다. 특히, 백신은 악성 항산균 감염 예방 또는/및 확진된 항산균 감염 치료 또는 이전 BCG 백신 된 자의 촉진제로 투여될 수 있다. 감염을 예방하기 위해서는 뚜렷한 임상 기미 또는 증세가 생기기 이전에 백신이 예방차원에서 투여된다.
- [0097] 유전적 다양성으로 인하여, 같은 폴리펩타이드에 대하여 다른 개인은 다양한 정도의 면역 반응을 한다. 그로 인하여, 면역반응 증가를 위하여 본 발명에 의한 백신은 몇 개의 다른 융합 폴리펩타이드 또는/및 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 백신은 두 개 또는 그 이상의 융합 폴리펩타이드 또는 기아 유도 폴리펩타이드 또는 면역원성 일부를 포함 할 수 있다. 앞서 정의한 일부 또는 폴리펩타이드 전체가 아닌 기아 유도 항원 또는 융합 폴리펩타이드는 악성 항산균로부터 유래 될 수 있다. 이후의 실시예에서, 폴리펩타이드가 앞서 정의한 융합 폴리펩타이드의 조건을 충족시킬 필요가 없으며 본래의 면역원성에 의하여 또는 단지 보조적으로 작용할 수 있다.
- [0098] 백신은 2-20의 다른 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드와 같이 1-20, 또는 3-10과 같이 3-20의 다른 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0099] 또한 본 발명은 악성 항산성균으로 인한 TB에 대항하는 인간을 포함한 동물의 면역 방법에 관련된다. 이는 본 발명의 융합 폴리펩타이드 또는 앞서 설명한 본 발명의 백신 조성물 또는 앞서 설명한 생백신을 동물에게 투여하는 것을 포함한다. 현재 바람직한 구체화는 동물 또는 사람이 앞서 정의한 개인 면역체이다.
- [0100] 또한 본 발명은 본 발명에 의한 면역 조성물 제조 방법에 관련된다. 방법은 본 발명의 융합 폴리펩타이드의 준비, 합성 또는 분리, 그리고 백신을 위한 매개물에서 융합 폴리펩타이드가 용해 및 분산, 그리고 선택적으로 다른 결핵균 항원 또는/및 담체 또는/및 매개체 또는/및 보조물을 추가적으로 포함한다.
- [0101] 본 발명의 핵산 단편은, 면역원성 참고문헌에 포함된 울머 등 1993 (Ulmer et al 1993)이 검토한 일명 DNA 백신에서 사용되는 핵산 단편과 같이 폴리펩타이드의 생체내 효과적인 발현을 위하여 표현에 사용될 수 있다.
- [0102] 융합 폴리펩타이드를 부호화한 플라스미드 (plasmid) DNA 구조 및 제조에서 정해진 대장균 (E. coli)과 같은 호스트 종이 DNA 백신 접종에 사용될 수 있다. 플라스미드 DNA는 관심 있는 플라스미드를 지닌 호스트 종을 하룻밤 배양하여 제조할 수 있으며, 예를 들어 내독소 제거 과정을 포함한 쿼인진 기아 - 플라스미드 말림 키트 [the Qiagen Giga -Plasmid column kit] (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA)를 사용하여 정제할 수 있다. DNA 백신에 사용되는 플라스미드 DNA에 내독소가 없는 것이 필수적이다.
- [0103] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 의한 핵산 단편을 포함하는 백신에 관련된다. 백신은 생체내 (in vivo) 면역원성 폴리펩타이드가 백신을 투여받을 인간을 포함한 동물에서 발현에 미치는 영향, 악성 마이코박테리움에 감염된 인간을 포함한 동물에게 실질상 향상된 저항을 가능하게 하는 발현되는 폴리펩타이드량에 관련된다.
- [0104] 위와 같은 DNA 백신의 효능은 면역 반응 조절 능력이 있는 DNA 단편 부호화된 폴리펩타이드와 함께 유전 부호화 발현 제품을 투여를 통하여 향상 할 수 있다.
- [0105] 세포의 면역 반응을 효과적으로 활성화하는 하나의 가능성은 비병원성 미생물 또는 바이러스의 관련된 면역원성 폴리펩타이드의 발현을 통하여 성취할 수 있다. 이와 같은 미생물로 잘 알려진 미생물은 소결핵균 BCG (Mycobacterium bovis BCG), 사모넬라 (Salmonella) 그리고 수도모나 (Pseudomona) 이며, 바이러스의 예는 우두 바이러스 (Vaccinia Virus) 및 아데노바이러스 (Adenovirus)이다.
- [0106] 따라서, 본 발명의 또 다른 중요한 측면은 현재 사용되는 BCG 생백신의 향상이다. 이때 BCG 백신은 앞서 정의한 한 개 또는 그 이상의 DNA 서열이 한 개 또는 그 이상의 융합 폴리펩타이드를 부호화하여 미생물 게놈에 결합하여 어느정도 미생물이 융합 폴리펩타이드를 발현하고 분비하게 한다. 본 발명의 한 개 이상의 핵산 서열 하나 이상의 카피의 결합은 면역 반응 향상에 관련이 있다.
- [0107] 또 다른 가능성은 본 발명에 의한 DNA 부호화 융합 폴리펩타이드를 우두 바이러스 (vaccinia virus) 또는 아데노 바이러스 (Adenovirus)와 같은 독소가 약화된 바이러스에서 완전하게 하는 것이다 (Rolph et al 1997).
- [0108] 재조합 우두 바이러스는 감염된 호스트 세포의 세포질 또는 핵에 침입 가능하며 TB 대항 보호를 유도함으로 융합 폴리펩타이드는 면역 반응을 향상시킬 수 있다.
- [0109] 본 발명은 또한 D 로리 (로리 등 1999)의 문헌에서 설명된 바와 같이 본 발명의 융합 폴리펩타이드 또는 핵산은

치료용 백신에 사용에 관련한다. 치료 성질의 항원은 백신으로 투여되었을 때 실험 동물에서 결핵균 심각성 감소 능력 또는 이전 감염의 재활성 예방으로 밝혀질 수 있다. 치료용 백신의 성분은 앞서 설명한 백신 제조 방법으로 가능하다.

실시예

- [0126] 재료 및 방법
- [0127] 동물
- [0128] 덴마크 봄홀트가드에서 구입된 특별하게 병원-없는 C57BL/6xBalb/C F1 또는 C57BL/6, 8-16주령 암컷 쥐가 면역 반응 및 CFU 분석에 의한 보호 연구에 사용되었다. 감염 연구는 스타텐스 혈청 연구소의 BSL3 시설에서 실시되었다. 동물은 격리된 우리에 살았으며 물과 소독된 임의의 음식이 주어졌다. 모든 동물은 실험 시작 전 1주 일간 적응시켰다.
- [0129] 재조합 항원 제조
- [0130] 재조합 Ag85B-ESAT6 (Hybrid1)은 올센, 반 핀스테렌 등 (2001)에서 기재된 대로 제조하였다. 간단하게, His-태그된 단백질이 대장균 XL-1 블루에 발현되고, HiTrap Q 컬럼 (파마시아, 업살라, 스웨덴)을 사용한 단백질 음이온-교환 크로마토그래피에 의하여 타론 컬럼(Talon column)에서 정제되었다. 샘플은 희석 및 저장전에 25 mM HEPES 버퍼 (pH 8.0) - 0.15 M NaCl - 10% 글리세롤 - 0.01% ,트윈 20에 투석하였다.
- [0131] 재조합 Rv2660c는 스크저트 오에팅거 등 (2000)에서 기재된 다른 작은 항산균 단백질 제조와 같은 방법으로 제조되었다. 간단하게, 표준 길이의 Rv2660c 유전자를 결핵균 계통의 DNA로부터 PCR 증폭시키고 발현된 플라스미드 pDest 17에 서브클론시킨다. 재조합 단백질은 대장균 B121 블루에서 제조되고, 테이전 부스트 등(1995)에 의해 기재된 Ni²⁺ 칼럼으로 금속 이온 친화 크로마토그래피를 통하여 정제한다. 이때 8M 유레아를 포함하는 포스페이트 버퍼를 사용하며, 정제 이후에 제거한다.
- [0132] 하이브리드56 (Ag85B-ESAT6-Rv2660c), 하이브리드32 (Ag85b-ESAT6-Rv2031c), HyVac21 (Ag85a-TB10.4-Rv2660c) 및 HyVac28 (Ag85b-TB10.4-Rv2660c) 융합 단백질은 생산자에 따른 특정 위치 재조합에 의하여 발현 벡터 pDest17 (인비트로진)에 발현을 클론된다.
- [0133] 융합 단백질이 IPTG 유도 이후에 대장균주 BL 21에서 발현된다. 융합 단백질이 약한 세제 (B-PER, 시그마)와 초음파 분해에 의한 세포 파괴 이후에 모두 4개의 재조합 융합 단백질이 포함체로써 수집된다. 세정한 포함체는 pH 4.9 에서 20mM NaOAc + 8 M 유레아에 용해하고 Q 세파로즈 칼럼에 내독소 포착을 위하여 여과시킨다. 여과물은 Bis-tris 버퍼와 8M 유레아 pH 6.5에 희석되어 pH를 6.5로 조절한다. 단백질은 불순물 포착을 위하여 CM 세파로즈 칼럼에 여과시킨 후, Q 세파로즈 칼럼에 포착된다. 칼럼은 비즈-트리스 버퍼 pH 6.5+3M 유레아로 씻어낸다. 결합된 단백질은 NaCl로 녹여서 분리한다. 단백질은 af 세파텍스 칼럼에서 25 mM 트리스-HCl pH 8 및 10 % 글리세롤로 버퍼 교환한다.
- [0134] 인간 인식 (혈청학)
- [0135] 모든 혈청은 ELISA 사용 이전에 20ul 대장균 추출 (S3761, 프로메가 메디슨, WI)을 200ul 혈청 샘플과 혼합하여 실온온도에서 4시간 배양하여 교차-반응 항체가 제거된다. 원심분리 (10.000 x g, 10 분)이후에 0.05 % 소듐 아자이드를 상청액에 추가한다. ELISA를 다음과 같이 실시한다. 96-웰 맥시소프 (닝크, 로스킬드, 덴마크) 마이크로타이터 플레이트를 항원 1.0 mg/ml (100 ml per 웰)과 카보네이트-바이카보네이트 버퍼 (pH 9.6)로 코팅을 하고 섭씨 4도에서 하룻밤 배양한다. 플레이트는 0.05 % 트윈 20을 포함한 PBS (PBS-T)로 3번 씻는다. 혈청 샘플 은0.2 % 트윈 20 및 1.0 % (wt/vol)보빈 혈청 알부민을 포함한 PBS로 1:100 희석한다 (희석 버퍼). 그

리고 0.1 ml 희석된 혈청은 2배수씩 웰에 추가하고 실내온도에서 1시간 배양한다. PBS-T로 3번 씻은 이후, 플레이트를 희석 버퍼로 1: 800 희석된 100 ul 페록사이드에 접합 토끼-항-인간 Ig (P212, 다코, 글로스트럽, 덴마크)에서 1시간 배양하였다. 플레이트는 PBS-T로 3번 씻고 테트라메틸벤지다인 기질 (TMB 플러스, Kem-En-Tec, ***, 덴마크)과 함께 30분간 배양하고 성장은 1 M H₂SO₄을 추가하여 멈춘다. 광학 밀도 405 nm (OD405)에서 측정한다.

[0136] 백신 제조 및 면역 절차

[0137] 올슨, 반 핀스테른 등 (2001)에서 기재된 바와 같이 쥐를 전체 볼륨 200 마이크로리터에서 다이옥타데실암모늄 브로마이드(dioctadecylammonium bromide) (DDA, 250 마이크로그램/복용량, 이스트맨 코닥, 로체스터 N.Y.)에 의하여 유화되고 25 마이크로그램의 모노 포스포릴 리피드 A (MPL, 코리사, WA, USA)에 의하여 전달된 5 마이크로그램 재조합 백신(Rv2659c, Rv2660c, Hybrid56, HyVac21, HyVac28 또는 Hybrid32)으로 면역한다. 백신 (0.2ml/쥐)을 등에 2주간 간격으로 3번 피하(s.c.) 주입한다. BCG 데니쉬 1331 (5x10⁴ 배실리/쥐) 단독 주입량을 첫 번째 서브유닛 백신 시에 꼬리의 끝에 피하 주입한다; 촉진제 주입은 없다. 접종 이전의 면역력은 일반적으로 첫 번째 백신 5주 및 7주 이후의 혈액 림포사이트와 첫 번째 백신 7주 이후의 비세포(splenocyte)를 평가한다.

[0138] 실험상 감염 및 장기에서 박테리아 산출

[0139] 보호단계를 평가하기 위하여, 첫 번째 백신 10주 이후에 쥐가 에어로솔 경로인 Sals-Col 흡입으로 신체를 노출하는 방법으로 접종하고 전달 정도는 폐에 약 100 CFU 의 결핵균 어드맨 (M. tuberculosis Erdman)으로 교정되었다. 쥐는 2, 6, 12 또는 24 주 이후 (Hybrid56), 또는 7, 13, 24, 35 또는 44 주 이후 (Hybrid32)에 희생되었으며 폐와 비장은 박테리아 산출을 위하여 제거하였다. 장기는 각각 멸균된 식염수에 균질화되었고, 연속 희석물은 ml당 2 mg의 2-티오펜-카보실릭산 하이드라자이드가 공급되는 미들브루크 7H11 한천 (Middlebrook 7H11 Agar)에 플레이트 한다. 이는 실험하는 장기에서 잔여 BCG 성장을 선택적으로 억제하기 위함이다. 섭씨 37도에서 2주 및 3주 배양 이후에 콜로니를 센다.

[0140] 림프구 배양

[0141] 장기를 완전 RPMI (GIBCO, 그랜드 아이랜드, NY, 2 mM 글루타민, 페니실린 6 - 포타시움 및 스트렙토마이신 설페이트 각 100 U/ml, 10% FCS 및 50 mM 2-ME를 포함)에 담가서 미세한 그물 스테인리스 스틸 체를 통한 냉침법에 의하여 균질화한다. 혈액 림프구는 농도 구매 림프구 (세다라인, 헌비, 온타리오, 캐나다)에 의하여 정제된다. 세포는 각각의 그룹에서 5마리 쥐로부터 합해지며, 5x10⁻⁵ M 2-머캅토에타놀, 1 mM 글루타민, 페니실린-스트렙토마이신 5% (vol/vol) 송아지 태아의 혈청으로 보충된 부피 200 microl RPMI 1640 배지에 포함된 2x10⁵ 세포가 바닥이 둥근 마이크로타이터 웰 (96 웰; 눈크, 로스킬드, 덴마크)에서 3배수씩 배양된다. 항산균성 항원의 농도는 5 to 0.2 mg/ml가 사용된다. 100마이크로리터의 감마 인터페론의 상청액 제거 이전에 섭씨 37도, 10% CO₂에서 3일간 배양한다 (IFN-감마는 하기 기재하는 효소 - 면역 측정법 (ELISA)에 의하여 결정됨).

[0142] IFN-감마를 위한 효소 - 면역 측정법 (ELISA)

[0143] 생산자의 사용설명서에 다른 IFN-감마 분석 상업용 키트를 사용 (맵테크, AB. 스웨덴)하여 배양 상청액의 2배수 적정하여 IFN-감마의 양을 정하기 위하여 더블 샌드위치 ELISA 방법을 사용한다. 샘플 안에 있는 IFN-감마 농도는 재조합 IFN-감마 (라이프 테크놀로지)에 의하여 이루어진 일반 커브를 사용하며 결과는 pg/ml로 표현한다. 2배수 웰의 각각의 차이는 표준의 10% 미만으로 일정하다.

[0144] 기니아피그 모델에서 실험상 감염 및 백신 효능 평가

- [0145] 찰스 리버 연구소 (노스 윌밍톤, Mass)로부터 구입한 아웃 브래드 암컷 하트리 기니아피그를 일회 투여량 10^3 CFU의 BCG를 피내 주입 또는 DDA/MPL에 유화된 20 마이크로그램의 Ag85b-ESAT6 또는 Ag85b-ESAT6-Rv2660c를 3차례 3주간의 접종 사이의 휴식 기간을 갖고 접종한다. 3 번째 예방 접종 6주 이후에 장치 (글라스-콜, 테레하우트, Ind)를 이용하여 약 20 배실이 각 기니아피그의 폐에 전달되는 방식의 에어로솔 MTB 접종을 한다. 감염된 기니아피그의 생존시간은 동물들의 하루 음식 섭취량 변화, 부자연스러운 호흡 및 행동변화를 통하여 결정된다. 추가로, 매주 동물의 무게는 몸무게의 지속한 감소가 관찰되어 병의 증조가 나타날 때까지 측정한다.
- [0146] 실시예 1
- [0147] 기아 유도 항원의 인간 인지
- [0148] 인간 인지를 위하여 WHO 결핵 환자 건본 은행에서 공급한 우간다 폐 TB 환자의 Rv2660c를 평가한다. HIV 감염 음성과 양성 환자 모두가 포함되었다 (각각 N=94 및 N=73). 대조그룹은 백명의 건강한 덴마크 거주 기증자이며 BCG 접종률은 >90%이다.
- [0149] 마이크로타이터 플레이트를 100X 희석한 혈청 샘플과 함께 배양된 1.0 ug/ml (100 ul/ 웰)Rv2660c 단백질로 코팅하고. 페록시데이즈 접합 토끼-항-인간 Ig 및 테트라메틸벤지다인을 기질로 사용하여 개발하였다. (결과 도 1).
- [0150] 결과
- [0151] 본 연구에서, 기아-유도 단백질 인지를 실험하였다. 대조 그룹을 97% 민감도를 사용한 확정범위를 바탕으로 45% HIV⁻ 케이스와 61% HIV⁺ 케이스에서 TB 감염 가 확인하였다. 이는 명백하게 MTB 감염 동안 Rv2660c 단백질이 발현되고 면역 시스템에 의하여 인식되었음을 나타낸다.
- [0152] 실시예 2
- [0153] 기아 유도 항원 (Rv2659c) 투여 이후 면역원성 및 재활성화 예방
- [0154] 결핵균 감염된 쥐를 항체로 치료하여 박테리아 적재량을 감소시키고 박테리아 적재량이 검출수준에 가까운 감염 잠복기를 시작시킨다. 감염의 잠복기간 동안 쥐는 보조제(예. DDA/MPL)에 포함된 Rv2659c를 2주간의 간격을 두고 3회 백신 한다. 최종 백신 1주일 이후, Rv2659c 자극에 따른 IFN-감마 방출량을 얻기 위하여 혈액 세포를 ELISA로 분석한다 (도 2).
- [0155] 결핵균 재활성에 대항하는 기아 유도 단백질 Rv2659c의 보호 유도 능력
- [0156] 결핵균 잠복기의 쥐 그룹을 보조제 (예. DDA/MPL)에 포함된 Rv2659c를 2주간의 간격을 두고 3회 피하 백신한다. 보호 효능은 백신 하지 않은 (감염 잠복기) 쥐와 비교하여, 폐와 비장 내에 콜로니 포밍 유닛 (CFU) 감소에 의해 평가한다. 재활성에 대항하는 보호는 Rv2659c 백신 3개월 이후 평가되었다. Rv2659c는 면역되지 않은 잠복기 감염 쥐에 비교하여 3에서 90배 폐의 박테리아 수준을 감소시켰다 (도 3). 잠복 감염 쥐에서 Rv2659c 백신의 병리학적 발전의 가능성을 평가하기 위하여 폐 조직을 백신된 잠복 감염 쥐로부터 조직 병리학 검사를 위하여 추출한다. 조직 손상 부위에서 현저한 치즈 괴사, 섬유증 또는 석회화는 발견되지 않았으며 세포 염증의 침윤 증가도 없다.
- [0157] 결과
- [0158] 본 연구에서, 기아 유도 단백질 Rv2659c의 치료용 백신의 가능성을 실험하였다.

- [0159] 보조제인 다이메틸다이옥타데실알루미늄브로마이드- 모노포스포릴 리피드 A (dimethyldioctadecylammonium bromide-monophosphoryl lipid A)와 함께 Rv2659c 단백질이 쥐에 투여되면, 강한 면역 반응이 유도 및 촉진된다. 면역화는 폐에서 박테리아 적재량의 0.5-1.0 log 감소 결과를 낳았다. 따라서, 본 연구는 백신 투여 이후 폐의 면역병리학을 자극하지 않으며 결핵균 재활성을 감소 및 지체시킴을 시사한다.
- [0160] 실시예 3
- [0161] 기아 유도 항원 Rv2660c에 의한 결핵균 에어로솔 감염에 대한 면역원성 및 보호
- [0162] 쥐에 보조제 (예. DDA/MPL)에 포함된 Rv2660c를 2주간의 간격을 두고 3회 백신 한다. 최종 백신 일주일 이후에 혈액 세포를 ELISA에 의하여 Rv2660c 자극 이후 INF-감마 방출을 분석한다 (도 4A). 최종 백신 3주 이후, Rv2660c 자극 이후 INF-감마 방출량을 얻기 위하여, 비장 세포를 ELISA로 분석하고(도표 4B). 혈액 세포는 항원 특정 증식 반응을 위해 분석한다 (도 4C).
- [0163] 보조제 (예. DDA/MPL)에 포함된 Rv2660c를 2주간의 간격을 두고 3회 백신한 쥐 그룹을 결핵균 감염에 의하여 에어로솔 접종하고, 보호 효능은 백신 하지 않은 쥐와 비교하여 폐에서 분리된 콜로니 포밍 유닛 (CFU) 감소에 의하여 평가한다. 백신 12주 이후에 보호를 분석한다. 면역하지 않은 감염된 쥐와 비교하여, Rv2660c는 폐의 박테리아 수준을 1/21log(10) 감소시켰다 (도 5).
- [0164] 결과
- [0165] 본 연구에서 기아 유도 단백질 Rv2660c의 백신 항원 가능성을 실험하였다. 보조물 다이메틸다이옥타데실알루미늄브로마이드- 모노포스포릴 리피드 A (dimethyldioctadecylammonium bromide-monophosphoryl lipid A)와 함께 Rv2660c 단백질이 쥐에 투여되면 강한 면역 반응이 유도 및 부스터 된다. 면역화는 폐에서 박테리아 적재량 0.5 log (10) 감소 결과를 낳았다.
- [0166] 실시예 4
- [0167] 기아 유도 항원을 예방 백신에 융합함 (다상 백신)
- [0168] 3중 융합 단백질 면역화 이후 면역 반응
- [0169] 쥐 그룹을 보조제 (예. DDA/MPL)에 포함된 융합 폴리펩타이드 Hybrid56, HyVac21 또는 HyVac28로 2주 간격으로 2회 피하 접종한다. 최종 접종 1주일 이후, 1 마이크로그램/ml 면역화 융합 단백질 또는 단일 융합 단백질의 자극 이후에 혈액 세포의 IFN-감마 배출을 분석한다 (도 6A-C). Hybrid 56 최종 백신 3주 이후, 비장 세포는 0.2, 1 또는 5 마이크로그램/ml 단중 융합 단백질자극 이후 INF-감마 방출을 ELISA에 의하여 분석한다 (도 6D). 최종 백신 3주 이후에 혈액 세포의 항원 특정 증식 반응을 분석한다 (도 6E).
- [0170] 쥐의 결핵균 감염에 대항한 3개의 융합 폴리펩타이드의 보호 유도 능력
- [0171] 쥐 그룹은 보조제 (예. DDA/MPL)에 포함된 융합 폴리펩타이드 Hybrid1, Hybrid56 and Hybrid32를 2주 간격으로 3회 피하 접종하고, 보호 효능은 에어로솔 감염 후 순수한(백신 하지 않은) 쥐와 비교하여, 폐와 비장의 콜로니 포밍 유닛 (CFU) 감소에 의하여 평가한다. 보호 효능의 양성 대조군은 일회 분량인 BCG 테니쉬 1331 (5×10^4 배실리/쥐)를 첫 번째 서브유닛 백신과 동시에 꼬리의 하단에 피하 주입한다 (도 7A 및 B).
- [0172] 결핵균에 에어로솔 감염된 기니아피그에 대한 폴리펩타이드 Hybrid56 (Ag85b-ESAT6-Rv2660c)의 보호 효능
- [0173] 보조제 (예. DDA/MPL)에 포함된 융합 폴리펩타이드를 기니아피그 그룹에게 3주 간격으로 3회 피하 백신하고 보호효능은 일차적으로 동물의 무게를 매주 측정하여 평가한다. 보호 효능의 양성 대조군은 일회 분량인 BCG 테

니쉬 1331 (5×10^4 배실리/쥐)를 첫 번째 서브유닛 백신과 동시에 흡입기로 주입한다. 결과는 생존 커브로 도 8에 나타난다.

[0174]

결과

[0175]

본 연구에서 3개의 융합 단백질 (Hybrid56, HyVac21 및 HyVac28)의 면역 가능성을 조사한다.

[0176]

융합 단백질이 보조물 다이메틸다이옥타데실알루미늄브로마이드- 모노포스포릴 리피드 A (dimethyldioctadecylammonium bromide-monophosphoryl lipid A)와 함께 쥐에 투여되었을 때, 각각의 3개 단백질 조성물에서 강한 용량 의존 면역 반응이 유도되었으며, 이는 다상 백신의 가능성을 시사한다. 예를 들어, Hybrid56는 시간에 따라서 향상, 기존의 MTB 백신인 소결핵균 BCG에 의한 보호 수준보다 현저하게 높은 단계의 보호 면역력을 동반하여 유도된 면역 반응이다. 또한, Rv2660c를 대신하여, 기존의 MTB 잠복 항원 Rv2031c (Ag85b-ESAT6-Rv2031c)을 포함한 유사한 3개의 융합 단백질은 시간에 따른 보호의 향상을 보이지 않는다. 마지막으로, Hybrid 56의 높은 단계의 보호 효능은 더욱 감염되기 쉬운 기니아피그에서도 확인되었다.

[0177]

실시예 5

[0178]

노출 이후 접종된 기아 유도 항원과 예방 백신의 융합(다상 백신)능 (치료적)

[0179]

결핵균 감염된 쥐를 항생제로 치료하여 박테리아 적재량을 감소시키고, 낮은 박테리아 적재량으로 감염 잠복기를 시작시킨다. 감염의 잠복기 기간 동안, 보조제 (예, DDA/MPL)에 포함된 융합 폴리펩타이드를 쥐에게 2주간격으로 3회 백신한다. 혈액 세포는 최종 백신 15주 이후에 0.2, 1, 또는 5 ug/ml의 단종 융합 단백질 자극에 따른 IFN-감마 배출을 ELISA에 의하여 분석한다 (도 9A).

[0180]

결핵균 재활성화에 대한 융합 폴리펩타이드의 보호 유도 능력

[0181]

잠복기 결핵균 쥐 그룹을 보조제 (예, DDA/MPL)에 포함된 융합 폴리펩타이드를 2주간격으로 3회 피하 백신하고, 보호 효능은 백신 하지 않은 잠복 감염된 쥐와 비교하여, 폐의 콜로니 포밍 유닛 (CFU) 감소를 평가한다. 재활성화에 대한 보호는 백신 3개월 이후에 평가한다. 융합 폴리펩타이드는 면역하지 않은 잠복기 감염 쥐와 비교하여, 현저한 재활성화 감소가 유도되었고, 폐의 박테리아량이 감소되었다 (도 9B).

[0182]

결과

[0183]

본 연구에서는 융합 단백질 항원 Rv2660c, ESAT6 (Rv3875) 및 항원 85B (Rv1886c)을 바탕으로 한 결핵 서브유닛 백신의 치료용 백신으로서의 가능성을 연구한다. 보조제인 다이메틸다이옥타데실알루미늄브로마이드- 모노포스포릴 리피드 A (dimethyldioctadecylammonium bromide-monophosphoryl lipid A)에 포함된 융합 단백질을 쥐에 투여하였을 때 강한 면역반응이 유도/촉진 된다. 면역화는 잠복 감염의 재활성화 시기에 폐에서 박테리아 적재량 감소의 결과를 초래한다. 본 연구는 기아 유도 항원과 예방 백신의 융합(다상 백신)으로 노출 이후 백신 한 경우, 결핵균의 재활성 감소 및 지연을 시사한다.

산업상 이용 가능성

[0184]

한 구현예에 있어서, 본 발명은 선택적으로 박테리아에 삽입되는 본 발명에 의한 핵산 단편, 면역원성 조성물, 백신 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 백신이 투여된 사람을 포함한 동물에 의해 생체 조건 내 발현이 유도되며, 발현된 항원의 양은 악성 한산성균, 예를 들어, 결핵균(Mycobacterium tuberculosis), 마이코박테리움 아프리카눔(Mycobacterium africanum), 소결핵균(Mycobacterium bovis), 나병균(Mycobacterium lepra) 또는 마이코박테리움 얼서란스(Mycobacterium ulcerans)에 의해 유발되는 결핵에 대한 저항성을 실질적으로 증가시키는데 효과적이다.

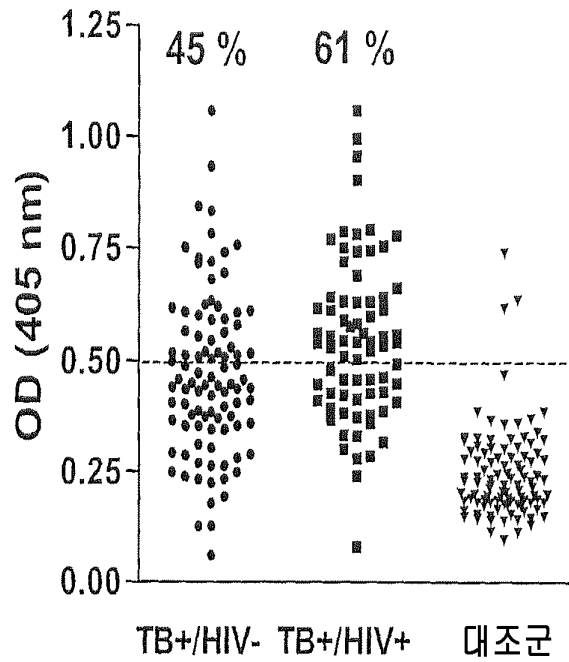
도면의 간단한 설명

- [0110] 도면 1. :HIV-음성 (TB+/HIV-) 와 HIV-양성 (TB+/HIV+)를 위한 Rv2660c의 항체 반응 우간다의 TB 환자와 덴마크의 건강한 대조군 (대조군). 확정범위는 특이성 97% ROC- 커브 분석에 기초한다. 관찰된 민감도 데이터는 그래프 표현에 나타난다.
- [0111] 도면 2. :Rv2659c 면역원성
- [0112] F1(Balb/cxC57BL/6) 쥐 그룹을 2주간 간격으로 DDA/MPL 안에 Rv2659c를 3번 피하 백신을 한다. 최종 백신 일주일 이후에 5 마이크로그램/ml Rv2659c의 자극 이후에 INF-감마 분비를 ELISA에 의하여 PBMCs를 분석하다.
- [0113] 도면 3. : Rv2659c에 의한 결핵균 감염에 대한 보호 유도
- [0114] Balb/c-C57BL/6 쥐 그룹을 2주간 간격으로 Rv2659c를 3번 피하 백신을 하고 보호 효능을 폐의 CFU 산출의 감소로 평가하며 면역하지 않은 쥐와 BCG 백신후 면역 12주 된 쥐와 비교한다. 결과는 폐의 \log_{10} 콜로니 포밍 유닛 (CFU)으로 표현하며 각 실험군의 6마리 쥐의 평균으로 한다.
- [0115] 도면 4: Rv2660c 면역원성
- [0116] F1(Balb/cxC57BL/6) 쥐를 2주간 간격으로 DDA/MPL 안에 있는 재조합 Rv2660c 단백질을 3번 피하 백신을 한다. (A). 최종 백신 일주일 이후에 0.2, 1 또는 5 마이크로그램/ml의 Rv2660c 자극 이후에 INF-감마 분비를 ELISA에 의하여 PBMCs를 분석하다. 최종 백신 3주 이후에 0.2, 1, 또는 5 마이크로그램/ml의 재조합 Rv2660c 자극 이후에 비장세포 (B)의 INF-감마 분비를 ELISA를 통하여 분석하고 0.2, 1 또는 5 마이크로그램/ml 재조합 Rv2660c 자극 이후에 세포증식 반응을 위하여 PBMCs (C)를 분석한다.
- [0117] 도면 5: 결핵균 (Mycobacterium tuberculosis) 감염에 대한 Rv2660c에 의한 보호 유도
- [0118] Balb/c-C57BL/6 쥐 그룹을 2주간 간격으로 Rv2660c를 3번 피하 백신을 하고 보호 효능을 폐의 CFU 산출의 감소로 평가하며 면역하지 않은 쥐와 6주 에어로솔 감염 이후 면역된 쥐와 비교한다. 결과는 폐의 \log_{10} 콜로니 포밍 유닛 (CFU)으로 표현하며 각 실험군의 6마리 쥐의 평균으로 한다. 양성 대조군으로, BCG 테니쉬 1331 (5x10⁴ 배설리/쥐)를 꼬리 하단에 첫 번째 서브유닛 백신과 동시에 1회 피하 주입한다; 부스터 백신의 추가 접종은 없음.
- [0119] 도면 6: Hybrid56, HyVac21 and HyVac28의 면역원성
- [0120] F1(Balb/cxC57BL/6) 쥐 그룹을 DDA/TDB (LipoVac)안에 있는 5 마이크로그램의 Ag85b-ESAT6-Rv2660c (H56), Ag85a-TB10.4-Rv2660c (H21) 또는 Ag85b-TB10.4-Rv2660c (H28) in DDA/TDB (LipoVac)를 2주간 간격으로 3번 피하 백신 실시. 최종 백신 일주일 이후에 1 마이크로그램/ml의 Ag85b, TB10.4 또는 Rv2660c Rv2660c 면역에 사용된 융합 단백질 자극 이후에 INF-감마 분비를 ELISA를 통하여 PBMCs를 분석한다 (도표 6A-C). Ag85b-ESAT6-Rv2660c의 최종 백신 3주 이후에 비장 세포 (D)[spleen cells (D)]의 INF-감마 분비를 ELISA에 의하여 분석하고 0.2, 1 또는 5 마이크로그램/ml 재조합 Ag85B, ESAT6, 또는 Rv2660c 자극 이후에 1 마이크로그램/ml의 같은 항원에 면역원성 실험을 한 세포반식 반응을 위하여 PBMCs (E)를 분석한다.
- [0121] 도면 7. : 결핵균 (M. tuberculosis) 감염에 관한 Hybrid56에 의한 강력한 보호
- [0122] (A) Balb/c-C57BL/6 쥐 그룹을 2주간 간격으로 Ag85B-ESAT6-Rv2660c (Hybrid56)를 3번 피하 백신을 하고 보호 효능을 폐의 CFU 산출의 감소로 평가하며 면역하지 않은 쥐와 2, 6, 12 및 24주 에어로솔 감염 이후 면역된 쥐와 비교한다. (B) B6 쥐 그룹을 2주간 간격으로 Ag85b-ESAT6 (Hybrid1) 또는 Ag85b-ESAT6-Rv2031c (Hybrid32)를 3번 피하 백신을 하고 보호 효능을 폐의 CFU 산출의 감소로 평가하며 면역하지 않은 쥐와 7, 13, 24, 35 및 44주 에어로솔 감염 이후 면역된 쥐와 비교하며 결과는 폐의 \log_{10} 콜로니 포밍 유닛 (CFU)으로 표시하며 각 실험군의 6마리 쥐의 평균으로 한다. 양성 대조군으로, BCG 테니쉬 1331 (5x10⁴ 배설리/쥐)를 꼬리 하단에 첫 번째 서브유닛 백신과 동시에 1회 피하 주입한다; 촉진 백신의 추가 접종은 없음.
- [0123] 도면 8. : 카프란 - 메이어 (Kaplan-Meier) 생존 커브 (n = 7). Ag85b-ESAT6-Rv2660c로 면역된 기니아피그의 융합 단백질이 적은 양의 에어로솔 결핵균 공격 이후 BCG 면역된 동물 수준으로 생존기간을 연장.
- [0124] 도면 9. : Hybrid56 (Ag85b-ESAT6-Rv2660c)에 의하여 유도되는 면역원성 및 보호
- [0125] F1(Balb/cxC57BL/6) 쥐를 2주간 간격으로 DDA/MPL에서 Ag85b-ESAT6-Rv2660c (Hybrid56)를 3번 피하 백신을 한

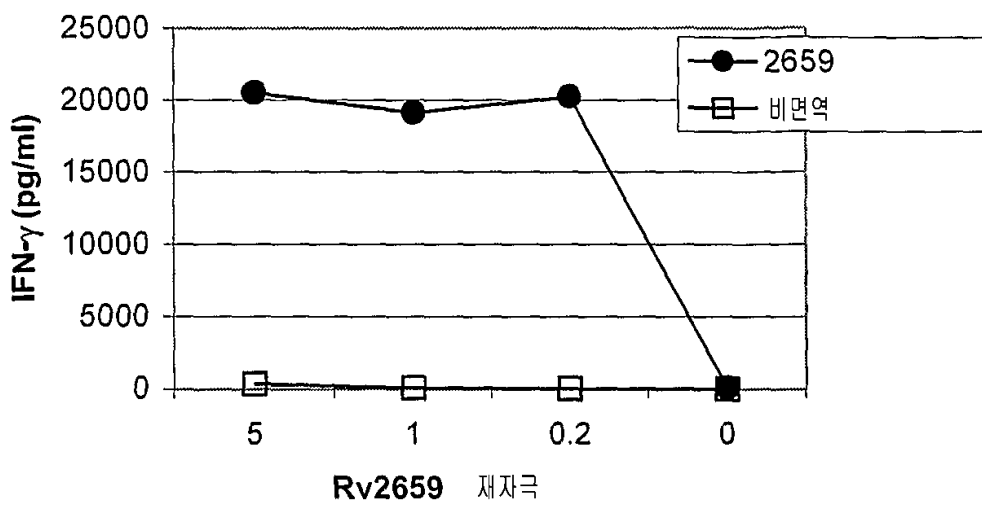
다. 최종 백신 10주 이후 0.2, 1, 또는 5 ug/ml Ag85B, ESAT6, 또는 Rv2660c 자극 이후에 비장세포를 ELISA에 의하여 INF- γ 분비를 분석한다 (도표 9A). 보호 효능은 폐의 CFU 산출을 백신 10주 이후의 면역 된 보조 대조군 쥐와 비교한다. 결과는 폐의 \log_{10} 콜로니 포밍 유닛 (CFU)으로 표현하며 각 실험군의 12 마리 쥐의 평균으로 한다 (도표 9B).

도면

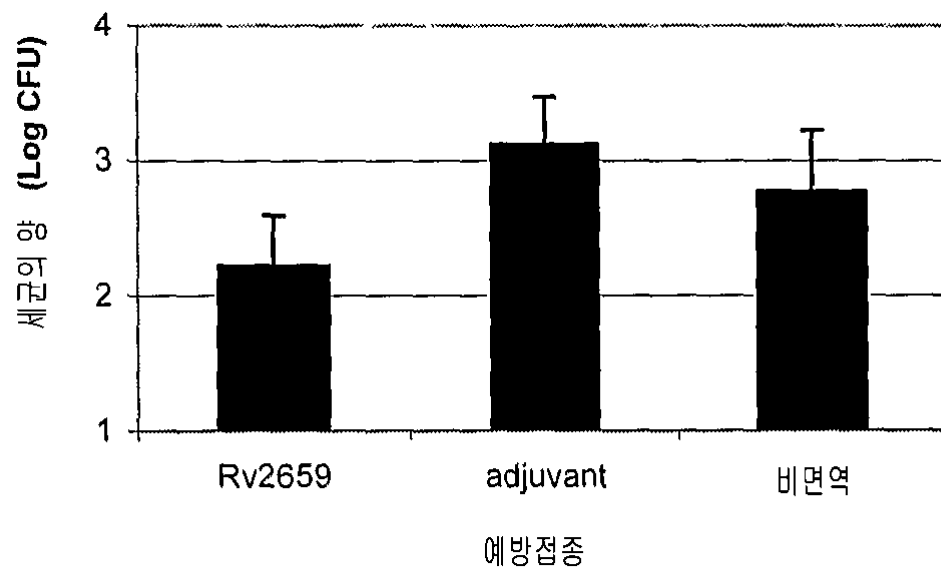
도면1



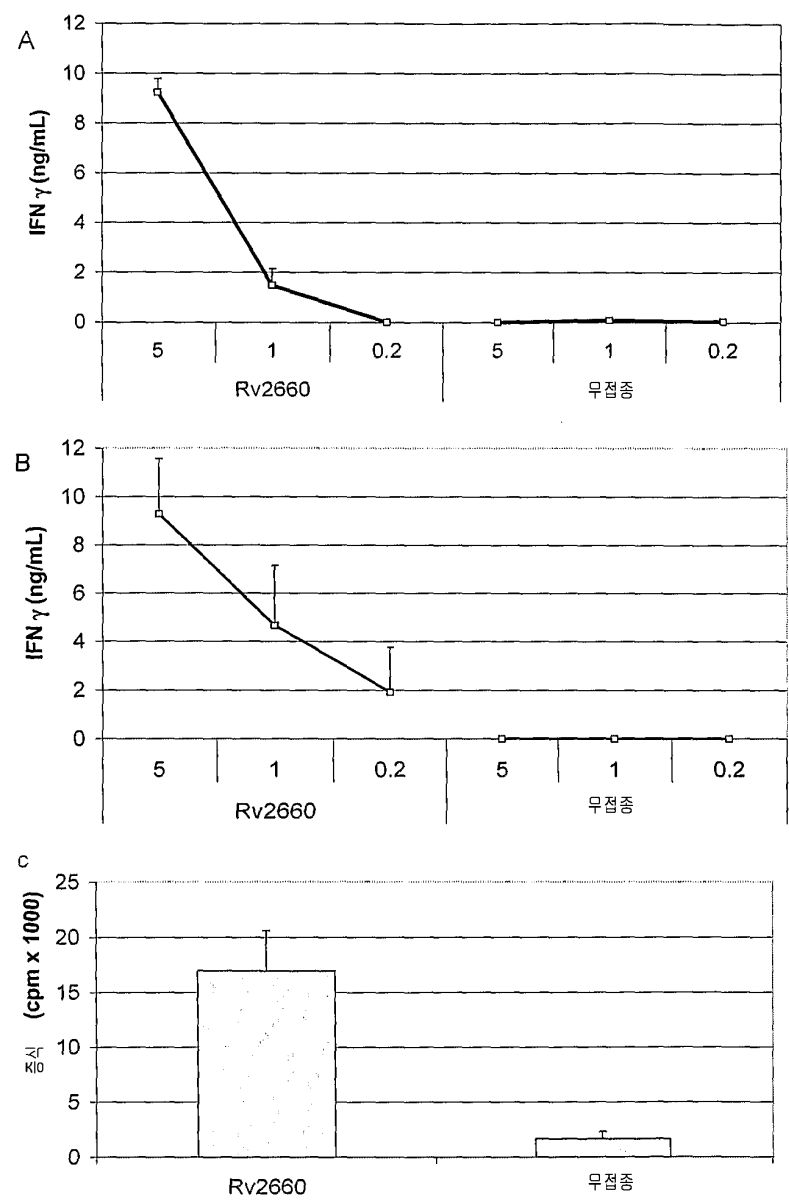
도면2



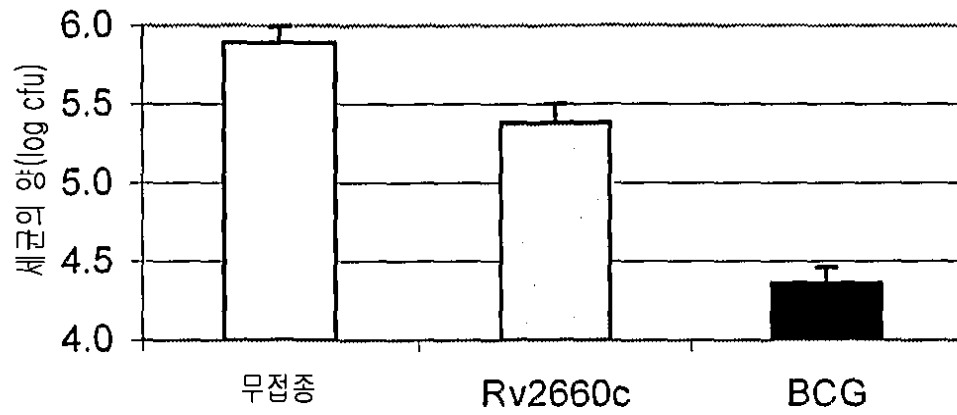
도면3



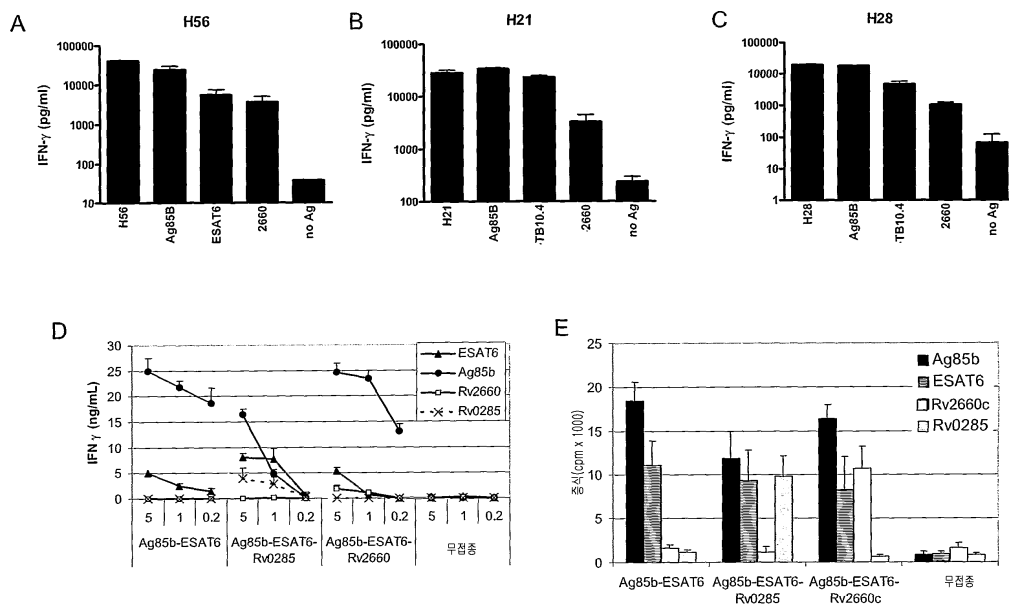
도면4



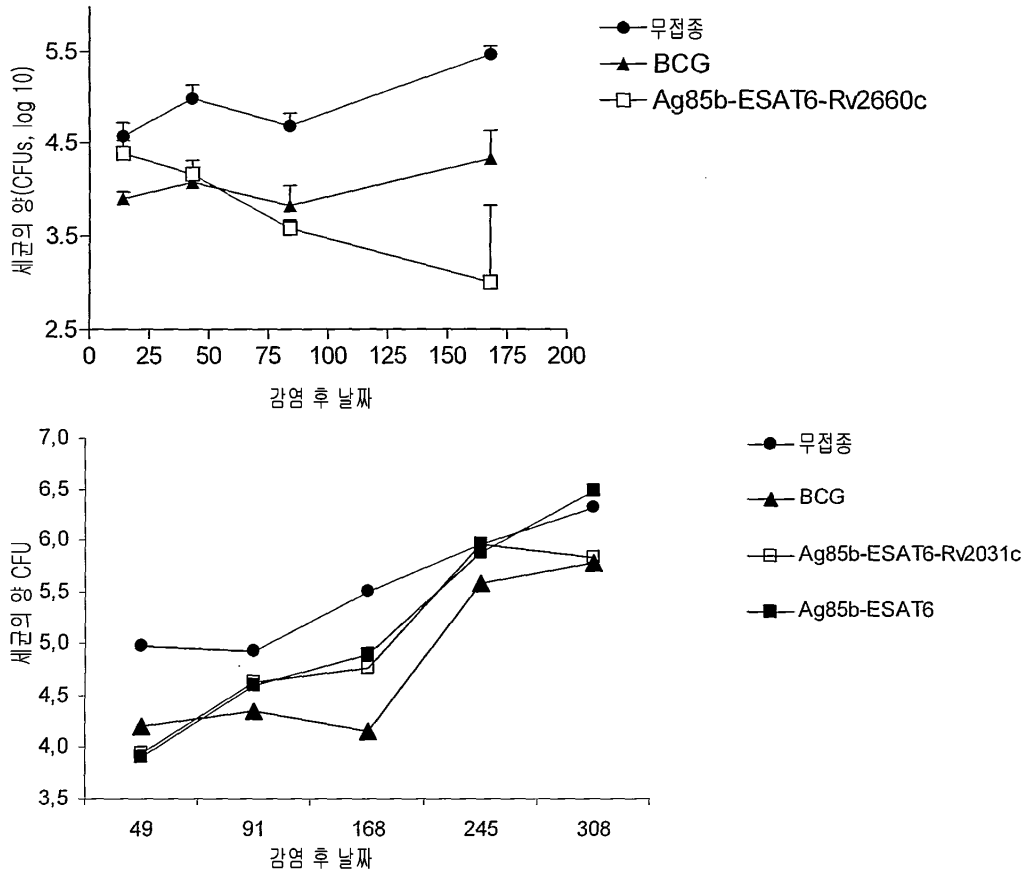
도면5



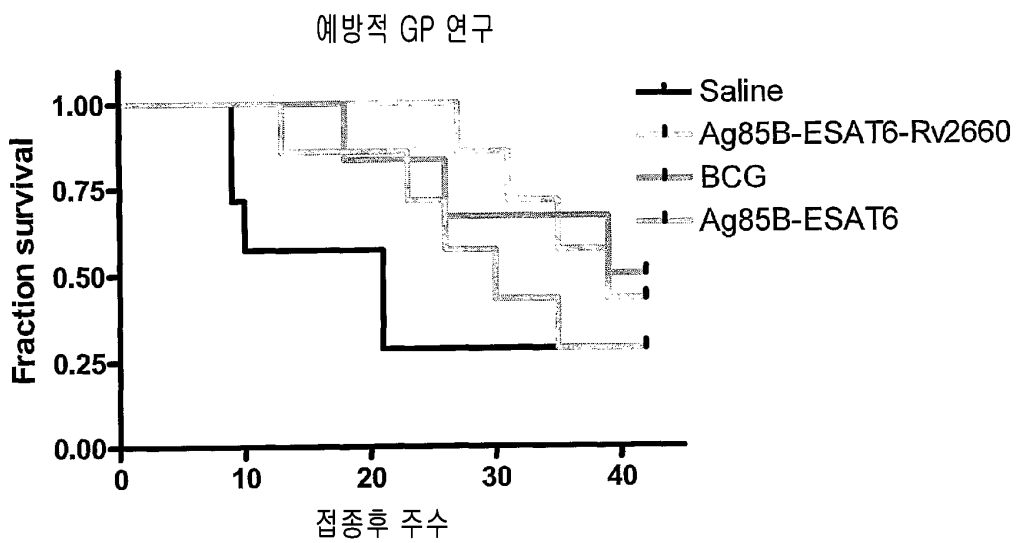
도면6



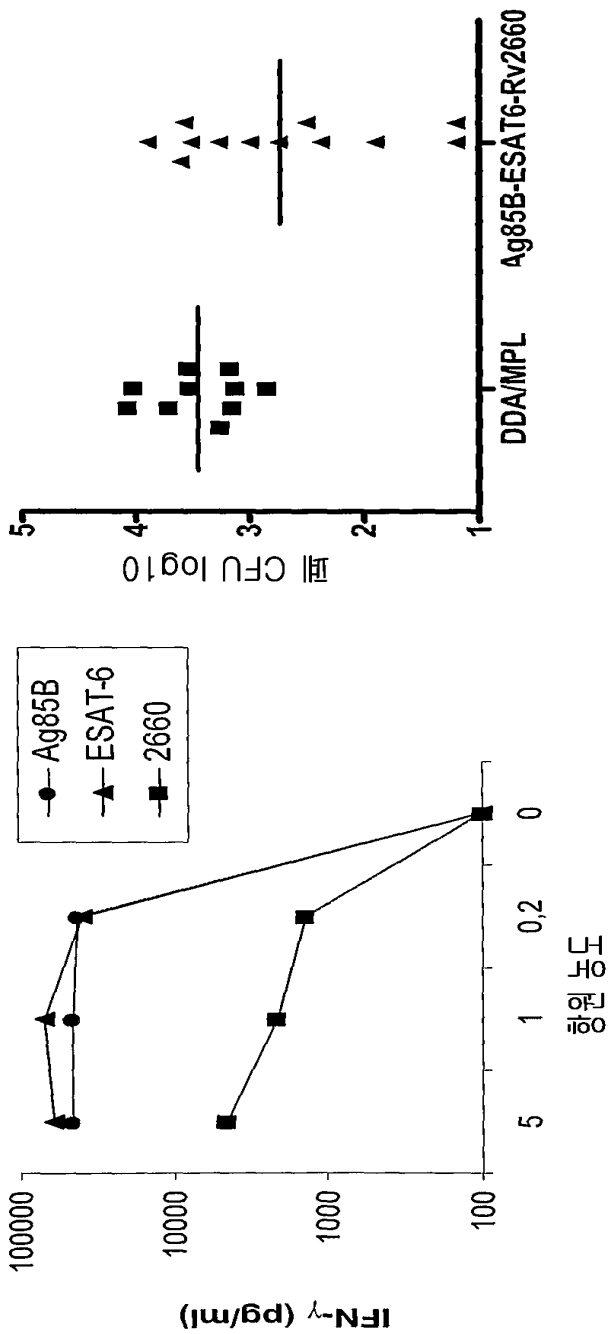
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Statens Serum Institut
- <120> New TB fusion protein vaccines
- <130> 15018dk1
- <150> PCT/DK PA2005 00924
- <151> 2005-06-23

<150> PCT/DK PA2005 01393
<151> 2005-10-05

<160> 18

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 960
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1
atggctgaca tcccctacgg ccgtgactat cccgaccga tctggtgtga cgaggacggc 60

cagccgatgc cgccggtcgg cgccgaattg ctgcacgaca ttagggcatt ctgcccggg 120

ttcgtagtct atccaagcga ccatgaactg atcgcgcaca ccctctggat tgcgcattgc 180

tggtttatgg aggcgtggga ctcaacgcc cgaatcgctt tttgtcacc ggaaccggc 240

tctggcaaga gccgcgcact cgaagtcacg gaaccgctag tgccccggcc ggtgcatgcc 300

atcaactgca caccggccta cctgttccgt cgggtggccg atccggtcgg gcggccgacc 360

gtcctgtacg acgagtgtga caccctgttt ggcccgaag ctaaagaaca cgaggaaatt 420

cgccggctga tcaacgccg ccaccgcaag ggagccgtcg cgggccgtg cgtcatccgc 480

ggcaagatcg ttgagaccga ggaactgcca gcgtactgtg cggtcgcctt ggccggcctc 540

gacgacctgc ccgacacat catgtctcgg tcgatcgtgg tgaggatgcg caggagggca 600

ccaaccgaac ccgtggagcc gtggcgcccc cgcgtcaacg gccccgaggc cgagaagctg 660

cacgaccggt tggcgaactg ggcggccgcc attaacccgc tggaaagcgg ttggccggcg 720

atgccggacg gggtagccga ccggcgccgc gacgtctggg agtccttggg tgcggttgct 780

gacaccgagg gggggcactg gcccaaaacc gcccggtgcaa ccgcagaaac ggatgcaacc 840
gcaaatcgag gagccaagcc cagcataggc gtgctgctgc tgcgggatat ccgtcgagtc 900
ttcagcgacc gggaccggat gcgcaccagc gacatcctga ccggactgaa ccggatggag 960
960

<210> 2
<211> 475
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2
Met Ala Asp Ile Pro Tyr Gly Arg Asp Tyr Pro Asp Pro Ile Trp Cys
1 5 10 15

Asp Glu Asp Gly Gln Pro Met Pro Pro Val Gly Ala Glu Leu Leu Asp
20 25 30

Asp Ile Arg Ala Phe Leu Arg Arg Phe Val Val Tyr Pro Ser Asp His
35 40 45

Glu Leu Ile Ala His Thr Leu Trp Ile Ala His Cys Trp Phe Met Glu
50 55 60

Ala Trp Asp Ser Thr Pro Arg Ile Ala Phe Leu Ser Pro Glu Pro Gly
65 70 75 80

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

Pro Val His Ala Ile Asn Cys Thr Pro Ala Tyr Leu Phe Arg Arg Val
100 105 110

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

Leu Phe Gly Pro Lys Ala Lys Glu His Glu Glu Ile Arg Gly Val Ile
130 135 140

Asn Ala Gly His Arg Lys Gly Ala Val Ala Gly Arg Cys Val Ile Arg

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

Glu Arg Asp Leu Ser Val Ser Ala Val Ser Ala Val Ser Pro Pro Val
385 390 395 400

Gly Asp Pro Gly Asp Ala Thr Gly Ala Thr Asp Ala Thr Asp Leu Pro
405 410 415

Glu Ala Gly Asp Leu Pro Tyr Glu Pro Pro Ala Pro Asn Gly His Pro
420 425 430

Asn Gly Asp Ala Pro Leu Cys Ser Gly Pro Gly Cys Pro Asn Lys Leu
435 440 445

Leu Ser Thr Glu Ala Lys Ala Ala Gly Lys Cys Arg Pro Cys Arg Gly
450 455 460

Arg Ala Ala Ala Ser Ala Arg Asp Gly Ala Arg
465 470 475

<210> 3
<211> 393
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 3
atgaccgccg tcggcgggtc gccgccgacg cgacgatgcc cggccacaga ggaccgggca 60

cccgcgacag tcgccacacc gtctagcacc gatcctaccg cgtcccgcgc cgtgtcgtgg 120

tggtcgggtc acgagtatgt cgcaccgacc ctggccgccg ccgtggaatg gccgatggcc 180

ggcaccccg cggtgtgcga cctcgacgac accgaccgg tcaaatgggc cgcgatctgc 240

gacgtgtctc ggcatggggc actccgggtg gagacgtgcc aggcgcgctc ggccgaggca 300

tcacgtgacg tatccgccgc gcccgactgg ccggcggtct ctcgggagat ccagcgtcgg 360

cgtgacgcct acattcggcg ggtggtggtc tga 393

<210> 4
<211> 130
<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

Met Thr Ala Val Gly Gly Ser Pro Pro Thr Arg Arg Cys Pro Ala Thr
1 5 10 15

Glu Asp Arg Ala Pro Ala Thr Val Ala Thr Pro Ser Ser Thr Asp Pro
20 25 30

Thr Ala Ser Arg Ala Val Ser Trp Trp Ser Val His Glu Tyr Val Ala
35 40 45

Pro Thr Leu Ala Ala Ala Val Glu Trp Pro Met Ala Gly Thr Pro Ala
50 55 60

Trp Cys Asp Leu Asp Asp Thr Asp Pro Val Lys Trp Ala Ala Ile Cys
65 70 75 80

Asp Ala Ala Arg His Trp Ala Leu Arg Val Glu Thr Cys Gln Ala Ala
85 90 95

Ser Ala Glu Ala Ser Arg Asp Val Ser Ala Ala Ala Asp Trp Pro Ala
100 105 110

Val Ser Arg Glu Ile Gln Arg Arg Arg Asp Ala Tyr Ile Arg Arg Val
115 120 125

Val Val
130

<210> 5

<211> 261

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

atgtgcgcgt tcccgctgcc gaggctcggg tggacggtct ctcacgagac cgaaaggccc 60

ggcatggcag acgctccccc gttgtcacgg cggatcatca cgatcagtga ggccgccgaa 120

tatctagcgg tcaccgaccg cagggtccgc cagatgatcg ccgacggccg cctacgcgga 180

taccgctccg gcacccgcct cgctcgtctg cgccgcgatg aggtcgacgg cgccatgcac 240

ccgttcggtg gtgccgcatg a 261

<210> 6
<211> 86
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 6
Met Cys Ala Phe Pro Ser Pro Ser Leu Gly Trp Thr Val Ser His Glu
1 5 10 15

Thr Glu Arg Pro Gly Met Ala Asp Ala Pro Pro Leu Ser Arg Arg Tyr
20 25 30

Ile Thr Ile Ser Glu Ala Ala Glu Tyr Leu Ala Val Thr Asp Arg Thr
35 40 45

Val Arg Gln Met Ile Ala Asp Gly Arg Leu Arg Gly Tyr Arg Ser Gly
50 55 60

Thr Arg Leu Val Arg Leu Arg Arg Asp Glu Val Asp Gly Ala Met His
65 70 75 80

Pro Phe Gly Gly Ala Ala
85

<210> 7
<211> 363
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 7
atggccgatg cggtaaagta cgtagttatg tgcaactgcg acgacgaacc gggagcgctc 60

atcatcgctt ggatcgacga cgaacgaccc gccggcgggc acatacagat gcggtcgaac 120

accgccttca ccgaaacaca gtggggccgc catatcgagt ggaaactcga atgccgggca 180

tgccgaaagt atgcgccgat atccgagatg accgccgcgg cgatcctcga cggtttcggg 240

gcgaagcttc acgagctgag aacgtcgacc atccccgacg ctgacgatcc atcaatagca 300

gaggcgcgac acgtaattcc gttcagcgca ttatgcttgc gcttgagcca gctaggcggg 360

taa 363

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 8
Met Ala Asp Ala Val Lys Tyr Val Val Met Cys Asn Cys Asp Asp Glu
1 5 10 15

Pro Gly Ala Leu Ile Ile Ala Trp Ile Asp Asp Glu Arg Pro Ala Gly
20 25 30

Gly His Ile Gln Met Arg Ser Asn Thr Arg Phe Thr Glu Thr Gln Trp
35 40 45

Gly Arg His Ile Glu Trp Lys Leu Glu Cys Arg Ala Cys Arg Lys Tyr
50 55 60

Ala Pro Ile Ser Glu Met Thr Ala Ala Ala Ile Leu Asp Gly Phe Gly
65 70 75 80

Ala Lys Leu His Glu Leu Arg Thr Ser Thr Ile Pro Asp Ala Asp Asp
85 90 95

Pro Ser Ile Ala Glu Ala Arg His Val Ile Pro Phe Ser Ala Leu Cys
100 105 110

Leu Arg Leu Ser Gln Leu Gly Gly
115 120

<210> 9
<211> 1128
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9
gtgacgcaaa ccggcaagcg tcagagacgc aaattcggtc gcatccgaca gttcaactcc 60

ggccgctggc aagccagcta caccggcccc gacggccgcg tgtacatcgc ccccaaaacc 120

ttcaacgcca agatcgacgc cgaagcatgg ctaccgacc gccgccgca aatcgaccga 180

caactatggt ccccgcatc gggtcaggaa gaccgcccc gagccccatt cggtagtac 240

gccgaaggat ggtgaagca gcgtggaatc aaggaccgca cccgcgccca ctatcgaaa 300

ctgctggaca accacatcct ggccacctic gctgacaccg acctacgca catcaccccg 360

gccgccgtgc gccgctggta cgccaccacc gccgtgggca caccgacat gcgggcacac 420

tctacagct tgctgcgcgc aatcatgcag accgccttgg ccgacgacct gatcgactcc 480

aaccctgcc gcatctcagg cgctccacc gccgccgcg tccacaagat caggcccgcc 540

accctgacg agctggaac catcacaaa gccatgccc accctacca gcgcttcgtg 600

ctgatggcgg catggctggc catgcgtac ggcgagctga ccgaattac ccgcaaagac 660

atcgacctgc acggcgaggt tgccgggtg cggcgggctg tcgttcgggt gggcgaaggc 720

ttcaagtgta cgacaccgaa aagcgtgcg ggagtgcgc acataagtat cccgcccat 780

ctgatacccg ccatgaaga ccaccticac aaacacgtca acccggccg ggagtcctg 840

ctgttcccat cgtcaacga ccccaacct cacctagcac cctcggcgt gtaccgatg 900

ttctacaagg cccgaaaagc cgccggccga ccagacttac gggtgcacga cttcgacac 960

tccggcgccg tgttggctgc atccaccggc gccacactgg ccgaactgat gcagcgcta 1020

ggacacagca cagccggcgc cgactccgc taccagcac ccgccaaggg ccgggaccgc 1080

gaaatcgcc cactgttaag caaactggc gagaaccagg agatgtga 1128

<210> 10
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 10
 Val Thr Gln Thr Gly Lys Arg Gln Arg Arg Lys Phe Gly Arg Ile Arg
 1 5 10 15

Gln Phe Asn Ser Gly Arg Trp Gln Ala Ser Tyr Thr Gly Pro Asp Gly
 20 25 30

Arg Val Tyr Ile Ala Pro Lys Thr Phe Asn Ala Lys Ile Asp Ala Glu
 35 40 45

Ala Trp Leu Thr Asp Arg Arg Arg Glu Ile Asp Arg Gln Leu Trp Ser
 50 55 60

Pro Ala Ser Gly Gln Glu Asp Arg Pro Gly Ala Pro Phe Gly Glu Tyr
 65 70 75 80

Ala Glu Gly Trp Leu Lys Gln Arg Gly Ile Lys Asp Arg Thr Arg Ala
 85 90 95

His Tyr Arg Lys Leu Leu Asp Asn His Ile Leu Ala Thr Phe Ala Asp
 100 105 110

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

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

Leu Arg Ala Ile Met Gln Thr Ala Leu Ala Asp Asp Leu Ile Asp Ser
 145 150 155 160

Asn Pro Cys Arg Ile Ser Gly Ala Ser Thr Ala Arg Arg Val His Lys
 165 170 175

Ile Arg Pro Ala Thr Leu Asp Glu Leu Glu Thr Ile Thr Lys Ala Met
 180 185 190

Pro Asp Pro Tyr Gln Ala Phe Val Leu Met Ala Ala Trp Leu Ala Met
 195 200 205

Arg Tyr Gly Glu Leu Thr Glu Leu Arg Arg Lys Asp Ile Asp Leu His
210 215 220

Gly Glu Val Ala Arg Val Arg Arg Ala Val Val Arg Val Gly Glu Gly
225 230 235 240

Phe Lys Val Thr Thr Pro Lys Ser Asp Ala Gly Val Arg Asp Ile Ser
245 250 255

Ile Pro Pro His Leu Ile Pro Ala Ile Glu Asp His Leu His Lys His
260 265 270

Val Asn Pro Gly Arg Glu Ser Leu Leu Phe Pro Ser Val Asn Asp Pro
275 280 285

Asn Arg His Leu Ala Pro Ser Ala Leu Tyr Arg Met Phe Tyr Lys Ala
290 295 300

Arg Lys Ala Ala Gly Arg Pro Asp Leu Arg Val His Asp Leu Arg His
305 310 315 320

Ser Gly Ala Val Leu Ala Ala Ser Thr Gly Ala Thr Leu Ala Glu Leu
325 330 335

Met Gln Arg Leu Gly His Ser Thr Ala Gly Ala Ala Leu Arg Tyr Gln
340 345 350

His Ala Ala Lys Gly Arg Asp Arg Glu Ile Ala Ala Leu Leu Ser Lys
355 360 365

Leu Ala Glu Asn Gln Glu Met
370 375

<210> 11
<211> 228
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11
gtgatagcgg gcgtcgacca ggcgttgca gcaacaggcc aggctagcca gcgggcggca

ggcgcatctg gtgggtcac cgtcgggtgc ggcggtggca cggaacagag gaacctttcg 120

gtggttgac cgagtcagtt cacatttagt tcacgcagcc cagattttgt ggatgaaacc 180

gcaggtaaat cgigggtgcgc gatactggga ttgaaccagt ttactag 228

<210> 12
<211> 75
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 12
Val Ile Ala Gly Val Asp Gln Ala Leu Ala Ala Thr Gly Gln Ala Ser
1 5 10 15

Gln Arg Ala Ala Gly Ala Ser Gly Gly Val Thr Val Gly Val Gly Val
20 25 30

Gly Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ser Val Val Ala Pro Ser Gln Phe Thr
35 40 45

Phe Ser Ser Arg Ser Pro Asp Phe Val Asp Glu Thr Ala Gly Gln Ser
50 55 60

Trp Cys Ala Ile Leu Gly Leu Asn Gln Phe His
65 70 75

<210> 13
<211> 390
<212> DNA
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 13
atgagggtc gcagcgatgc tggaggccag tctgtgaagt cccgcacgtc gaatcgggcc 60

agaagctcgc gccggagccg cgtcagggtca tccatcagtg ccctcgttga taatccgcag 120

gctcggccgc gcgagctccc tgttctgtgc ggggtggccc tagtgccgt cgagccggtc 180

tgcgagttcg tgccggagcc ggtttgtgga caggccgagg tgctcggcga gccagccgcc 240

gtctatcggg tcacctcagc ccgccggtca cctcaacga ccgtttgcag ccgttcgcag 300

aaggcgagcg cggtaggtgat cagctccgtc agctcggttg ccggggtgcg gcgtgcctcg 360

gtgagttcgg tggacgcgac aacagcgtga 390

<210> 14
<211> 129
<212> PRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 14
Met Arg Ala Arg Ser Asp Ala Gly Gly Gln Ser Val Lys Ser Arg Thr
1 5 10 15

Ser Asn Arg Ser Arg Ser Ser Arg Arg Ser Arg Val Arg Ser Ser Ile
20 25 30

Ser Ala Leu Val Asp Asn Pro Gln Ala Arg Pro Arg Glu Leu Pro Val
35 40 45

Leu Cys Gly Trp Pro Val Val Arg Val Glu Pro Val Cys Glu Phe Val
50 55 60

Pro Glu Pro Val Cys Gly Gln Ala Glu Val Leu Gly Glu Pro Ala Ala
65 70 75 80

Ala His Arg Val Thr Ser Ala Arg Arg Ser Pro Ser Thr Thr Val Cys
85 90 95

Ser Arg Ser Gln Lys Ala Ser Ala Val Val Ile Ser Ser Val Ser Ser
100 105 110

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

Ala

<210> 15
<211> 273
<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 15

atggatgacc tgacgcggt cggcgcgag cttctggacc gattcgacgt gcgggacttc 60

acagactggc ctccagcatc gctgcgagcc ctcatcgca cctacgacc ctggatcgac 120

atgacggcca gcccgcaca gcctgtatcg cccggagggc ctgactccg actcgtgcga 180

ttaaccacca acccatccgc gagagcagcc cctatcgaa acgtgggga ctcttctgtt 240

tgcgctggtg agaaacagtg ccgcccacg tag 273

<210> 16

<211> 90

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 16

Met Asp Asp Leu Thr Arg Leu Arg Arg Glu Leu Leu Asp Arg Phe Asp
1 5 10 15

Val Arg Asp Phe Thr Asp Trp Pro Pro Ala Ser Leu Arg Ala Leu Ile
20 25 30

Ala Thr Tyr Asp Pro Trp Ile Asp Met Thr Ala Ser Pro Pro Gln Pro
35 40 45

Val Ser Pro Gly Gly Pro Arg Leu Arg Leu Val Arg Leu Thr Thr Asn
50 55 60

Pro Ser Ala Arg Ala Ala Pro Ile Gly Asn Gly Gly Asp Ser Ser Val
65 70 75 80

Cys Ala Gly Glu Lys Gln Cys Arg Pro Pro
85 90

<210> 17

<211> 234

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 17
 gtggaggtga gggctagcgc ccgcaagcac ggcatcaacg acgacgccat gctccacgca 60
 taccgcaacg cgctgcgcta cgtcgaactg gaataccacg gcgaagttca actgctgggtg 120
 atcggccccc accaaaccgg gcgcctttta gagctgggtca tcccagcaga cgaaccaccc 180
 cggattatcc acgccaacgt actagccccg aagttctacg actacgtgag gtga 234

<210> 18
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 18
 Val Glu Val Arg Ala Ser Ala Arg Lys His Gly Ile Asn Asp Asp Ala
 1 5 10 15
 Met Leu His Ala Tyr Arg Asn Ala Leu Arg Tyr Val Glu Leu Glu Tyr
 20 25 30
 His Gly Glu Val Gln Leu Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Thr Gly Arg
 35 40 45
 Leu Leu Glu Leu Val Ile Pro Ala Asp Glu Pro Pro Arg Ile Ile His
 50 55 60
 Ala Asn Val Leu Arg Pro Lys Phe Tyr Asp Tyr Leu Arg
 65 70 75