



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0072366
(43) 공개일자 2017년06월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 - A61K 39/04 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
 - A61K 39/02 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
 - A61K 47/00 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)
 - A61K 48/00 (2006.01) A61K 49/16 (2006.01)
 - C07K 14/35 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
 - C12N 1/00 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
 - A61K 39/04 (2013.01)
 - A61K 39/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7016378(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년04월23일
 - 심사청구일자 2017년06월14일
- (62) 원출원 특허 10-2011-7028104
 - 원출원일자(국제) 2010년04월23일
 - 심사청구일자 2015년03월10일
- (85) 번역문제출일자 2017년06월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/DK2010/000054
- (87) 국제공개번호 WO 2010/121618
 - 국제공개일자 2010년10월28일
- (30) 우선권주장
 - PA 2009 00539 2009년04월24일 덴마크(DK)
- (71) 출원인
 - 스테튼스 세룸 인스티튜트
 - 덴마크 디케이-2300 코펜하겐 에스, 아틸리리바이 5
- (72) 발명자
 - 디트리히, 제스
 - 덴마크 디케이-2200 코펜하겐 엔 1 너레브로가데 200비
 - 안데르센, 피터
 - 덴마크 디케이-2700 브린스회이 스파레스홀름바이 47
 - (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 - 특허법인 대아

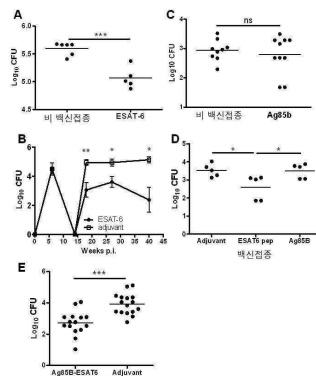
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 재활성화를 예방하기 위한 결핵 백신

(57) 요약

본 발명은 결핵 복합체 미생물(결핵균, M. 보비스, M. 아프리카눔)의 종에 의하여 야기되는 잠복 결핵 감염의 재활성화를 예방하기 위하여, 모두가 상호의존적으로 분비가 요구되고 발병에 필수적인 것으로 알려진 ESX-1 분비 시스템에 모두 속하는 ESAT6, CFP10 및 EspA. ESAT6, CFP10 및 EspA과 같이 항상 발현되는 항원들을 목표로 함으로써, 잠복 감염된 대상에 투약되는 백신에 의하여 결핵 복합체(결핵균, M. 보비스, M. 아프리카눔)의 종에 의하여 야기되는 감염을 치료하는 것에 대한 것이다. 이들 분비된 항원들은 박테리아 전염(dessemination) 및 세포막 용균에 결정적이다. 예컨대, Ag85의 발현이 감염 후 곧 하향조절되는 것에 반하여, ESAT6, CFP10 및 EspA은 또한 질병의 서로 다른 단계에서 항상 발현되는 항원들이다. 놀랍게도 면역원성 구조적으로 발현되는 항원들은 노출 후 백신으로서 투약되는 경우 감염 잠복을 유지함으로써 잠복 결핵 감염의 재활성화를 예방한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 39/02 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
A61K 47/00 (2013.01)
A61K 47/42 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 49/16 (2013.01)
C07K 14/35 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
C12N 1/00 (2013.01)

호양, 트룩, 티, 킴, 덴

덴마크 디케이-2300 코펜하겐 에스 4 텔레막스가데
31

(72) 발명자

런드버그, 커리너, 빙스보

스웨덴 에스-23642 월비켄 콜휘츠 벅스크 후리스
매그

명세서

청구범위

청구항 1

재활성화를 예방하며,

i) 서열번호 1

ii) 상기 i)의 서열중 어느 하나의 면역원성 부위; 및

iii) 상기 i) 또는 ii)의 서열들 중 어느 하나에 적어도 70%의 서열 일치성을 가지며, 동시에 면역원성인 아미노산 서열 상동체

로 구성되는 군으로부터 선택되고, 그리고 ESX-1 분비 시스템에 속하며,

그리고 이때 백신 또는 면역원성 조성물은, 폴리 I:C와 함께 또는 없이, IC31 또는 DDA/TDB를 포함하는 항원 보강제를 포함하는,

백신 또는 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

면역원성 부위들의 혼합물을 포함하는 백신 또는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

서열번호 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 및 31으로 구성되는 군으로부터 선택되는 항원 폴리펩타이드들의 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 또는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 항원 폴리펩타이드는 융합 파트너와 융합되고, 상기 융합 파트너는 마이코박테리아 과의 박테리아에 의하여 발현되는 항원인 것을 특징으로 하는 백신 또는 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 융합 파트너는 항시 발현되는 항원인 것을 특징으로 하는 백신 또는 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

CFP10에 융합된 ESAT6를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 또는 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,

마이코박테리아 유전자들을 발현시키는, 유전자-변형된 박테리아, 바이러스들 또는 다른 생물들인 생 체조합 백신들, 또는 면역원성 DNA 백신들 또는 서열번호 1로부터 선택되는 항원 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자들, 또는 유전자 단편들, 또는 그것들의 면역원성 부위들을 발현시키는 플라스미드들인 다른 면역원성 전달 시스템들, 또는 항원 보강제에서 전달되는 단백질들 자체로부터 유래되는 합성 펩타이드들 또는 단백질들 자체인, 단백질 백신들로부터 선택되는 추가적인 전달 시스템을 포함하는 백신 또는 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 항원 보강제는 DDA/TDB를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 또는 조성물.

청구항 9

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 폴리펩타이드는 폴리펩타이드가 자체-항원 보강 효과를 갖도록 지질화되는 것을 특징으로 하는 백신 또는 조성물.

청구항 10

잠복 결핵의 치료에 사용되는 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에서 규정된 항원 폴리펩타이드들로부터 선택되는 항원 폴리펩타이드.

청구항 11

병독성 마이코박테리아에 의하여 야기되는 결핵 감염의 재활성화에 대하여, 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 백신 또는 면역원성 조성물을, 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 치료 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 백신 또는 면역원성 조성물은 급성기 후 및/또는 잠복기 감염 동안 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 11항에 있어서,

상기 방법은 병독성 마이코박테리아에 의하여 잠복 감염된 개체(subject)를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 병독성 마이코박테리아에 의하여 잠복 감염된 개체는 항시 발현된 항원으로 자극한 후 IP10의 검출, HBHA에 대한 반응의 인 비트로 검출, 퀴안티페론(Quantiferon) 검사 또는 망뚜(Mantoux) 투베르쿨린 피부 테스트(TST)로부터 선택되는 진단 절차에서 확인하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 ESAT6, CFP10 및 ESX-1 분비 시스템 결핵 유래의 다른 항원들과 같이 본질적으로 발현된 항원들을 타겟으로 함으로써, 결핵 복합체 미생물들(결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), *M. 보비스*(*M. bovis*), *M. 아프리카눔*(*M. africanum*))의 종에 의하여 야기되는 잠복 결핵 감염의 재활성화를 예방하기 위하여 잠복감염된 대상에게 투약할 수 있는 백신을 개시한다.

배경 기술

[0002] WHO에 의하면, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*(*M. tuberculosis*))이 야기하는 인간 결핵은 연간 약 3백만 명의 사망의 원인이 되는 심각한 전 세계적인 건강상의 문제이다. 1960년대 및 1970년대 동안 신종 결핵(TB)의 전 세계적인 발병률은 감소하였으나, 부분적으로는 AIDS의 출현 및 다제내성 결핵 균주의 발생 때문에, 최근 수십년간 이러한 경향은 현저히 변화하였다.

[0004] 결핵균 복합체의 생물들은 다양한 질병을 일으킬 수 있으나 가장 흔한 침범 경로는 박테리아의 흡입에 의한 것이다. 이는 폐 감염을 야기하는데, 폐 감염은 결국에는 신체의 다른 부위로 퍼질 수 있다. 보통은, 이러한 감염은 면역 시스템에 의하여 성장이 제한되며, 이로써 감염된 대상의 대부분은 기침 및 열 외 증상은 거의 보이지 않고, 기침 및 열은 결국은 완화된다. 대략 30%의 사람들은 감염을 유지하는 것이 불가능하며, 그들은 원발성 질병(primary disease)으로 발전하는데, 많은 경우 이는 결국은 치명적인 것으로 판명된다. 그러나 감염을 명백히 조절하는 이러한 사람들조차도 대개는 그들의 남은 삶 동안 감염된 채로 유지된다. 확실히 수년 간 또는 심지어 수십년 간 건강한 사람들이 결핵을 갑자기 발전시키는데, 이는 수년 전에 그들이 감염되었던 동일한 생물에 의하여 야기된 것으로 판명된다. 결핵균 복합체(TB complex)의 *M. 튜버쿨로시스*(*M. tuberculosis*) 및 다른 생물들은 마이코박테리아(mycobacteria)가 면역 반응에 침범하여 불용 비복제 또는 느린 속도로 복제가 일어나는 단계(slowly-replicating stage)에서 오랜 기간 살 수 있다는 점에서 특이하다. 이는 잠복 결핵이라 불리며, 오늘날 세계 인구의 대략 1/3에게 영향을 끼치는 것으로 추정되는, 매우 심각한 전 세계적인 건강상의 문제이다 (Anon., 2001).

[0006] 현재 임상 용도로 이용 가능한 유일한 백신은 BCG인데, 이는 그 효능에 대하여 아직 논쟁의 문제가 남아 있다. 비록 BCG가 1차 감염의 동물 모델에서 일관되게 잘 기능한다고 하더라도, 그것은 결핵의 유행을 통제하는데에는 명백하게 실패하였다. 마찬가지로, BCG 백신 접종은 소아 결핵(이는 1차 감염때문이다)으로부터는 보호하는 것으로 보이나, 성인 질병(이는 종종 유년기에 얻은 잠복 감염의 재활성화이다)에 대하여는 보호를 하지 못하거나 거의 보호를 제공하지 못한다. 또한 현재 마이코박테리아에 민감하거나(sensitize) 또는 잠복감염된 대상에게 백신 접종하는 것은 효과가 없는 것으로 보인다.

[0008] *M. 튜버쿨로시스* 감염의 진행은 본질적으로 1에서 도시하는대로 3 단계로 이루어진다. 급성기 동안, 면역 반응이 증가하여 감염을 통제할 수 있고, 그 결과 박테리아의 부담이 정점에 이르고 감소하기 시작하는 때까지 박테리아는 기관 내에서 증가한다. 그 이후, 박테리아 부담이 낮은 수준에서 안정적으로 유지되는 잠복기가 확립된다. 이 단계에서, *M. 튜버쿨로시스*가 활동적인 증식으로부터 휴면(dormancy)으로 가서, 본질적으로 비복제가 되며 육아종(granuloma) 내에 남아 있게 된다는 것이 최근의 생각이었다.

[0010] 그러나, 최근, 지속적으로 낮은 박테리아 수를 보이는 단계에서조차 박테리아 군 중 적어도 일부는 활동성 대사 상태에 있는 것이 명확하여졌다(Talaat AM et al. 2007). 그러므로 이들 박테리아는 살아남으며, 활동성 대사를 유지하고, 강한 면역 반응에도 불구하고 복제한다. 그러므로 감염된 대상에서는 비복제(non-replicating) 박테리아(이들이 세포 내에 위치하기 면역 시스템이 감지하는 것을 매우 어려울 수 있다) 및 면역 숙주 내에서 마주치는 적대적인 환경에 적응하기 위한 시도인, 활동적이지만 변화된 발현 프로파일(profile)을 갖는 천천히 복제되는 박테리아 간에 균형이 있다. 종래의 예방 백신들을 잠복 감염된 실험 동물들에 가할 때 활성이 부족하다는 점이 예시하듯, 이 단계에 있는 박테리아는 현재 결핵 분야에서 개발 중인 대부분의 예방 백신이 전형적으로 목표로 하는 것은 아니다(Turner 2000).

[0012] 어떤 경우, 균형은 병원체 쪽으로 기울어져, 박테리아가 급격히 복제를 시작하고 감염된 대상 내 박테리아 수가 증가하는 재활성 단계로 감염이 진행된다. 매우 강한 면역 압력 하 감염 잠복된 대상 내에서 복제하는 박테리아는 본 발명의 백신 접종 전략의 목표이다. 예방 백신들을 잠복 감염된 실험 동물들에 가할 때 활성이 부족하다는 점이 예시하듯, 이러한 잠복 감염 단계에 있는 박테리아는 현재 결핵 분야에서 개발 중인 대부분의 예방 백신이 전형적으로 목표로 하는 것은 아니다(Turner 등 2000). 강한 숙주 면역 반응이 주요한 예방 백신 항원 Ag85 및 PstS과 같은 많은 항원들의 하향 조절에 이르게 된다는 것이 현재 알려져 있는바, 이는 놀라운 것은 아니다(Rogerson, BJ et al 2006). Ag85B의 경우, 감염 이후 Ag85B 발현에는 초기 과도 증가가 있으나, 감염 2주 후에 이미 박테리아 Ag85B 발현 수준은 피크기 동안 M.tb의 CFU 당 0.3 전사물(transcript)에서 CFU 당 0.02 전사물로 떨어지며, 이러한 낮은 수준은 적어도 감염 후 100일까지 유지된다. 그러므로 감염 2주 후 어느 시점에서든 박테리아의 2% 미만이 활동적으로 Ag85B를 발현시킨다(동일 책). Ag85B의 낮은 발현은 감염 후 3주 또는 그 이후 폐에서 Ag85B에 대한 반응에서 IFN- γ 를 만들 수 있는 T 세포의 수가 급격히 떨어지는 것에 의하여 지지된다.

[0014] 이에 반하여, 어떤 항원들은 감염의 다른 단계들에서 계속해서 더욱 안정적으로(항시) 발현되는데, 그 예가 ESAT6이다. 초기 감염 단계 이후 ESAT-6 발현 수준은 M. 튜버쿨로시스 CFU 당 0.8 전사물로 안정된다. 이것은 Ag85B보다 더욱 높은 전사 수준이며, 이러한 수준은 감염 후 적어도 100일까지 안정적으로 유지된다(Rogerson, BJ 등 2006). 또한 전사 데이터는 감염 부위에서 감염의 뒷 단계에서의 ESAT-6의 강한 T 세포 인식을 보이는 면역 데이터에 의하여 뒷받침된다(동일 책). 이러한 구조적인 발현 패턴은 이들 분자들이 병원체의 결정적인 중요성인 본질적인 기능, 즉 병원체가 면역 숙주 내에서 생존하기 위하여 항시 발현될 필요가 있는 유전자들에 의존하는 기능을 달성한다는 것을 보여주는 중요한 특징이다. 이들 분자들은 본 발명의 기초이며, 잠복 감염된 대상들에 투약되는 백신에서 특히 중요한 항원들인데, 이는 이들이 박테리아 라이프 스타일의 모든 단계를 목표로 하고, 그러므로 활성을 위하여 가장 폭넓은 가능한 성분(basis)를 갖기 때문이다. 이는 비복제 지속기(persistence) 동안 마이코박테리아에 의하여 상향조절되는 항원을 확인하는데 주목해온 최근의 생각과는 다른 것이다(Andersen, P. 2007, W002048391, W004006952, Lin MYand Ottenhoff TH 2008; Leyten EM. 등 2006). 비록 이러한 항원들이 비복제 지속기 동안 상향조절되기는 하나, 비복제 박테리아로부터 이용 가능한 양은 인지(detection) 또는 보호 면역 작동체(effector) 기능을 유발하기 위한 합리적인 역치 이하인바, 그것들이 항상 면역 인식에 이용가능한 것은 아니다.

[0015] 반면, ESX-1 분비 시스템 유래의 몇몇 단백질들은 높은 면역원성을 보였으며 높은 수준으로 발현되었다. ESX-1은 몇몇 병원성 마이코박테리아에서 보존되며, 결핵균(tubercle bacilli)의 발병력에 관여한다. ESAT-6, CFP10 및 EspA의 분비에 있어 개개의 ESX-1 단백질의 기여는 잘 보고되어 왔으며((Pym AS 등 2003; Guinn K1 등, 2004; Stanley, SA 등. 2003; Brodin, P. 등. 2006; MacGurn JA 등. 2005; Raghavan, S. 등. 2008), 작동체 분자들의 기능은 박테리아가 퍼지는 것과 포식소체(phagosome)를 피하는 맴브레인 용균인 것으로 나타났다(Gao LY 등 2004; Smith J. 등 2008).

[0017] 재활성화로 이끄는 인자들 및 잠복 감염을 통제하는 면역 반응의 완전한 특성들은 대부분 알려져 있지 않다. 그러나 책임있는 우세한 세포 타입의 변화에 대하여는 몇 가지 증거가 있다. 급성기 동안 감염의 조절에 CD4 T 세포가 필수적이면서도 충분한 반면, 연구는 잠복기에는 CD8 T 세포 반응이 더 중요하다는 것을 제안한다(van Pinxteren LA 등 2000).

- [0019] 당업자가 쉽게 인정하듯이, 유전자의 발현은 그것을 좋은 백신 후보로 만드는데 충분하지 않다. 한 단백질이 M. 튜버쿨로시스의 잠복 감염 동안 면역 시스템에 의하여 인식되는지 여부를 확인하는 유일한 방법은 상기 단백질을 생산하고, 그것을 여기에 기재한 적절한 검사로 시험하는 것이다. 이 점에 있어서, 우리 그룹은 ESAT-6 (Early Secretory Antigen Target-6)와 같이, 마이코박테리아에 의하여 강하게 발현되는 항원들이 감염의 모든 단계의 대상, 사실 특히 잠복 감염된 대상에서 인식된다고 주장한다(Boesen, Ravn, Doherty 2002).
- [0021] 그러나 자연적인 감염 동안 준비되는 ESAT-6 특이적 T 세포들은, 비록 그것들이 많은 수로 존재한다고 하더라도, 감염성 질환에 대한 방어(protective) T 세포로서 낮은 활성 및 매우 제한된 수명을 가지며, 궁극적으로 분화되는 T 세포들인 거의 독점적인 소위 작동체(effector) 발현형이다(Seder R, et al. 2008). 이는 결핵 재활성화로부터 보호하기 위해 본 연구에서 주장되는 백신에 의하여 촉진되는 고품질, 소위 다기능성 (polyfunctional) T 세포와는 현저하게 다른 것이다.
- [0023] 그것은 노출 후(post exposure) 백신으로서 유용한 고발현 면역원성 단백질들과는 거리가 먼데, 이는 다수가 과민 반응을 일으켜 상황을 악화시키기 때문이다. 이것은 Kock의 오리지널 투베르쿨린(tuberculin) 백신의 의학 시험에서 명백히 증명된 것이다. 상기 백신은 피부 및 폐 결핵을 포함하는 다양한 형태의 질병으로부터 고통받는 환자들에게 노출 후 백신으로서 처치되었다. 이 시험은 완벽한 실패였으며 기록된 환자들 중 몇몇은 심각한 과민 반응때문에 사망하였다((Guttstadt A. 1891). 1차 감염 동안 발현하는 것으로 알려지고 백신으로서 시험된 수백 개의 항원들 중 6개 미만이 중요한 후보로 증명되었다. 지금까지 오직 하나의 항원이 노출 후 백신으로서 잠재성을 갖는 것으로 나타났다(Lowrie, 1999). 그러나 이 백신은 지금까지 인간에 사용하기에는 승인되지 않은 실험 기술인 DNA 백신으로서 처리할 때 오직 작동했다. 게다가 이 기술은 이 프로토콜을 이용하는 백신 접종이 비특이적 보호 또는 심지어 질병 악화를 유도한다고 주장하는 다른 그룹들과 논쟁이 있는 것으로 알려졌다 (Turner, 2000).
- [0025] 그러므로 질병의 재활성화로부터 감염된 대상을 보호하기 위한, 효과적인 노출 후 백신 접종 전략이 강하게 요구된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0026] (비특허문헌 0001) Andersen, P. 2007 15(1), 7-13
- (비특허문헌 0002) Anon. 2001. Global Tuberculosis Control. WHO Report.
- (비특허문헌 0003) Arend, SM., Infect Immun. 2000 68(6): 3314-3321.
- (비특허문헌 0004) Brodin, P. et al. Infect Immun. 2006, 74, 88-98
- (비특허문헌 0005) Cote-Sierra J, et al 1998, Gene Oct 9;221(1):25-34
- (비특허문헌 0006) Doherty TM et al., 2002, J Clin Microbiol. Feb;40(2):704-6.
- (비특허문헌 0007) Gao LY et al 2004, Molecular Microbiology 1677-93
- (비특허문헌 0008) Gosselin et al., 1992. J. Immunol. 149: 3477-3481
- (비특허문헌 0009) Guinn Kl et al, 2004, Mol Microbiol. 51, 359-70
- (비특허문헌 0010) Guttstadt, A 1891. Die Wirksamkeit des Koch'schen Heilmittels gegen Tuberculosis, Polykliniken und Pathologisch/Anatomischen Institute der Preussischen Universitäten. Springer, Berlin.
- (비특허문헌 0011) Harboe, M., et al 1998 Infect. Immun. 66:2; 717-723

- (비특허문헌 0012) Hougardy et al 2007, PLoS ONE. Oct 3;2(10):e926
- (비특허문헌 0013) Kilgus J et al, J Immunol. 1991 Jan 1 ;146(1):307-15
- (비특허문헌 0014) Leyten EM. Et al. Microbes Infect. 2006 8(8):2052-60.
- (비특허문헌 0015) Lin MYand Ottenhoff TH, Biol. Chem. 2008, 389 (5): 497-511
- (비특허문헌 0016) Lowrie, D.B. et al 1999, Nature 400: 269-71
- (비특허문헌 0017) Lustig et al 1976, Cell Immunol 24(1):164-7
- (비특허문헌 0018) MacGurn JA et al. Mol Microbiol. 2005, 57:1653-63
- (비특허문헌 0019) Merrifield, R. B. Fed. Proc. Am. Soc. Ex. Biol. 21: 412, 1962 and J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963
- (비특허문헌 0020) Mowat et al 1991 , Immunology 72(3):317-22
- (비특허문헌 0021) Mustafa, AS et al. 2000, Clin. Infect. Dis. 30 (suppl. 3) S201-S205
- (비특허문헌 0022) Nagai et al 1991, Infect. Immun 59:1 ; 372-382
- (비특허문헌 0023) Olsen AW et al, Eur J Immunol. 2000 Jun; 30(6):1724-32
- (비특허문헌 0024) Pym AS et al Nat Med 2003, 9, 533-9;
- (비특허문헌 0025) Pearson, WR. et al. 1988. Proc Natl Acad Sci U S A 1 85, 2444-2448.
- (비특허문헌 0026) Raghavan, S. et al. 2008, Nature 454, 717-721
- (비특허문헌 0027) Ravn, P. et al 1999. J.Infect.Dis. 179:637-645
- (비특허문헌 0028) Rolph, MS, and I. A. Ramshaw. 1997. Curr.Opin.Immunol.9:517-24
- (비특허문헌 0029) Rogerson, BJ et al Immunology 2006, 118, 195-201 Rosenkrands, I., et al 1998, Infect, Immun 66:6; 2728-2735
- (비특허문헌 0030) Ruhwald M. et a/ 2008 PLoS ONE. Aug 6;3(8):e2858
- (비특허문헌 0031) Sambrook et al Molecular Cloning; A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1989
- (비특허문헌 0032) Seder, Nat. Rev. Immunol. 2008;8(4):247-58
- (비특허문헌 0033) Sinigaglia F et al. Nature 1988 Dec 22-29;336(6201):778-80
- (비특허문헌 0034) Skj ø t, RLV., et a/ 2000, Infect, Immun 68:1; 214-220
- (비특허문헌 0035) Smith J. et al. 2008, Infect Immun 76, 5478-87
- (비특허문헌 0036) Stanley, SA et al. 2003 Proc Natl Acad. Sci USA 100:12420-5
- (비특허문헌 0037) Stryhn. A., et al 1996 Eur. J. Immunol. 26:1911-1918
- (비특허문헌 0038) Turner, OC ef a/ 2000 Infect Immun. 68:6:3674-9.
- (비특허문헌 0039) Talaat AM et al. 2007, J of Bact 189, 4265-74
- (비특허문헌 0040) Thompson J., et al Nucleic Acids Res 1994 22:4673-4680
- (비특허문헌 0041) Ulmer J. B et al 1993, Curr. Opin. Invest. Drugs 2(9): 983-989
- (비특허문헌 0042) van Pinxteren LA et al. 2000. Eur. J. Immunol. 30: 3689-98.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0027] 본 발명은 결핵 복합체 미생물들(결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), *M. 보비스*(*M. bovis*), *M. 아프리카눔*(*M. africanum*))의 종에 의하여 야기되는 잠복 결핵 감염의 재활성화를 예방하기 위하여 잠복감염된 대상에게 투약할 수 있는 백신을 개시한다.

과제의 해결 수단

[0028] 본 발명은 ESAT6, CFP10 및 ESX-1 분비 시스템 결핵 유래의 다른 항원들과 같이 본질적으로 발현된 항원들을 타겟으로 함으로써, 결핵 복합체 미생물들(결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), *M. 보비스*(*M. bovis*), *M. 아프리카눔*(*M. africanum*))의 종에 의하여 야기되는 잠복 결핵 감염의 재활성화를 예방하기 위하여 잠복감염된 대상에게 투약할 수 있는 백신을 개시한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 결핵 복합체 미생물(결핵균, *M. 보비스*, *M. 아프리카눔*)의 종에 의하여 야기되는 잠복 결핵 감염의 재활성화를 예방하기 위하여, 모두가 상호의존적으로 분비가 요구되고 발병에 필수적인 것으로 알려진 ESX-1 분비 시스템에 모두 속하는 ESAT6, CFP10 및 EspA. ESAT6, CFP10 및 EspA과 같이 항시 발현되는 항원들을 목표로 함으로써, 잠복 감염된 대상에 투약되는 백신에 의하여 결핵 복합체(결핵균, *M. 보비스*, *M. 아프리카눔*)의 종에 의하여 야기되는 감염을 치료하는 것에 대한 것이다. 이들 분비된 항원들은 박테리아 전염(dessemination) 및 세포막 용균에 결정적이다. 예컨대, Ag85의 발현이 감염 후 곧 하향조절되는 것에 반하여, ESAT6, CFP10 및 EspA은 또한 질병의 서로 다른 단계에서 항시 발현되는 항원들이다. 놀랍게도 면역원성 항시 발현되는 항원들은 노출 후 백신으로서 투약되는 경우 감염 잠복을 유지함으로써 잠복 결핵 감염의 재활성화를 예방한다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1: *M. 튜버쿨로시스* 감염 과정은 본질적으로 3 기(phase)를 통하여 진행된다.

도 2: 재활성화를 예방하기 위한 노출후 백신 접종 모델.

도 3: TB 백신 접종 모델.

노출후 백신의 시험을 위하여 SSI에서 사용한 모델의 도식적인 개요. 마우스들은 에어로졸 경로에 의하여 병독성 *M. tb*로 감염된다. 감염 후 6주부터 12주까지 마우스들은 잠복 TB 상태를 확립시키기 위하여 항생제로 처리된다. 마우스들은 3 주 간격으로 2에서 3회 백신 접종되는데, 이는 노출후 백신 후보들로 감염된 지 10주 후에 시작한다. 이 마우스들은 질병을 재활성화시키도록 시간이 허용되고, 대략 20주 후, 백신의 보호 효험(protective efficacy)을 평가하기 위하여 폐들을 박테리아 수를 평가한다.

도 4: Ag85가 아닌 ESAT6에 의하여 보호가 유도되는 노출후 백신

마우스들은 실시예 1의 도식적인 개요에 따라 감염되고, 치료되며 백신접종되었다. 마우스들은 감염 후 30-40주 사이에 희생시켰으며, 이 시점에서 폐들이 박테리아 부하(load)가 평가되거나(도 A, C-E), ESAT6에 대한 감염 전반에 걸쳐, 박테리아 부하가 몇몇 시점에서 결정된 도 4B에 기재되어 있듯이 평가되었다. (A 및 B) 대조군 동물에 비교한 ESAT6 백신 접종된 박테리아 부하. (C) 대조군 동물에 비교한 Ag85B 백신 접종된 박테리아 부하. (D) Ag85B 백신접종된 군 및 대조군 동물에 모두 비교한 백신접종된 ESAT-6 펩믹스(pepmix)(전장 ESAT6 서열을 커버하는 오버랩핑 펩타이드들의 풀(pool))의 박테리아 부하. (E) 재활성화에 대한 보호로, 그 다음에 Ag85B-ESAT-6 (H1)의 노출후 백신접종을 하는데, 이는 비-백신접종된 대조군 마우스에 비교하여 백신접종된 것이다. 도 4A, C-E의 모든 데이터는 평균이 함께 그려진, 각각 대상 동물을 나타내는 도트 플롯(dot plots)으로 개시되며, 반면 도 4B는 평균±평균의 표준 에러(standard error of the mean (SEM))로 개시되며, 6 대상 동물들을 나타낸다(B). 모든 통계적인 분석은 짝지워지지 않은 t-테스트(도 A-C 및 E) 또는 p<0.05가 중요하게 고려되는 Turkey의 다중 비교 시험(Tukey's multiple comparison test)(도 D)을 이용하여 수행되었다.

도 5: ESAT-6 노출후 백신 접종은 다기능성(polyfunctional) T 세포를 유도한다.

비-백신접종되거나 또는 ESAT-6 백신접종된 동물의 감염된 폐의 세포들이 항-CD4, -CD8, -IFN- γ , -TNF- α 및 -IL-2로 염색되기(staining) 전에 ESAT-6로 인 비트로에서 자극되었다. (A 및 B)사이토카인 프로파일들은 CD4 T 세포들을 IFN- γ 양성(+) 또는 IFN- γ 음성(-)세포들로 먼저 나눔으로써 결정되었다. IFN- γ + 및 IFN- γ - 세포

들은 모두 TNF- α 및 IL-2의 생산과 관련하여 분석되었다. 원 그래프(A 및 B)는 사이토카인 생산 프로파일에 따라 색깔로 부호처리되고, 주어진 사이토카인 생산 프로파일에 양성인 CD4+ T 세포 반응(ESAT-6 특이적 CD4 T 세포 밖으로)의 부분들(fractions)을 요약하였다. (C) 사이토카인들의 모든 가능한 조합이 막대 그래프의 x축 상에 나타나 있으며, 사이토카인들의 임의의 조합을 발현하는 ESAT-6 백신접종된 마우스(검은 막대) 또는 비-백신접종된 마우스((회색 막대) 내 ESAT-6 특이적 CD4+ T 세포들의 퍼센트는 각각 면역화 그룹으로 주어졌다. (D) 잠복 감염된 마우스들은 ESAT-6로 2 회 백신 면역되고, 마지막 백신 면역 후 20주에, 보호 효험을 결정하기 위하여 폐들이 박테리아 수를 위하여 평가되었다(**p<0.01, One way ANOVA Tukey's 다중 비교 시험).

도 6: 모든 노출후 실험의 풀 분석(pooled analysis)

ESAT6, Rv3871, Ag85B, Rv3905, Rv3445, Rv0569 또는 Rv2031c(도 A), Ag85B-ESAT6 (H1) 또는 Ag85B-ESAT6-Rv2660 (H56)(도 B)가 노출후 백신 접종에 사용된 대상 실험을 위하여, 항원 보강제(adjuvant) 대조군의 박테리아 부하의 중앙값(median)이, 전술한 항원 중 하나로 백신 면역된 백신 면역 군의 각각의 대상 마우스의 박테리아 부하와 비교되었다. 도 A 및 B에서, 각각의 도트는 보호 수준, 즉, 항원 보강제 대조군에 비교하여 백신 접종에 의하여 부여된 ΔLog_{10} CFU에 해당하고, 몇몇의 비의존적 실험으로 구성된다. (A) 단일 항원 ESAT6, Rv3871, Ag85B, Rv3905, Rv3445, Rv0569 또는 Rv2031c를 위하거나 (B) 또는 ESAT 단독에 비교한 하이브리드 항원 H1 및 H56을 위한 Log_{10} 보호. Kruskal Wallis 다중 비교 시험을 이용하여 서로 다른 군들 간의 중앙값 비교를 위하여 통계적 분석을 적용하였다. p<0.05가 중요하게 고려되었다.

도 7: ESAT6 및 대조군 동물에 비교한 Rv3871로 노출후 백신 접종의 효과.

마우스들은 감염되고, 치료되고, 감염 후 10, 13 및 18 주에 백신 면역되었다. 감염 후 36주에 마우스들을 끝내고, 백신 면역된 마우스 및 비-백신 면역된 식염수 대조군 마우스 양쪽으로부터의 폐 림프구들이, Rv3871(도 7A) 또는 ESAT6(도 7B)로 인 비트로로 재자극되었다. ELISA 에 의하여 평가된 IFN- γ 방출 및 샘플들이 3회에 걸쳐 수행되었다. 데이터들은 평균 \pm SEM으로 나타내었다. 백신들에 의하여 부여된 보호 효험은, 전체 폐-균질현탁액(homogenate)으로부터 배양된 폐의 박테리아를 셴으로써, 결정되었다(n=16-18). 도트 플롯으로 나타낸 데이터로, 각각의 도트는 대상 동물을 가리키며, 중앙값으로 나타낸다(빨간 선).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명은 잠복 감염된 대상에 노출 후(post-exposure) 투여되며, M. 튜버쿨로시스의 감염 동안 항시 발현되는 항원 또는 상기 항원을 코드하는 핵산을 포함하는 결핵 재활성화를 예방하는 백신 또는 면역원성 조성물을 개시한다.
- [0032] 바람직하게는 상기 조성물은 ESX-1 분비 시스템에 속하며 항시 발현되는 항원들인 ESAT6 (서열번호 1), CFP10 (서열번호 2), EspA (서열번호 3), Rv3614c (서열번호 4), Rv3615c (서열번호 5), EspR (서열번호 6), Rv3868 (서열번호 7) Rv3869 (서열번호 8), Rv3870 (서열번호 9), Rv3871 (서열번호 10), Rv3872 (서열번호 11), Rv3873 (서열번호 12), Rv3876 (서열번호 13), Rv3877 (서열번호 14), Rv3878 (서열번호 15), Rv3879c (서열번호 16), Rv3880c (서열번호 17), Rv3881c (서열번호 18), Rv3882c (서열번호 32), Rv3883c (서열번호 33), Rv3865c (서열번호 34), 또는 예컨대 T 세포 에피토프인 이들 서열들 중 어느 하나의 면역원성 부위, 또는 이들 서열들 중 어느 하나와 적어도 70%의 서열 일치성을 갖고 동시에 면역원성인 아미노산 서열 상동체(analogue)를 포함한다.
- [0033] 또는, 상기 조성물은 바람직하게는 서열 번호 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 및 31로 구성되는 군으로부터 선택되는 면역원성 부위의 혼합물을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 또다른 예는 상기 폴리펩타이드가 마이코박테리아 과(family)의 박테리아에 의하여 발현되는 항원과 융합하는(fuse) 조성물이며, 이때 바람직하게는 융합 파트너는 항시 발현되는 항원이다. 바람직한 융합 단백질은 CFP10에 융합된 ESAT6를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 바람직하게는 마이코박테리아 유전자를 발현하는 바이러스 또는 박테리아와 같은 유전자-변형된 생물인 생(live) 제조법 백신 중에서 선택되는 추가적인 전달 시스템, 또는 상기 전술한 단백질의 유전자 또는 유전자 단편을 발현하는 플라스미드인 DNA 백신, 또는 항원 보강제(adjuvant)와 같은 전달 시스템에서 전달되는 단백질 자체 또는 단백질 자체로부터 유도되는 합성 펩타이드인 단백질 백신과 같은 면역원성 전달 시스템을 포함한다. 항원 보강제는 바람직하게는 디메틸디옥타디시암모늄 브로마이드(dimethyl-di-

octadecylammonium bromide (DDA)), 퀴일 A(Quil A), 폴리 I:C(poly I:C), 알루미늄 하이드록사이드(aluminium hydroxide), 프로인트 불완전 항원보강제(Freund's in-complete adjuvant), IFN- γ , IL-2, IL-12, 모노포스포릴 리피드 A(monophosphoryl lipid A (MPL)), 트레홀로스 디마이코레이트(Treholose Dimycolate (TDM)), 트레할로스 디베헤네이트(Trehalose Dibehenate) 및 무라밀 디펩타이드(muramyl dipeptide (MDP))로 구성되는 군으로부터 선택되며, 가장 바람직하게는 DDA/TDB 및 IC31과 같이 다기능성(polyfunctional) T 세포 반응을 촉진하는 항원 보강제이다. 가장 바람직한 항원 보강제는 DDA/TDB 및/또는 폴리 I:C를 포함한다. 또는 상기 아미노산 서열은 폴리펩타이드가 자체-항원보강 효과를 갖도록 지질화(lipidate)된다.

[0038] 본 발명은 또한 잠복 결핵의 치료 및 감염의 재활성화 예방 용도를 위하여 상기 기재된 항원들을 개시한다.

[0040] 예컨대 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*Mycobacterium africanum*) 또는 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*)인 병독성 마이코박테리아에 의하여 야기되는 결핵 감염의 재활성화에 대한, 인간을 포함하는 동물의 치료 방법은 전술한 백신 또는 면역원성 조성물을 동물에 투여하는 단계를 포함하는데, 상기 백신 또는 면역원성 조성물은, 급성기 감염 동안 또는 그 이후 및/또는 잠복기 감염 동안과 같이, 감염 후에 투여한다.

[0042] 이 방법은 항시 발현된 항원으로 자극한 후 IP10의 검출, HBHA에 대한 반응의 인 비트로 검출, 퀴안티페론(Quantiferon) 검사 또는 망뚜(Mantoux) 투베르쿨린 피부 테스트(TST)와 같은 진단 절차에 의하여 병독성 마이코박테리아에 의하여 잠복 감염된 개체를 확인하는 단계를 포함한다.

[0043] 본 발명은 또한, 예컨대 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), M.보비스(*M. bovis*) 및 M.아프리카눔(*M. africanum*)인 결핵 복합체 중에 의하여 야기되는 잠복 감염의 재활성화에 대한 노출 후(postexposure) 백신 또는 면역원성 조성물의 제조를 위한, 전술한 항원의 용도를 개시하는데, 상기 백신 또는 면역원성 조성물은 전술한 바와 같이 하나 또는 그 이상의 면역원성 부위를 포함하며, 급성기 감염 동안 또는 그 이후 및/또는 잠복기 동안과 같은 감염 후 투여를 위한 것이다.

[0045] 마이코박테리아의 병원체로서의 성공은 그것이 그것의 숙주와 상호작용하는 복잡하고 정교한 방식-분화된 ESX-1 박테리아 단백질-분비 시스템에 의하여 부분적으로 통제되는 방법-때문이다. 이 ESX-1 시스템은 박테리아 단백질(예컨대, ESAT-6, CFP10 및 EspA)을 숙주 세포로 전달하며 그것은 병독성에 결정적이다. 간균(bacilli)으로부터 분비된 후, ESAT-6 단백질은 포식소체 막(phagosomal membrane) 내에 구멍(pore)을 형성하여, 간균이 포식소체 내 그것의 봉쇄로부터 세포질로 피할 수 있도록 하며, 이로써 그것은 세포에서 세포로 퍼지는 것을 촉진한다.

[0047] 구조적인 발현 패턴은 이들 분자가 병원체에게는 결정적으로 중요한 필수 기능, 병원체가 면역 숙주 내에서 생존하기 위하여 항시 발현될 필요가 있는 유전자들에 의존하는 기능을 수행하는 것을 설명하는 중요한 특징이다. 이들 분자들은 본 발명의 기초이며, 이들이 박테리아 생활 양식의 모든 단계를 목표로 하고, 그러므로 활성을 위한 가장 넓은 가능한 성분(basis)을 갖고 있기 때문에 잠복 감염된 대상에 투여하기 위한 백신에서는 특히 중요한 항원들이다.

[0048] ESAT6, CFP10 및 EspA은 모두 분비에 요구되며, 이들은 모두 병독성에 필수적인 것으로 알려진 ESX-1 분비 시스템에 속한다. 이들 분비된 항원들은 박테리아 전염(dessemination) 및 세포막 용균(lysis)에 결정적이다. 예컨대, Ag85의 발현이 감염 후 곧 하향조절되는 것에 반하여, ESAT6, CFP10 및 EspA은 또한 질병의 서로 다른 단계에서 항시 발현되는 항원들이다. 면역원성 항시 발현되는 항원들은 치료적 백신으로서 투여 시 감염 잠복을 유지함으로써 잠복 결핵 감염의 재활성화를 예방한다.

[0049] 정의

[0051] 다기능성 T 세포

[0052] 용어에 의하여 다기능성(polyfunctional) T 세포는 IFN- γ , IL-2, 및 TNF- α 또는 IL-2의 모든 사이토카인과 IFN- γ 및 TNF- α 의 두 다른 사이토카인 중 적어도 하나를 동시에 발현시키는 T 세포로 이해된다.

[0054] 폴리펩타이드

[0055] 본 발명에서 "폴리펩타이드"라는 단어는 그것의 보통의 의미를 갖는다. 그것은 아미노산 잔기가 공유 펩타이드 결합으로 연결된 전장 단백질, 올리고 펩타이드, 짧은 펩타이드 및 그것의 단편을 포함하는 임의의 길이의 아미노산 사슬이다.

[0057] 폴리펩타이드는 글리코실화되거나, (예컨대, Mowat 등 1991에 기재된 바와 같이 팔미토일록시 숙시니마이드 (palmitoyloxy succinimide)나 Lustig 등 1976에 기재된 바와 같이 도데카노일 클로라이드(dodecanoyl chloride)로 화학적 지질화에 의하여) 지질화(lipidate)되거나, 인공 군을 포함하거나, 또는 예컨대 his-태그 또는 시그널 펩타이드와 같은 추가적인 아미노산을 포함함으로써 화학적으로 변형될 수 있다.

[0059] 그러므로 각각의 폴리펩타이드는 특정 아미노산으로 특징되며, 특정 핵산 서열에 의하여 코드된다. 이러한 서열들은 재조합 또는 합성 방법에 의하여 생산된 변이체(variant)들 및 상동체(analogue)들을 포함하며, 이러한 폴리펩타이드 서열들은 재조합 폴리펩타이드 내 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 치환, 삽입(insertion), 추가(addition) 또는 결실에 의하여 변형되며 여기에 기재된 임의의 생물학적 시험에서 여전히 면역원성을 갖는 것으로 이해된다. 치환은 바람직하게는 "보존적"이다. 이들은 하기 표 1에 의하여 정의된다. 두 번째 칼럼의 동일 블록 및 바람직하게는 세 번째 칼럼의 동일 행의 아미노산들은 서로 치환될 수 있다. 세 번째 칼럼의 아미노산들은 1 글자 기호로 나타낸다.

표 1

[0061]

지방족	비극성	GAP
		ILV
	극성-하전되지않은(uncharged)	CSTM
		NQ
	극성-하전된(charged)	DE
		KR
방향족		HFVY

[0063] 본 발명에서 바람직한 폴리펩타이드는 생물이 잠복 감염과 관련된 스트레스에 처했을 때 생산되는 M. 튜버쿨로시스 유래의 면역원성 항원이다. 이러한 항원은 예컨대 M. 튜버쿨로시스 세포 및/또는 M. 튜버쿨로시스 배양 여과물로부터 유래할 수 있다. 그러므로 상기 항원들 중 하나의 면역원성 부위를 포함하는 폴리펩타이드는 면역원성 부위만으로 구성될 수도 있고, 추가적인 서열을 포함할 수도 있다. 추가적인 서열은 원래의 M. 튜버쿨로시스 항원으로부터 유래할 수도 있으며, 이종 기원일 수도 있고(heterologous), 이러한 서열들은 면역원성일 수도 있으나 꼭 그럴 필요는 없다.

[0065] 각각의 폴리펩타이드는 특정 핵산 서열에 의하여 코드된다. 이러한 서열들은 그것의 변이체 및 상동체를 포함하며, 이러한 핵산 서열들은 하나 또는 그 이상의 핵산의 치환, 삽입, 추가 또는 결실에 의하여 변형된 것으로 이해될 수 있다. 치환은 바람직하게는 아미노산 서열에는 아무런 변화를 일으키지 않으나, 단백질 발현을 강화시키도록 도입될 수 있는 코돈 선호도(codon usage) 내 침묵 치환이다.

- [0067] 본 문맥에서 용어 "실질적으로 순수한 폴리펩타이드 단편"은 그것이 본래 결합된(associated) 다른 폴리펩타이드 물질을 많아야 5 중량% 포함하는 폴리펩타이드 제조를 의미한다(다른 폴리펩타이드 물질은 낮은 퍼센트, 예컨대, 많아야 4%, 많아야 3%, 많아야 2%, 많아야 1%, 및 많아야 1/2%인 것이 바람직하다). 실질적으로 순수한 폴리펩타이드는 적어도 96% 순수한 것, 즉, 폴리펩타이드가 적어도 96 중량%의 제조 시 존재하는 총 폴리펩타이드 물질로 구성되는 것이 바람직하며, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99,25%, 적어도 99,5%, 및 적어도 99,75%와 같은 더 높은 퍼센트가 바람직하다. 폴리펩타이드 단편이 "본질적으로 순수한 형태"인 것, 즉, 폴리펩타이드 단편이 그것이 본래 관련된 다른 항원이 본질적으로 없는, 즉, 결핵 복합체 또는 병독성 마이코박테리아에 속하는 박테리아 유래의 임의의 다른 항원이 없는 것이 특히 바람직하다. 이는 하기 자세히 기재한 대로 비(non)-마이코박테리아 숙주 세포 내 재조합 방법인 수단으로 폴리펩타이드 단편을 제조하거나, 또는 널리 알려진 고체 또는 액체상 펩타이드 합성 방법, 예컨대, 메리필드(Merrifield)가 기재한 방법이나 그 변형으로 폴리펩타이드 단편을 합성하여 달성할 수 있다. 본 발명의 목적에 있어서, 상기 "실질적으로 순수한 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 단편"의 정의는 마이코박테리아 또는 비-마이코박테리아 기원의 다른 정제되거나 합성된 항원들과 결합하여(in combination) 존재하는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 단편을 배제하는 것은 아니다.
- [0069] 용어에 의하여 "병독성 마이코박테리아"는 동물 또는 인간에게 결핵 병을 야기할 수 있는 박테리아로 이해된다. 병독성 마이코박테리아는 M. 튜버쿨로시스, M. 아프리카눔, 및 M. 보비스를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 적절한 동물의 예는 소, 주머니쥐(possum), 오소리(badger) 및 캥거루들이다.
- [0071] "감염된 대상"은 병독성 마이코박테리아에 의한 미시적으로 판명된 감염 또는 배양인 대상 및/또는 항-결핵 화학치료에 대하여 반응하고 결핵으로 임상에서 진단된 대상이다. 결핵의 임상적인 진단, 검경(microscopy) 및 배양은 당업자에게 널리 알려져 있다.
- [0073] 용어에 의하여, "PPD-양성 대상"은 PPD(정제된 단백질 유도체(purified protein derivative))가 IFN- γ 의 방출에 의하여 결정되는 양성 인 비트로 기억 반응(recall response)를 유도하는 대상 또는 망뚜 시험이 양성을 보인 대상으로 이해된다.
- [0075] "잠복 감염된 대상"은 병독성 마이코박테리아, 예컨대, M. 튜버쿨로시스에 감염되었으나 활동성 결핵의 징후를 보이지 않은 대상으로 이해된다. 백신 접종, 예컨대, BCG 접종된 대상이나 결핵 치료를 받은 대상은 PPD 반응성을 시험하면 이들은 양성일 것으로 예상되므로 비록 현재로서는 증명하는 것이 불가능 하지만, 이들의 체내에 마이코박테리아를 여전히 보유하고 있을 것으로 보인다. 그럼에도 불구하고, 가장 정확한 점에서, "잠복 감염된"은 그들의 조직 내에 M. 튜버쿨로시스가 존재하면서도 임상적으로 아프지는 않은 임의의 대상을 묘사하는데 사용된다. 잠복 감염된 대상은 망뚜 투베르쿨린 피부 테스트(Mantoux tuberculin skin test (TST)), 퀴티페론(Quantiferon) 시험과 같은 오늘날 임상적으로 이용되는 많은 방법에 의하여 확인될 수 있으며, 앞으로는 최근 제안된 HBHA(Hougardy 2007)에 대한 반응의 인 비트로 검출 또는 ESAT6에 의한 인 비트로 자극 후 IP10의 검출(Ruhwald 2008)과 같은 감염의 특정 단계를 진단하는 더욱 민감한 수단들이 있을 것이다.
- [0077] 용어에 의하여 "재활성화"는 비복제 박테리아(그것들이 세포 내 위치하기 때문에 면역 시스템이 이를 감지하기는 매우 어려울 수 있다)과 면역 숙주 내에서 마주치는 적대적인 환경에 적응하기 위한 시도에서 활동적이거나 변화된 발현 프로파일(profile)을 갖는 천천히 복제하는(slowly replicating) 박테리아 사이의 균형이 병원체 측으로 기울어져, 박테리아가 다시 급격히 복제하기 시작하고 감염된 대상 내 박테리아의 수가 증가하는 단계로 감염이 진행되는 상황으로 이해된다. 매우 강한 면역 압력 하 잠복 감염된 대상 내 이들 박테리아는 본 발명의 백신 접종 전략의 목표이다.
- [0079] 용어에 의하여 "IFN- γ "는 인터페론-감마로 이해된다. IFN- γ 의 측정은 면역 반응의 징후로 사용된다.

[0081] 용어에 의하여 "핵산 단편" 및 "핵산 서열"은 DNA, RNA, LNA (locked nucleic acids), PNA, RNA, dsRNA 및 RNA-DNA-하이브리드를 포함하는 임의의 핵산 분자로 이해된다. 비-자연적으로 발생하는 뉴클레오시드 (nucleoside)를 포함하는 핵산 분자 또한 포함된다. 용어는 용도에 의존적인 임의의 길이, 예컨대 10부터 10000 뉴클레오티드까지의 핵산 분자들을 포함한다. 핵산 분자가 약학적, 예컨대 DNA 치료로 사용되거나 본 발명에 의하여 폴리펩타이드의 생산 방법에 사용되는 경우, 바람직하게는 약 18에서 약 1000 뉴클레오타이드의 길이를 갖고, 선택적으로 벡터에 삽입되며, 적어도 하나의 에피토프를 코딩하는 분자가 이용된다.

[0083] 이 명세서에서, 문맥이 다르게 요구하지 않는 한, "포함한다"는 단어 또는 "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 그것의 변형은 언급한 구성 요소, 또는 전체(integer) 또는 구성 요소 또는 전체의 균을 함유하는 것을 의미하며, 임의의 다른 구성 요소, 전체 또는 구성요소 또는 전체의 균을 배제하는 것이 아니다.

[0085] 항상 발현되는 유전자들은 폐에서의 결핵균 CFU 수와 서로 관련된 후, 감염 3주 후 이후의 시점에서, 군 수준 (population level)에서 mRNA의 자세한 분석 후, 폐에서 in vivo로 동등하게 잘 발현되는 유전자들이다. 이러한 정의로부터, 구조적 유전자들은 하나의 박테리아 레벨에서는 다르게 발현될 수 있다. 유전자 발현을 정량화하는 방법은 정량적 PCR(quantitate PCR)이다. "동등하게 잘"은 전의 측정으로부터 +/- 5 배 내인 것으로 정의된다. 비교는 항상 현재의 바로 전의 시점과 한다. 측정들 간의 시간은 감염 및 전의 측정 간의 시간보다 길 수 없는데, 즉(e.c), 만약 유전자 발현이 감염 후 3주에 최초로 측정되었다면, 두 번째 측정은 감염 후 6주보다 늦게 될 수 없고, 세 번째는 감염 후 12 주보다 늦을 수 없는 등이다.

[0086] 항상 발현하는 항원들은 항상 발현하는 유전자들의 산물인 폴리펩타이드 또는 이들 폴리펩타이드들의 부분이다.

[0087] **서열 일치성**

[0088] "서열 일치성(sequence identity)"이라는 용어는 동일한 길이의 두 뉴클레오티드 서열 간 또는 동일한 길이의 두 아미노산 서열 간의 상동성(homology)의 정도를 정량적으로 측정된 것을 가리킨다. 비교될 두 서열은 단백질 서열의 말단에서 간격(gap)의 삽입 또는 대체적으로는, 절단(truncation)을 허용하는 가능한 최적의 적합 상태로 정렬되어야 한다. 서열 일치성은 $\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$ 로 계산될 수 있으며, 이때 N_{dif}는 정렬될 때 두 서열의 비-일치성 잔기(non-identical residues)의 총 수이고, N_{ref}는 서열 중 하나의 잔기의 수이다. 그러므로 DNA 서열 AGTCAGTC는 서열 AATCAATC과 75%의 서열 일치성을 가질 것이다(N_{dif}=2 및 N_{ref}=8). 간격은 특정 잔기의 비특이성으로 산출되는데, 즉, DNA 서열 AGTGTC는 DNA 서열 AGTCAGTC과 75%의 서열 일치성을 가질 것이다((N_{dif}=2 및 N_{ref}=8). 서열 일치성은 대체적으로 BLAST 프로그램에 의하여 계산될 수 있는데, 예컨대, BLAST 프로그램 (Pearson, 1988, 또는 www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)이다. 본 발명의 한 관점에서, 정렬은 hompson J., et al/ 1994, available at <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>에 의하여 기재된 디폴트(default) 변수를 가지고 서열 정렬 방법 ClustalW에 의하여 수행된다.

[0090] 서열 일치성의 바람직한 최소의 퍼센트는 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 및 적어도 99.5%와 같이 적어도 80%이다.

[0092] **면역원성 부위**

[0093] 발명의 바람직한 예에 있어서, 폴리펩타이드는 B-세포 또는 T-세포의 에피토프와 같은 폴리펩타이드의 면역원성 부위를 포함한다. 폴리펩타이드의 면역원성 부위는 동물 또는 인간 및/또는 여기에 기재된 임의의 생물학적 검사(assay)에 의하여 결정되는 생물학적 샘플에서 면역 반응을 유도하는 폴리펩타이드의 부분이다. 폴리펩타이드의 면역 부위는 T-세포 에피토프 또는 B-세포 에피토프일 수 있다. 면역원성 부위들은 폴리펩타이드의 하나 또는 몇몇의 상대적으로 작은 부분들과 연결될 수 있으며, 그것들은 폴리펩타이드 서열 곳곳에 분산되어 있을 수도 있고, 폴리펩타이드의 특정 부분에 위치할 수도 있다. 몇몇 폴리펩타이드의 경우, 에피토프들이 폴리펩타이드를 커버하는 전장 서열 곳곳에 분산되어 있는 것이 증명되었다(Ravn et al 1999). 면역 반응 동안 인식되는

적절한 T-세포 에피토프를 확인하기 위하여, 예컨대 폴리펩타이드로부터 유래한 20 아미노산 잔기 길이를 갖는 MHC 클래스 II 에피토프의 검출을 위하여 올리고펩타이드 오버랩핑(overlapping)을 이용할 수 있다. 이들 펩타이드들은 생물학적인 검사(assay)에서 시험될 수 있고(예컨대, 여기에 기재된 IFN- γ 검사), 이들 중 일부는 펩타이드 내 T 세포 에피토프가 존재하는 증거로서, (그리고 이로써 면역원성인) 양성 반응을 준다. ESAT-6 및 CFP10의 경우 이러한 연구는 항원의 모든 부분이 T-세포 에피토프를 포함한다는 것을 보여주었다(Mustafa et al. 2000, Arend SM et al. 2000). MHC 클래스 I 에피토프의 검출을 위하여, 결합할 펩타이드들을 예측하고 (Stryhn et al. 1996), 이후에 이들 펩타이드를 합성적으로(synthetic) 생산하며, 예컨대, 여기에 기재한 바와 같이 IFN- γ 검사인 적절한 생물학적 검사에서 시험할 수 있다. 이 펩타이드들은 바람직하게는, 예컨대, 폴리펩타이드로부터 유래한 8-11 아미노산 잔기의 길이를 갖는다. B-세포 에피토프들은, 예컨대 Harboe et al 1998에 기재된 대로 관심있는 폴리펩타이드를 커버하는 오버랩핑(overlapping) 펩타이드들에 대한 B-세포 인식 분석에 의하여 결정될 수 있다. 이 정의와 일치하여, 여기에 기재된 폴리펩타이드의 면역원성 부위는 면역 반응을 유도하는 부위로서 확인될 수 있다:이하의 "면역 반응"의 정의 참조.

[0095] 비록 T-세포 에피토프의 최소 길이가 적어도 6 아미노산인 것으로 알려졌지만, 이러한 에피토프들은 아미노산들의 더 긴 스트레치들(stretches)로 구성되어 있는 것이 정상이다. 그러므로 본 발명의 폴리펩타이드 단편은 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 12, 적어도 14, 적어도 16, 적어도 18, 적어도 20, 적어도 22, 적어도 24, 및 적어도 30 아미노산 잔기와 같은, 적어도 7 아미노산 잔기의 길이를 갖는다. 그러므로, 본 발명 방법의 중요한 예에서, 폴리펩타이드 단편은 많아야 40, 35, 30, 25, 및 20 아미노산 잔기와 같이, 많아야 50 아미노산 잔기의 길이를 갖는 것이 바람직하다. 10 내지 20 아미노산 잔기 사이의 길이를 갖는 펩타이드가 MHC 클래스 II 에피토프로서 가장 효과적일 것으로 확인되고, 그러므로 본 발명 방법에서 사용되는 폴리펩타이드 단편의 특히 바람직한 길이는 15, 14, 13, 12 및 심지어 11 아미노산 잔기와 같은 18인 것으로 예상된다. 7 및 12 아미노산 잔기 사이의 길이를 갖는 펩타이드들이 MHC 클래스 I 에피토프로서 가장 효과적일 것으로 확인되고, 그러므로 본 발명 방법에서 사용되는 폴리펩타이드 단편의 특히 바람직한 길이는 10, 9, 8 및 심지어 7 아미노산 잔기와 같은 11일 것으로 예상된다.

[0097] 폴리펩타이드의 면역원성 부위들은 유전적으로 이종적인(heterogeneous) 인간 군(population)의 넓은 부분(높은 빈도) 또는 적은 부분(낮은 빈도)에 의하여 인식될 수 있다. 또한 일부 면역원성 부위들은 다른 것들이 낮지만 여전히 중요한 면역반응을 유도하는데 반하여(준우성(subdominant)), 높은 면역 반응(우성(dominant))을 유도한다. 높은 빈도><낮은 빈도는 넓게 분포한 MHC 분자(HLA 타입)에 결합한 면역원성 부위에 대하여 또는 다중(multiple) MHC 분자들에 의하여라도 관련있을 수 있다(Sini-gaglia, 1988, Kilgus, 1991).

[0099] 그러나 새 결핵 백신을 위한 후보 분자들을 준비하는 문맥에서, 준우성 에피토프들은 우성 에피토프만큼이나 관련이 있는데, 이는 이러한 에피토프들이 강하게 또는 광범위하게 인식되지 않는다는 사실에 관계없이, 이러한 에피토프들이 보호를 유도할 수 있다는 것이 알려졌기 때문이다(Olsen, 2000).

[0101] *변이체*

[0102] 본 발명의 폴리펩타이드들의 공통된 특징은 실시예에서 나타나듯이 면역 반응을 유도하는 그것들의 특성이다. 치환, 삽입, 추가 또는 결실에 의하여 생산되는 본 발명의 폴리펩타이드의 변이체는 여기에 기재된 임의의 검사에 의하여 결정되듯이 면역원성일 수 있는 것으로 이해된다.

[0104] *면역 대상*

[0105] 면역 대상(immune individual)은 병독성 마이코박테리아에 의한 감염이 깨끗하거나 통제되었거나, 또는 M.보비스 BCG 백신 접종과 같은 예방 백신 접종을 받은 사람 또는 동물로 정의된다.

[0107] *면역 반응*

- [0108] 면역 반응은 하기 방법들 중 하나에 의하여 모니터(monitor)될 수 있다.
- [0110] ● 인 비트로 세포 반응은 관련된 폴리펩타이드로 면역되거나 또는 병독성 마이크로박테리아로 전에 감염되거나 현재 감염된 인간 또는 동물로부터 회수한 림프구 내 증식을 유도하거나 또는 이로부터의 IFN- γ 와 같은 관련 사이토카인의 방출 유도에 의하여 결정된다. 웰 당 2×10^5 세포부터 4×10^5 세포까지 포함하는 부유액에 폴리펩타이드의 면역원성 부위 또는 폴리펩타이드를 첨가함으로써 상기 유도를 수행한다. 혈액, 비장, 간 또는 폐로부터 분리한 세포 및 ml 부유액 당 20 μ g을 넘지 않는 농도가 되는 폴리펩타이드 또는 면역원성 부위의 첨가 및 2-5 일간 수행되는 자극. 세포 증식의 모니터링을 위하여, 세포들은 방사성 표지된 티미딘(Thymidine)으로 펄스(pulse)되며, 배양 16-22시간 후 액체 섬광 계수법에 의하여 증식을 검출하였다. 양성 반응은 백그라운드+ 2 표준 편차보다 많은 반응인 것으로 정의한다. IFN- γ 의 방출은 당업계에 널리 알려진 ELISA 방법에 의하여 결정될 수 있다. 백그라운드+2 표준편차를 넘는 반응인 양성 반응. IL-12, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF- β 와 같이, IFN- γ 이 아닌 다른 사이토카인이 폴리펩타이드에 대한 면역 반응을 모니터링할 때 적절할 수 있다. 면역 반응을 검출하는 또 다른 그리고 더욱 민감한 방법은 ELISpot 방법으로, 이 때 세포를 생산하는 IFN- γ 의 빈도가 결정(determine)된다. IFN- γ 항체들(PharMingen)로 미리 코팅된 ELISpot 플레이트(MAHA, Millipore)에서, 각각 혈액, 비장 또는 폐로부터 분리된 선별된 수의 세포들(graded numbers of cells)이 폴리펩타이드 또는 면역원성 부위의 존재 하 24-32 시간 동안 배양되어(전형적으로는 $1 \sim 4 \times 10^5$ 세포/웰 사이이다), ml 당 20 μ g을 넘지 않는 농도가 된다. 플레이트는 그 다음, 비오틴화된(biotinylated) 항-IFN- γ 항원과 함께 배양되고, 그 후 스트렙타비딘-알칼라인 파스파타제(streptavidin-alkaline phosphatase) 배양을 한다. IFN- γ 생산 세포는 스팟(spot)을 일으키는 관련 기질(substrate)에 BCIP/NBT(Sigma)을 가하여 확인한다. 이들 스팟은 해부 현미경(dissection microscope)을 이용하여 셀 수 있다. 이것은 또한 PCR 기술을 이용하여 관련 사이토카인을 코딩하는 mRNA의 존재를 결정하는 가능성이기도 하다. 보통 하나 또는 그 이상의 사이토카인이 예컨대 PCR, ELISPOT 또는 ELISA를 이용하여 측정된다. 특정 폴리펩타이드에 의하여 유도되는 이들 중 임의의 사이토카인의 양의 중요한 증가 또는 감소가 폴리펩타이드의 면역 활성 평가에 이용될 수 있다는 것은 자명할 것이다.
- [0112] ● 인 비트로 세포 반응은 또한 M. 튜버쿨로시스-감염된 사람 또는 면역 대상으로부터 유래한 T 세포주를 이용하여 결정될 수 있는데, 상기 T 세포주는 살아있는 마이크로박테리아, 박테리아 세포의 추출물 또는 IL-2를 첨가하고 10-20일 된 배양여과액으로부터 유래한 것이다. 1×10^5 세포- 3×10^5 세포를 포함하는 T 세포주에 ml 부유액 당 20 μ g을 넘지 않는 폴리펩타이드를 첨가하여 수행하는 유도 및 2-6일 간 수행되는 배양. IFN- γ 의 유도 또는 다른 관련 사이토카인의 방출은 ELISA에 의하여 검출된다. T 세포의 자극은 또한 전술한 바와 같이 방사성 표지된 티미딘을 이용하여 세포 증식을 검출함으로써 모니터링될 수 있다. 양 검사를 위하여, 백그라운드+2 표준편차를 넘는 반응인 양성 반응.
- [0114] ● 인 비보 세포 반응은, 주사 또는 적용 후 72-96 시간 적어도 5mm의 지름을 갖는 양성 반응, 병독성 마이크로박테리아에 의하여 임상적으로(clinically) 또는 준임상적으로(subclinically) 감염된 대상에, 많아야 100 μ g의 면역원성 부위 또는 폴리펩타이드를 진피 주사 또는 국부 적용 패치 후 양성 DTH 반응으로서 결정될 수 있다.
- [0116] ● 인 비트로 체액성 반응은 면역 또는 감염된 대상 내 특정 항원 반응에 의하여 결정된다. 항원의 존재는 ELISA 기술 또는 웨스턴 블롯에 의하여 결정될 수 있으며, 폴리펩타이드 또는 면역원성 부위는 니트로셀룰로스 막 또는 폴리스티렌 표면에 흡수된다. 혈청은 바람직하게는 1:10부터 1:100까지 PBS에서 희석되며, 흡수된 폴리펩타이드에 첨가되며, 1-12 시간 동안 배양이 수행된다. 표지된 2차 항체를 이용하여, 특정 항체의 존재는 OD, 예컨대 ELISA에 의하여 결정될 수 있으며, 양성반응은 백그라운드+2 표준편차를 넘는 반응이거나, 또는 대체적으로 웨스턴 블롯에서의 가시적 반응이다.
- [0118] ● 또다른 관련된 변수는 항원 보강제 내 폴리펩타이드를 백신 접종한 후, 또는 DNA 백신 접종한 후 유도된 동

물 모델 내 보호의 측정이다. 적절한 동물 모델은 영장류, 기니피그, 쥐이며, 이들은 병독성 마이코박테리아의 감염에 의하여 시험감염(challenge)된다. 유도된 보호의 판독(readout)은 비-백신접종된 동물에 비교한 목표 기관 내 박테리아 부하(load)의 감소, 비-백신접종된 동물에 비교한 연장된 생존 기간 및 비-백신접종된 동물에 비교한 감소된 체중 감소일 수 있다.

[0120] 제조 방법

[0121] 일반적으로, M.튜버쿨로시스 항원, 및 이러한 항원을 코딩하는 DNA 서열은 다양한 절차들 중 임의의 것을 이용하여 제조할 수 있다.

[0122] 그것들은 전술한 바와 같이 절차에 의하여 배양 여과액 또는 M.튜버쿨로시스 세포로부터 원래(native) 단백질로서 정제될 수 있다. 면역원성 항원들은 항원을 코딩하는 DNA 서열을 이용하여 재조합형으로 생산될 수 있으며, 발현 벡터 내 도입되어, 적절한 숙주 내에서 발현된다. 숙주 세포의 예는 대장균이다. 그것의 폴리펩타이드 또는 면역원성 부위는 또한 약 100 아미노산보다 적게 합성적으로 생산될 수 있고, 50 아미노산보다 유전적으로 적게 아미노산들이 서열적으로 성장하는 아미노산 사슬에 가해지는 상업적으로 이용가능한 고체상 기술과 같은 당업계에 널리 알려진 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0124] DNA 백신 접종에서 정의된 폴리펩타이드를 코딩하는 플라스미드 DNA의 구조화(construction) 및 제조에서, 대장균과 같은 숙주 균주가 사용될 수 있다. 플라스미드 DNA는 관심있는 플라스미드를 운반하는 숙주 균주의 배양물로부터 제조할 수 있고, 예컨대, 엔도톡신 제거 단계를 포함하는 Qiagen Giga -Plasmid column kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA)를 이용하여 정제할 수 있다. DNA 백신 접종에 사용되는 플라스미드 DNA는 무-엔도톡신(endotoxin free)인 것이 바람직하다.

[0126] 융합 단백질

[0127] 면역원성 폴리펩타이드는 또한 융합 단백질일 수 있으며, 이로써 본 발명의 폴리펩타이드의 우수한 특성, 방법이 달성될 수 있다. 예를 들어, 재조합적으로 생산될 때 폴리펩타이드의 이출(export)를 촉진하는 융합 파트너들, 폴리펩타이드의 정제를 촉진하는 융합 파트너들, 및 본 발명의 폴리펩타이드 단편의 면역원성을 증강시키는 융합 파트너들이 모두 관심있는 가능성들이다. 그러므로, 본 발명은 또한 적어도 하나의 폴리펩타이드 또는 적어도 하나의 융합 파트너 및 상기 정의한 면역원성 부위를 포함하는 융합 파트너에 관련된다. 면역원성을 증진시키기 위하여, 융합 파트너는 ESAT-6, CFP10, EspA, TB10.4, RD1-ORF5, RD1-ORF2, Rv1036, MPB64, MPT64, Ag85A, Ag85B (MPT59), MPB59, Ag85C, 19kDa 리포프로틴 MPT32 및 알파-크리스탈린(alpha-crystallin), 또는 상기 언급된 항원들 중 임의의 것의 적어도 하나의 T-세포 에피토프(Skj Φ t et al 2000; W00179274; W00104151; US patent application 09/0505,739; Rosenkrands et al 1998; Nagai et al 1991)와 같은 결핵 복합체에 속하는 박테리아로부터 유래한 폴리펩타이드 단편과 같은 M.튜버쿨로시스 유래의 또다른 폴리펩타이드일 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 둘 또는 그 이상의 폴리펩타이드(또는 이들의 면역원성 부위)의 상호 융합(mutual fusion)을 포함하는 융합 폴리펩타이드에 관한 것이다. 산물의 면역원성을 증진시킬 수 있는 다른 융합 파트너들은 IFN- γ , IL-2 및 IL-12와 같은 림포카인(lymphokine)이다. 발현 및/또는 정제를 촉진시키기 위하여, 융합 파트너는 예컨대, 박테리아 섬모(fimbrial) 단백질, 예컨대, 섬모(pilus) 구성성분인 섬모소(pilin) 및 papA; 단백질 A; ZZ-펩타이드(ZZ-융합은 스웨덴의 Pharmacia에 의하여 판매됨); 말토스(maltose) 결합 단백질; 글루타티온 S-트랜스페라제, β -갈락토시다제; 또는 폴리-히스티딘일 수 있다. 융합 파트너들은 숙주 세포 내에서 재조합적으로 생산될 수 있고, 이는 대장균이 될 수 있으며, 이는 서로 다른 융합 파트너들 사이에 링커 영역을 유도하는 가능성이다.

[0129] 다른 관심있는 융합 파트너들은 지질화(lipidated)되어 면역 체계에 적합한 방식의 면역원성 폴리펩타이드가 존재하게 되는, 폴리펩타이드이다. 이러한 효과, 예컨대 WO 96/40718 A에 기재된 바와 같이 Borrelia burgdorferi OspA 폴리펩타이드에 기초한 백신 또는 Pseudomonas aeruginosa Opr1 lipoprotein (Cote-Sierra J 1998)에 기초한 백신으로 알려진 것이다. 또다른 가능성은 kdfuwls신호 서열 및 N-말단 시트신(cysteine)의 면역원성 폴리펩타이드에 대한 N-말단 융합이다. 이러한 융합은 적절한 생산 숙주 내에서 생산될 때, N-말단 시

스틴에서 면역원성 폴리펩타이드의 지질화에 재적합하다(resuit).

- [0131] 용도
- [0133] 백신
- [0134] 백신은 특정 질병에 대한 면역을 개선시키거나 확립하는 생물학적 조제품이다. 백신은 예방적(예컨대, 임의의 자연적 또는 "야생" 병균에 의하여 장래 감염된 효과를 예방하거나 개선시키기 위하여), 노출후(예컨대, 임상적 증상 없이 잠복 감염된 대상에서 재활성화를 예방하기 위하여) 또는 치료적(예컨대, 단독으로 치료를 단축하기 위하여 항생제 치료와 결합하여 또는 단독으로 활성 질병을 치료하기 위하여 사용되는 백신)일 수 있다.
- [0136] 잠복 결핵을 위한 동물 모델
- [0137] M.tb에 의한 낮은 수준의 잠복 감염을 유도하기 위하여, 정상 량(dose)의 M.tb(폐에 약 150 박테리아)를 이용하여 동물들을 처음에 에어로졸 감염시켰다. 감염 6 주 후, 동물들은 6주간 차선의 화학요법 치료를 받으며, 그 동안 대부분-그러나 모든 것은 아니다-의 박테리아들이 근절된다. 남아있는 박테리아는 잠복 감염으로 확립된다. 하기 화학요법 치료에서, 일부 동물들은 잠복 감염의 재활성화를 예방하는 백신 능력을 시험하기 위하여 백신 면역될 것이고, 그것은 화학요법 치료 후 5-15 주에 자연히 발생할 것이다. 도 2 참조.
- [0139] 단백질 백신
- [0140] 본 발명의 또다른 부분은 본 발명에 의한 융합 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드(또는 적어도 그것의 하나의 면역원성 부위)를 포함하는 백신 조성물에 대한 것이다. 이러한 백신 조성물의 최적의 수행을 확실히 하기 위하여, 그것은 면역적으로 약학적으로 적절한 담체, 비히클 또는 아쥘반트(adjuvant)를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0142] 본 발명의 폴리펩타이드가 동물에 의하여 인식되는 유효한 백신은 비-백신 접종된 동물에 비하여 병독성 마이크로 박테리아에 의하여 시험감염된 후 동물 모델 내에서 목표 기관 내 박테리아 부하의 감소, 생존 기간의 연장, 및 /또는 감소된 체중 감소를 일으킬 수 있다.
- [0144] 적절한 담체는 예컨대, 플라스틱, 폴리스티렌과 같은 폴리펩타이드가 소수성 비-공유 상호작용에 의하여 결합하는 폴리머, 또는 폴리사카라이드, 또는 폴리펩타이드, 예컨대 소혈청알부민, 오발부민 또는 keyhole limpet haemocyanin과 같은 폴리펩타이드가 공유적으로 결합하는 폴리머로 구성되는 균으로부터 선택된다. 아쥘반트(adjuvant)는 바람직하게는 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(di-methyldioctadecylammonium bromide)(DDA), 퀸 A(Quil A), 폴리 O:C(poly I:C), 알루미늄 하이드록사이드(aluminium hydroxide), 프로인트 불완전 아쥘반트(Freund's incomplete adjuvant), IFN- γ , IL-2, IL-12, 모노포스포릴 리피드 A(monophosphoryl lipid A (MPL)), 트레할로스 디마이코레이트(Tre-holose Dimycolate (TDM)), 트레할로스 디베헤네이트(Trehalose Dibeheenate) 및 무라밀 디펩타이드(muramyl dipeptide (MDP))로 구성되는 균으로부터 선택된다.
- [0146] 유효 성분으로 펩타이드 서열을 포함하는 백신의 제조는 일반적으로 당업계에 잘 알려져 있는데, 여기에 참조로 모두 포함되는 U.S. Patents 4,608,251 ; 4,601,903; 4,599,231 및 4,599,230가 좋은 예가 될 것이다.
- [0148] 백신의 항원 보강 효과(adjuvant effect)를 달성하기 위한 다른 방법들은 알루미늄 하이드록사이드 또는 인(alum), 당의 합성 폴리머(Carbopol), 열처리에 의한 백신 내 단백질의 응집, 백신 처리된(Fab) 항원의 알부민에 대한 재활성화에 의한 응집, 그람-음성 박테리아의 리포사카라이드 구성성분 또는 엔도톡신, 또는 C. 파르부름(C. parvum)과 같은 박테리아 세포의 혼합물, 만니드 모노올레이트(mannide monooleate)(Aracel A)와 같은 생

리적으로 수용가능한 오일 담체 내 에멀전, 또는 블록 대체제(block substitute)로 사용하는 퍼플루오로카본(perfluorocarbon)(Fluosol-DA)의 20 퍼센트 용액을 가진 에멀전과 같은 약품의 사용을 포함한다. 다른 가능성은 전술한 아주반트와 복합된 폴리 I:C와 같은 IFN- γ 유도체 또는 사이토카인과 같은 면역 조절 물질의 이용을 수반한다.

[0150] 항원 보강 효과를 달성하기 위한 또다른 흥미로운 가능성은 (여기 참조로서 포함된) Gosselin et al., 1992에 기재된 기술을 이용하는 것이다. 간략히 말하면, 본 발명의 항원과 같이 관련된 항원은 단핵구/대식세포 상 Fc γ 수용체에 대하여 항체(또는 항원 결합 항체 단편)와 콘주게이트(conjugate)될 수 있다.

[0152] 본 백신은 용량 공식(dosage formulation)에 양립가능한 방식이며, 재활성화를 예방하는데 효과적이고 면역원성인 용량으로 투여된다. 투여되는 양은 치료되는, 예컨대, 면역 반응을 시작하는(mount) 대상의 면역 시스템의 능력(capacity), 및 원하는 보호 정도를 포함하여, 개체(subject)에 의존적이다. 적절한 용량 범위는 약 1 μ g에서 300 μ g의 범위, 특히 약 10 μ g에서 50 μ g의 범위와 같은, 약 0.1 μ g에서 1000 μ g까지 바람직한 범위의 백신 접종 당 수백 마이크로그램의 유효 성분의 체계(order)이다. 초기 투여 및 추가 주사(booster shots)을 위한 적절한 요법(regimen)은 또한 다양하나, 초기 투여 후 이루어지는 접종 또는 다른 투여가 전형적이다.

[0154] 적용 방식은 널리 다양하다. 백신 투여를 위한 현행 방식 중 무엇이든 적용이 가능하다. 이들은 생리학적으로 허용가능한 분산(dispersion) 또는 고형(solid)인 생리학적으로 허용가능한 염의 경구 적용, 비경구적으로, 주사 또는 이와 유사한 것에 의한 것을 포함한다. 백신의 용량은 투여 경로에 의존적이며 되고, 백신 접종될 사람의 연령, 이보다 덜한 정도로는, 백신 접종될 사람의 크기에 따라 다양하게 된다.

[0156] 백신은 에컨대, 에어로졸, 흡입, 비경구적으로, 예를 들어 피하 또는 근육 내, 주사에 의하여, 전형적으로 (conventionally) 폐 내로 투여된다. 투여의 다른 방식을 위한 적절한 다른 제형은 좌약 및 일부 경우, 구강 제형을 포함한다. 좌약의 경우, 예를 들어, 폴리알칼렌 글리콜 또는 트리글리세라이드인 전통적인 결합체(binder) 및 담체들을 포함할 수 있는데, 이러한 좌약들은 유효 성분 0.5%에서 10%, 바람직하게는 1-2%의 범위로 포함하는 혼합물로부터 형성될 수 있다. 경구 제형은 에컨대, 약학적 품질(grade)인 만니톨, 락토우즈, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카보네이트 및 기타 동종의 것들인 정상적으로 이용된 부형제를 포함한다. 이들 조성물들은 용액, 부유액, 타블렛(tablet), 환약(pill), 캡슐, 지속되는 방출 제형 또는 산재(powder)의 형태를 취하며, 유리하게는 유효성분을 10-95%, 바람직하게는 25-70% 포함한다.

[0158] 많은 경우, 백신을 복수 투여(multiple administration)할 필요가 있을 것이다. 대상이 이미 감염되었거나, 감염되었다고 의심되는 경우, 종전의 백신 접종은 1차 질병을 예방하기에 충분한 면역을 제공하였을 수 있으나, 앞서 논의한 바와 같이, 이러한 면역 반응을 신장시키는(boost) 것은 잠복 감염에 대하여는 도움이 되지 않을 것이다. 이러한 상황에서, 본 백신은 필연적으로, 재부상하는(remerging) 결핵 감염 또는 감염의 잠복기에 대하여 유효하게 디자인된 노출후(postexposure) 백신이어야 한다.

[0160] 유전적 다양성 때문에, 많은 대상(individuals)들이 동일한 폴리펩타이드에 대해 다양한 길이의 면역 반응에 반응한다. 그러므로 본 발명에 따른 백신은 면역 반응을 증가시키기 위하여 몇몇의 서로 다른 폴리펩타이드들을 포함할 수 있다. 백신은 둘 또는 그 이상의 폴리펩타이드 또는 면역원성 부위를 포함할 수 있으며, 모든 폴리펩타이드들은 상기 기재한 바와 같고, 펩타이드들 중 일부는 아니나 일부는 병독성 마이코박테리아로부터 유래할 수 있다. 뒤의 예에서, 폴리펩타이드들에 대하여 앞에서 제시한 기준을 필연적으로 만족시키지 않는 폴리펩타이드들은, 그것들 고유의 면역원성 때문에 반응하거나 EH는 단순히 항원 보강제로서 반응할 수 있다.

[0162] 백신은 2-20과 같은 1-20, 또는 3-20의 서로 다른 폴리펩타이드, 또는 3-10의 서로 다른 폴리펩타이드들 또는 융합 폴리펩타이드와 같은 융합 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

- [0164] DNA 백신
- [0165] 본 발명의 핵산 단편들은 항원의 인 비보 발현을 가져오기 위하여 사용될 수 있는데, 즉, 핵산 단편은 참조로 포함된 Ulmer et al 1993 내에 리뷰된 소위 DNA 백신에 사용될 수 있다.
- [0167] 그러므로, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 단편을 포함하는 노출후(post exposure) 백신에 대한 것이며, 상기 백신은 백신이 투여되는 인간을 포함하는 동물에 의한 항원의 인비보 발현을 가져오고, 발현된 항원의 양은 인간을 포함하는 동물 내 병독성 마이크로박테리아에 의하여 야기되는 감염의 치료를 해주기 위하여 효과적이다.
- [0169] 이러한 DNA 백신의 효험은 아마도 면역 반응을 조절하는 능력을 갖는 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA 단편과 함께 발현 산물을 코딩하는 유전자를 투여함으로써 증강될 수 있을 것이다.
- [0171] 생 재조합 백신(live recombinant vaccines)
- [0172] 노출후 백신을 위하여 세포 면역 반응을 효과적으로 활성화시킬 하나의 가능성은, 바이러스 또는 비-병원성 미생물에서 백신 내 관련 항원을 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 이러한 미생물 중 잘 알려진 예가 마이코박테리움 보비스 BCG, 살모넬라(Salmonella) 및 슈노모나(Pseudomona)이고, 바이러스들의 예는 박시니아 바이러스(Vaccinia Virus) 및 아데노바이러스(Adenovirus)이다.
- [0174] 그러므로, 본 발명의 또다른 중요한 측면은 현재 이용 가능한 살아있는 (living) BCG 백신의 개선으로, 이는 앞서 정의한 바에 따라 하나 또는 그 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA 서열의 하나 또는 그 이상의 카피(copies)를 미생물이 발현을 하도록 하는 방식으로 미생물 내 게놈(genome)에 도입(incorporate)시켜 왔다. 면역 반응을 증강시키기 위하여 본 발명의 핵산 서열의 하나를 초과하는 카피를 도입하는 것이 고려된다.
- [0176] 또다른 가능성은 아데노바이러스 또는 박시니아 바이러스(Rolph et al 1997)와 같은 약독화된 바이러스 내에 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA를 통합시키는(integrate) 것이다. 재조합 박시니아 바이러스는 감염된 숙주 세포의 세포질(cytoplasm) 내에서 복제될 수 있고, 그러므로 관심있는 폴리펩타이드가 면역 반응을 유도할 수 있으며, 이는 TB에 대하여 보호를 유도할 것으로 생각된다.
- [0178] 본 출원에서 인용된 모든 특허 및 비특허 문헌들은 그 전체가 참고로서, 여기에 통합된다. 본 발명은 하기의 비-제한적 실험예에서 좀더 자세히 설명될 것이다.
- [0180] 실험예
- [0182] 실험예 1: 백신 접종을 위한 뮤린(MURINE) TB 모델
- [0183] 이 모델은 재활성화를 예방하기 위하여 백신 후보 능력을 시험하기 위하여 우리 실험실에서 적용시켰다. 마우스들은 초기에 에어로졸로 병독성 M.tb를 감염시켰으며, 박테리아 부하를 감소시키기 위하여, 감염 후 6주에 항생제 처리가 시작되었다. 이는 마우스 내에서 저절로 일어나지 않는 인간 감염의 잠복기를 모방하기 위한(mimic) 것이다. 이 잠복 단계(연속적인 낮은 박테리아 수의 단계) 동안, 마우스들은 두 번 면역화되고, 백신에 의하여 재활성화를 예방하는 능력은 마지막 면역화 후 20주에 살아있는 M.tb를 비장 및 폐에서 배양함으로써 결정된다. 백신 효험의 판독(readout)을 위한 전제 조건인 질병의 재활성화를 위해서는 충분한 시간을 주어야 하기 때문에, 실험의 오랜 기간은 필요하다(도 3).

- [0185] **실험예 2: Ag85B가 아닌 ESAT6에 의하여 보호가 유도된 노출후 백신(postexposure vaccine).**
- [0186] ESAT-6 및 Ag85B는 단일 요소로서, 또한 융합 분자 Ag85B-ESAT6(H1)로서 예방 백신 접종에서 보호적인(protective) 것으로 증명되었다. 그러나 이들 항원들이 노출후 모델에서 시험될 때(상기 실험예 1에서 기재한 대로), 오직 ESAT6만이 재활성화기 동안 보호 효과 및 박테리아 성장 조절능을 가졌다(도 4). 게다가, 도 4B에 나타난 바와 같이, 재활성화에 대항한 ESAT6 보호는 그 자체로, 감염 후 W18만큼 일찍 나타나며, 이러한 보호는 실험의 경과 전반에 걸쳐 유지되었다(감염 후 40주까지). 이는 Ag85B가 노출후 백신으로서 사용되었을 때 관찰된 때(도 4C 및 D)과는 대조되는데, 이때에는 대조군에 비하여 박테리아 부하의 중요한 감소는 없었다. 또한, 우리는 예방 세팅(prophylactic setting)에서 촉망되는 효험을 보였던 ESAT-6 및 TB 항원 Ag85B를 포함하는 H1 융합 단백질을 평가하였다. 이 분자가 SSI 노출후 모델에서 노출후 백신으로서 이용될 때, 그것은 박테리아 수를 상당히 감소시킬 수 있었다(도 4E).
- [0188] **실험예 3: 노출 후 백신은 ESAT6 펩타이드 혼합물(mix)에 의하여 보호를 유도하였다.**
- [0189] 상기 실험예들에서 나타났듯이, 대조군에 비교하면, 또한 Ag85B에 비교하면, ESAT-6 분자는 매우 활동적이어서(active), 노출후 조건 하 박테리아 부하의 감소를 야기한다. 게다가 ESAT6의 강한 활성 및 노출후 백신으로서 기능하는 능력을 입증함으로써, 우리는 재조합 단백질 대신 오버랩핑 펩타이드의 풀(pool)로서 주어진 ESAT-6가 또한 대조군 및 Ag85B 모두에 비교할 때 재활성화에 대하여 더 나은 보호를 야기한다는 것을 보였다(도 4D).
- [0191] 보호 실험에서 사용된 오버랩핑 ESAT-6 펩타이드들(P1-P13):
- [0192] P1 MTEQQWNFAGIEAAA (서열번호 19)
- [0193] P2 NFAGIEAAASAIQGN (서열번호 20)
- [0194] P3 ASAIQGNVTSIHSL (서열번호 21)
- [0195] P4 NVTSIHSLLDDEGKQS (서열번호 22)
- [0196] P5 SLLDEGKQSLTKLAA (서열번호 23)
- [0197] P6 KQSLTKLAAWGGSG (서열번호 24)
- [0198] P7 AAWGGSGSEAYQGVQ (서열번호 25)
- [0199] P8 GSEAYQGVQKWDAT (서열번호 26)
- [0200] P9 QKWDATATELNNAL (서열번호 27)
- [0201] P10 TATELNNALQNLART (서열번호 28)
- [0202] P11 ALQNLARTISEAGQA (서열번호 29)
- [0203] P12 TISEAGQAMASTEGR (서열번호 30)
- [0204] P13 QAMASTEGRVTGMFA (서열번호 31)
- [0206] **실험예 5: ESAT-6의 노출후 백신 접종은 다기능성 T 세포를 유도한다.**
- [0207] ESAT-6 특이적 세포들의 사이토카인 발현 프로파일에 대한 ESAT-6의 노출후 백신 접종의 효과를 시험하기 위하여, 마우스들을 먼저 에어로졸에 의하여 병독성 M.tb로 감염시키고, 박테리아 부하를 감소시키고 잠복 감염을 확정하기 위하여 감염 후 6주에 항생제 처치를 시작하였다. 잠복기 동안 마우스들은 3주 간격으로 3회 (도 3에 기재된 바와 같이) 백신 접종되었고, 다기능성 T 세포의 수에 영향을 미치고 M.tb의 재활성화를 예방하기 위한 ESAT-6 백신의 능력은 마지막 백신 접종 후 20주에 결정되었다. 그 결과는 비-백신접종 군에서 상당한 ESAT-6 반응이 있었으나, 사이토카인 발현 프로파일은, 특히 다기능성 T 세포(IFN- γ +TNF- α +IL-2+ CD4 T 세포들)의 경우, ESAT-6 백신 접종된 군과는 현저하게 달랐다는 것을 보여준다(도 5). 그러므로, 비 백신접종된 군에 비교하

여, 우리는 FN- γ /TNF- α CD4 T 세포의 수가 감소한 것을 관찰하였으며, FN- γ /TNF- α /IL-2을 함께-발현하는 삼중 양성 다기능성 CD4 T 세포들의 수가 증가한 것을 관찰하였다. ESAT-6 백신 면역된 동물들의 폐 내 감소된 박테리아 수와 연관성이 있는 다기능성 T 세포의 존재의 증가(도 5D).

[0209] **실험예 6: 감염의 초기 및 잠복기 모두에서 관련된 다른 항원들과 비교하여, ESAT6의 노출후 백신 면역는 더욱 지속적으로 재활성화에 대하여 보호한다.**

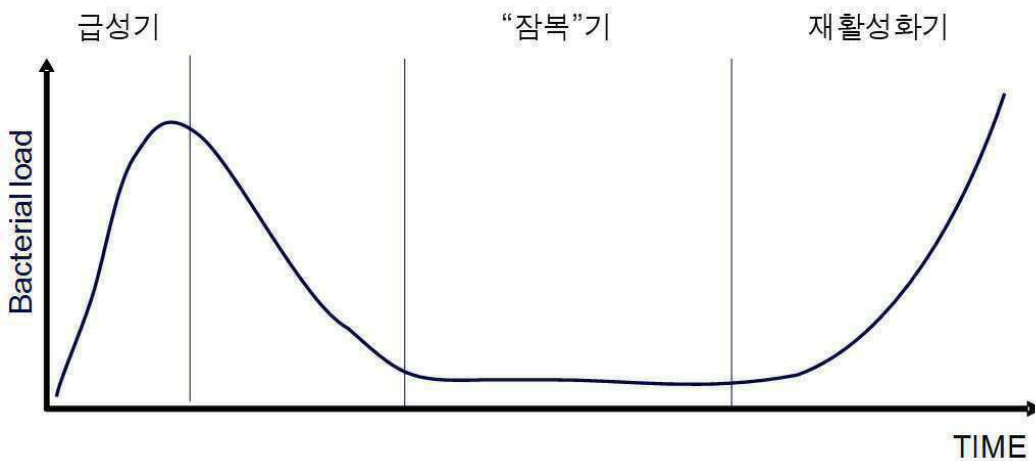
[0210] 재활성화에 대하여 어떤 항원이 가장 지속적으로 보호하는지 결정하기 위하여, 우리는 모든 수행된 노출후 실험에 기초하여 정규화된(normalized) 데이터의 풀 분석(pooled analysis)을 하였다. 각각의 실험들로부터 얻어진 데이터들은 그룹 내 각각의 마우스들의 박테리아 부하를 대조군의 중앙값에 대하여 비교함으로써 정규화(normalize)되었는데, 즉, 각각의 데이터 포인트는 대조군 중앙값 CFU 및 각각의 대상 동물의 CFU 사이의 차이(Log10 CFU 대조군 중앙값-Log 10 CFU 백신 군)를 가리킨다(도 6). 도 6A에서, 항원들, 잠복 관련된 항원 Rv0569, Rv2031c 및 초기 항원 Ag85B, ESAT6, Rv3871, Rv3905 및 Rv3445들(이중 뒤의 둘은 ESAT 패밀리 단백질이다)의 보호를 위하여 세트(se)된 데이터 풀(pooled data)의 비교는, 평가된 다른 항원들에 비교할 때 ESAT6 백신 접종된 동물들이 재활성화로부터 상당히 잘 보호된다는 것을 보여주었다. 게다가, 그 후 Rv3871로 노출후 백신 접종에 이르는 보호 수준은, ESX-1 단백질이 또한 다른 항원들에 비교할 때 증가된 것으로 보인다(도 6A). 특히 ESAT6의 활성을 추가로 입증하기 위하여, 우리는 ESAT6에 의하여 획득되는 보호를, 모두 ESAT6를 포함하는 두 개의 융합 구조체 H1 (Ag85B-ESAT6) 및 H56 (Ag85B-ESAT6-Rv2660)와 비교하였다(도 6B). 분석은 상기 언급한 두 융합 구조체 내 포함될 때에도 ESAT6 활성이 여전히 재활성화에 대하여 보호를 야기한다는 것을 보여준다.

[0212] **실험예 7: ESX-1 패밀리의 또 다른 멤버, Rv3871에 의한 노출후 백신 접종은 재활성화 과정에 대하여 억제 효과를 갖는 것으로 보인다.**

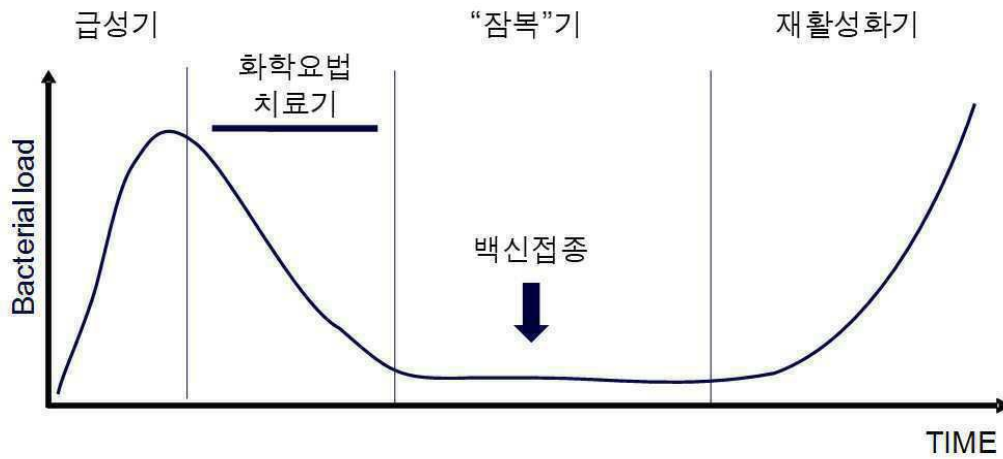
[0213] 우리는 ESAT6과 동시에 ESX-1 패밀리의 다른 멤버를 평가하였으며, 비록 ESAT6가 유도한 면역 반응의 정도까지는 아니라도(도 7A), Rv3871 노출후 백신 접종이 Rv3871 특이적 면역 반응을 이끈다는 것을 발견하였다(도 7B). 그렇기는 하지만, ESAT6 및 Rv3871은 모두 식염수 대조군에 비교할 때 더 큰 면역반응을 유도하였다. 백신 특이적 면역 반응의 유도는, 식염수 군에 비교할 때 백신 군들 모두에서 낮은(중앙값) 박테리아 부하를 갖는 것과 관련되었다. 대조군에서 수준이 다소 증가한 것과 비교할 때 이들 두 군에서의 박테리아 수가 유사한 수준이라는 점으로 입증되었듯이, 이는 Rv3871이 ESAT6에 비교할 때 재활성화에 대한 보호에 있어서 유사한 효과를 가질 수 있을 것이라는 점을 가리킨다(도 7C).

도면

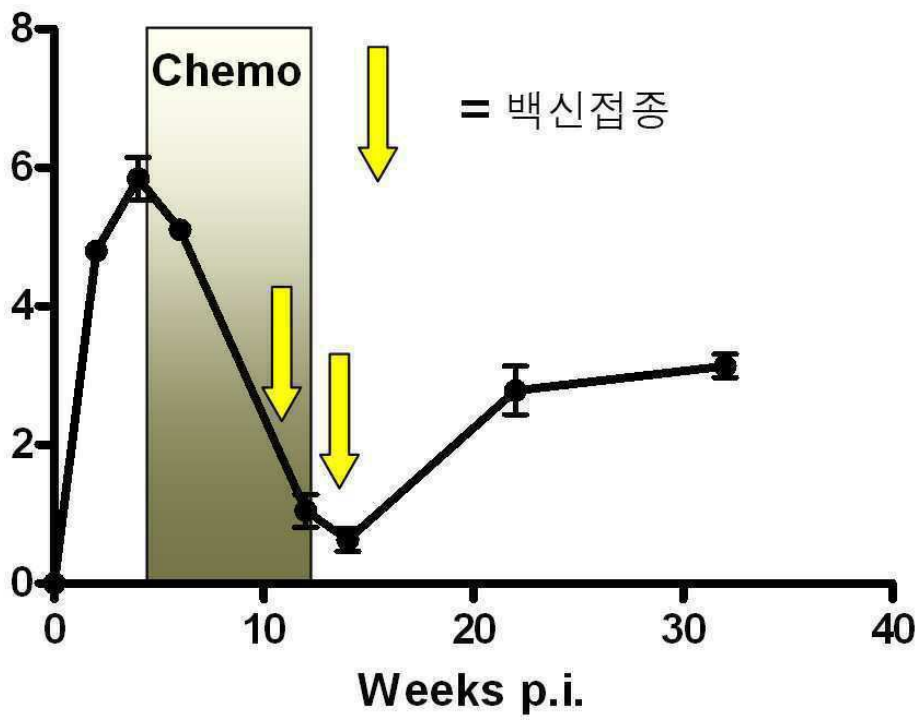
도면1



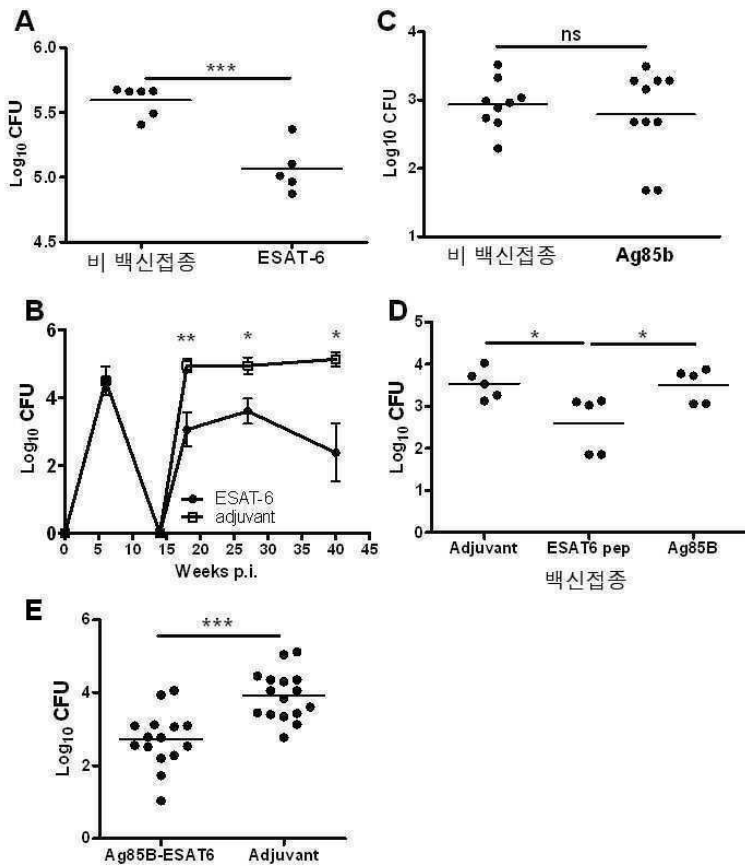
도면2



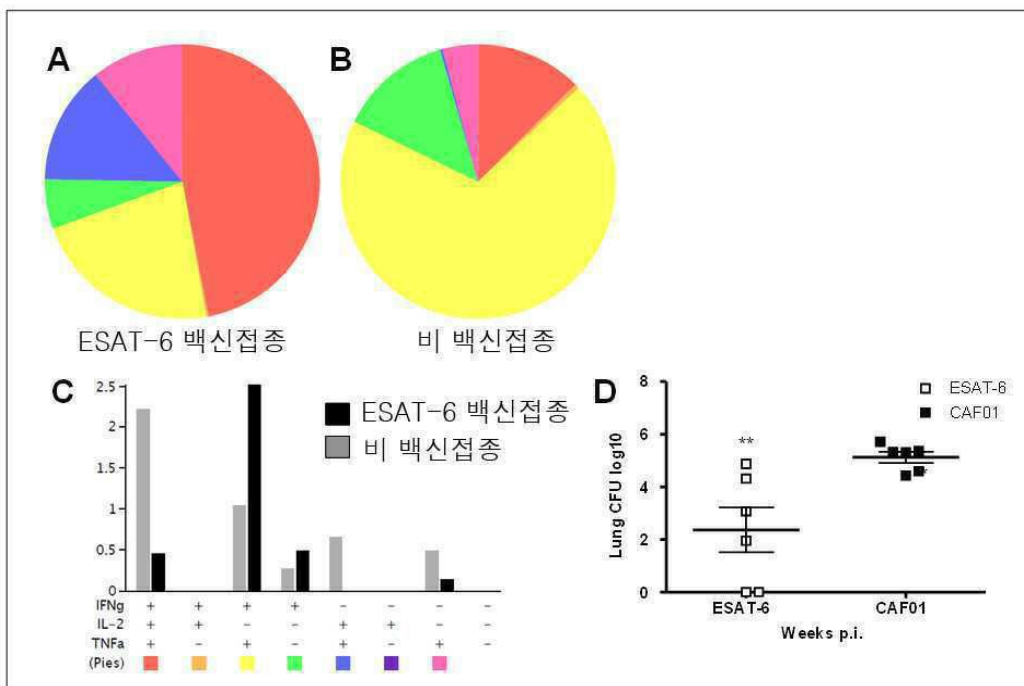
도면3



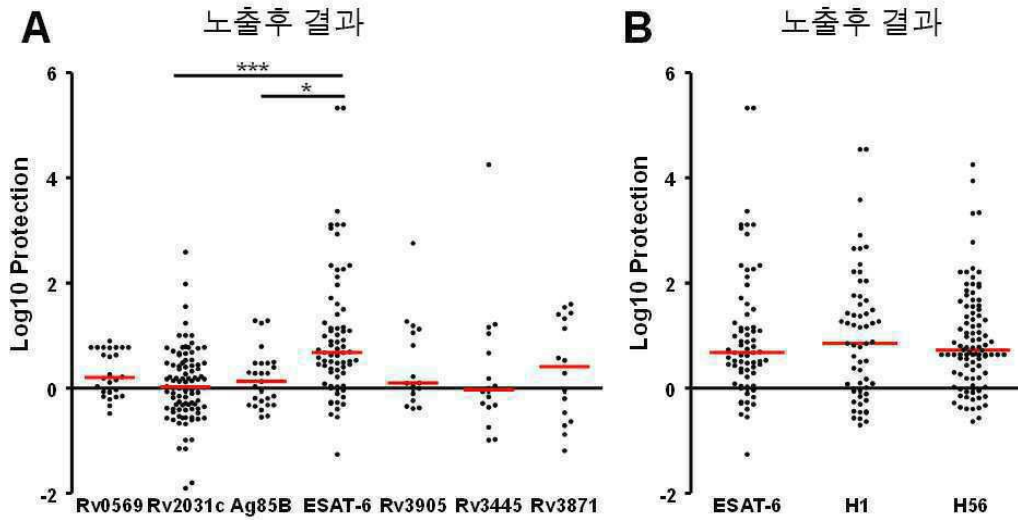
도면4



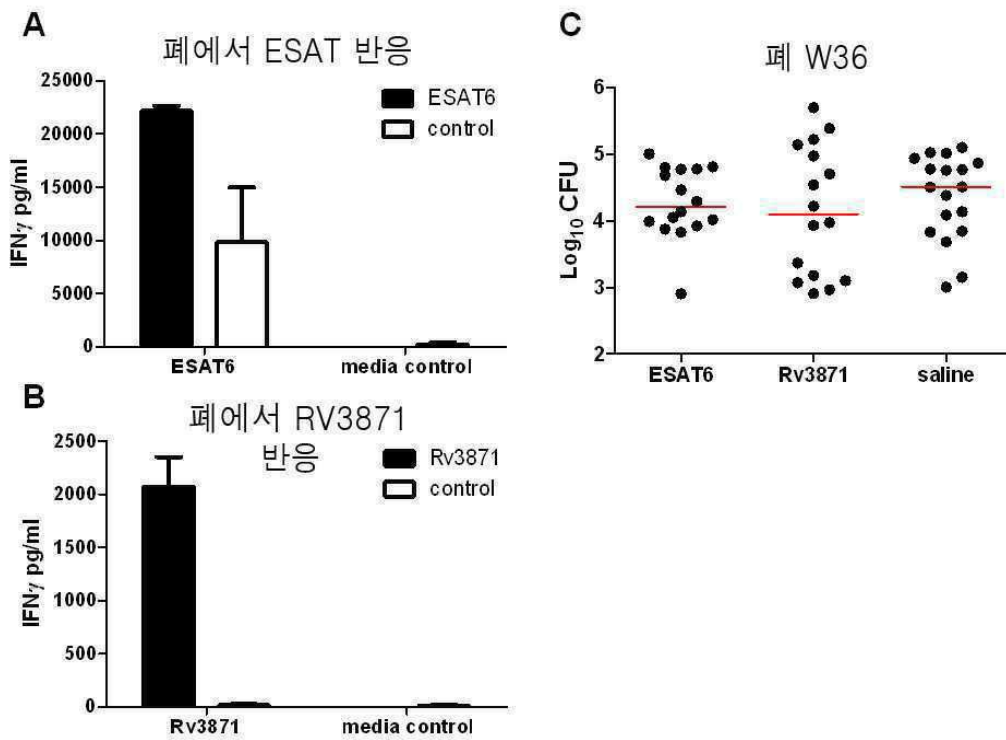
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Statens Serum Institut
- <120> A tuberculosis vaccine to prevent reactivation
- <130> DIP110051DK
- <150> DKPA200900539
- <151> 2009-04-24
- <160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 95

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser

35 40 45

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu

50 55 60

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly

65 70 75 80

Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala

85 90 95

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2

Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly

35 40 45

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys

50 55 60

Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly

Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr
 180 185 190

Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys
 195 200 205

Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg
 210 215 220

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

Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala
 245 250 255

Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
 260 265 270

Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe
 275 280 285

Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln
 290 295 300

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

Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met
 325 330 335

Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser
 340 345 350

Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr
 355 360 365

Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln
 370 375 380

Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
 385 390

<210> 4
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

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

1 5 10 15

Asp Leu Trp Gly Ala Asp Gly Ala Glu Gly Trp Thr Ala Asp Pro Ile

20 25 30

Ile Gly Val Gly Ser Ala Ala Thr Pro Asp Thr Gly Pro Asp Leu Asp

35 40 45

Asn Ala His Gly Gln Ala Glu Thr Asp Thr Glu Gln Glu Ile Ala Leu

50 55 60

Phe Thr Val Thr Asn Pro Pro Arg Thr Val Ser Val Ser Thr Leu Met

65 70 75 80

Asp Gly Arg Ile Asp His Val Glu Leu Ser Ala Arg Val Ala Trp Met

85 90 95

Ser Glu Ser Gln Leu Ala Ser Glu Ile Leu Val Ile Ala Asp Leu Ala

100 105 110

Arg Gln Lys Ala Gln Ser Ala Gln Tyr Ala Phe Ile Leu Asp Arg Met

115 120 125

Ser Gln Gln Val Asp Ala Asp Glu His Arg Val Ala Leu Leu Arg Lys

130 135 140

Thr Val Gly Glu Thr Trp Gly Leu Pro Ser Pro Glu Glu Ala Ala Ala

145 150 155 160

Ala Glu Ala Glu Val Phe Ala Thr Arg Tyr Ser Asp Asp Cys Pro Ala

165 170 175

Pro Asp Asp Glu Ser Asp Pro Trp

180

<210> 5

<211> 103

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala
 20 25 30
 Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys
 35 40 45
 Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala
 50 55 60
 Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys
 85 90 95
 Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr
 100
 <210> 6
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 6
 Met Ser Thr Thr Phe Ala Ala Arg Leu Asn Arg Leu Phe Asp Thr Val
 1 5 10 15
 Tyr Pro Pro Gly Arg Gly Pro His Thr Ser Ala Glu Val Ile Ala Ala
 20 25 30
 Leu Lys Ala Glu Gly Ile Thr Met Ser Ala Pro Tyr Leu Ser Gln Leu
 35 40 45
 Arg Ser Gly Asn Arg Thr Asn Pro Ser Gly Ala Thr Met Ala Ala Leu
 50 55 60
 Ala Asn Phe Phe Arg Ile Lys Ala Ala Tyr Phe Thr Asp Asp Glu Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Glu Lys Leu Asp Lys Glu Leu Gln Trp Leu Cys Thr Met Arg Asp
 85 90 95
 Asp Gly Val Arg Arg Ile Ala Gln Arg Ala His Gly Leu Pro Ser Ala
 100 105 110
 Ala Gln Gln Lys Val Leu Asp Arg Ile Asp Glu Leu Arg Arg Ala Glu

Thr Glu Ala Asn Asp Ser Pro Ala Gly Glu Ala Cys Ala Arg Ala Ile
 195 200 205
 Ala Trp Tyr Leu Ala Met Ala Arg Arg Ser Gln Gly Asn Glu Ser Ala
 210 215 220

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

 290 295 300
 Arg Tyr Arg Ala Ala Thr Leu Met Ala Arg Val Arg Ala Ala Lys Gly
 305 310 315 320
 Met Lys Val Ala Gln Pro Ser Lys His Met Ile Phe Thr Gly Pro Pro
 325 330 335
 Gly Thr Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg Val Val Ala Asn Ile Leu Ala
 340 345 350
 Gly Leu Gly Val Ile Ala Glu Pro Lys Leu Val Glu Thr Ser Arg Lys
 355 360 365

 Asp Phe Val Ala Glu Tyr Glu Gly Gln Ser Ala Val Lys Thr Ala Lys
 370 375 380
 Thr Ile Asp Gln Ala Leu Gly Gly Val Leu Phe Ile Asp Glu Ala Tyr
 385 390 395 400
 Ala Leu Val Gln Glu Arg Asp Gly Arg Thr Asp Pro Phe Gly Gln Glu
 405 410 415
 Ala Leu Asp Thr Leu Leu Ala Arg Met Glu Asn Asp Arg Asp Arg Leu
 420 425 430
 Val Val Ile Ile Ala Gly Tyr Ser Ser Asp Ile Asp Arg Leu Leu Glu

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gln Asn Ala Pro Trp Glu Ile Val Arg Leu Leu Val Asp Gly
 435 440 445

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

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

<210> 9

<211> 747

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

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

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

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

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

Gly Arg Ala Val Ser Met Glu Lys His His Leu Met Ile Gly Val Pro
 275 280 285

Arg Phe Asp Gly Val His Ser Ala Asp Asn Leu Val Glu Ala Ile Thr
 290 295 300

Ala Gly Val Thr Gln Ile Ala Ser Gln His Thr Glu Gln Ala Pro Pro
 305 310 315 320

Val Arg Val Leu Pro Glu Arg Ile His Leu His Glu Leu Asp Pro Asn
 325 330 335

Pro Pro Gly Pro Glu Ser Asp Tyr Arg Thr Arg Trp Glu Ile Pro Ile
 340 345 350

Gly Leu Arg Glu Thr Asp Leu Thr Pro Ala His Cys His Met His Thr
 355 360 365

Asn Pro His Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ala Lys Ser Gly Lys Thr Thr
 370 375 380

Ile Ala His Ala Ile Ala Arg Ala Ile Cys Ala Arg Asn Ser Pro Gln
 385 390 395 400

Gln Val Arg Phe Met Leu Ala Asp Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Asp Ala
 405 410 415

Val Pro Asp Thr His Leu Leu Gly Ala Gly Ala Ile Asn Arg Asn Ser
 420 425 430

Ala Ser Leu Asp Glu Ala Val Gln Ala Leu Ala Val Asn Leu Lys Lys
 435 440 445

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

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

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

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

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

Ala Phe Gly Ser Gly Ala Pro Thr Met Phe Leu Ser Gly Glu Lys Gln

530 535 540

Glu Phe Pro Ser Ser Glu Phe Lys Val Lys Arg Arg Pro Pro Gly Gln

545 550 555 560

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

565 570 575

Ile Glu Pro Pro Glu Glu Val Phe Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gly

580 585 590

<210> 11

<211> 99

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400

> 11

Met Glu Lys Met Ser His Asp Pro Ile Ala Ala Asp Ile Gly Thr Gln

1 5 10 15

Val Ser Asp Asn Ala Leu His Gly Val Thr Ala Gly Ser Thr Ala Leu

20 25 30

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

35 40 45

Gln Ala Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Gly Ile Gln Leu Leu Ala Ser

50 55 60

Asn Ala Ser Ala Gln Asp Gln Leu His Arg Ala Gly Glu Ala Val Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Ala Glu

<210> 12

<211> 368

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 12

Met Leu Trp His Ala Met Pro Pro Glu Leu Asn Thr Ala Arg Leu Met
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Gly Pro Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ala Gly Trp Gln
 20 25 30

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

Gly Ala Ser Gln Ser Thr Thr Asn Pro Ile Phe Gly Met Pro Ser Pro
 180 185 190
 Gly Ser Ser Thr Pro Val Gly Gln Leu Pro Pro Ala Ala Thr Gln Thr
 195 200 205
 Leu Gly Gln Leu Gly Glu Met Ser Gly Pro Met Gln Gln Leu Thr Gln
 210 215 220
 Pro Leu Gln Gln Val Thr Ser Leu Phe Ser Gln Val Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Asn Pro Ala Asp Glu Glu Ala Ala Gln Met Gly Leu Leu Gly

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Lys Gly Pro Lys Val Lys Lys Val Lys Pro Gln Lys Pro Lys
 355 360 365

Ala Thr Lys Pro Pro Lys Val Val Ser Gln Arg Gly Trp Arg His Trp
 370 375 380

Val His Ala Leu Thr Arg Ile Asn Leu Gly Leu Ser Pro Asp Glu Lys
 385 390 395 400

Tyr Glu Leu Asp Leu His Ala Arg Val Arg Arg Asn Pro Arg Gly Ser
 405 410 415

Tyr Gln Ile Ala Val Val Gly Leu Lys Gly Gly Ala Gly Lys Thr Thr
 420 425 430

Leu Thr Ala Ala Leu Gly Ser Thr Leu Ala Gln Val Arg Ala Asp Arg
 435 440 445

Ile Leu Ala Leu Asp Ala Asp Pro Gly Ala Gly Asn Leu Ala Asp Arg
 450 455 460

Val Gly Arg Gln Ser Gly Ala Thr Ile Ala Asp Val Leu Ala Glu Lys
 465 470 475 480

Glu Leu Ser His Tyr Asn Asp Ile Arg Ala His Thr Ser Val Asn Ala
 485 490 495

Val Asn Leu Glu Val Leu Pro Ala Pro Glu Tyr Ser Ser Ala Gln Arg
 500 505 510

Ala Leu Ser Asp Ala Asp Trp His Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ser Arg
 515 520 525

Phe Tyr Asn Leu Val Leu Ala Asp Cys Gly Ala Gly Phe Phe Asp Pro
 530 535 540

Leu Thr Arg Gly Val Leu Ser Thr Val Ser Gly Val Val Val Val Ala
 545 550 555 560

Ser Val Ser Ile Asp Gly Ala Gln Gln Ala Ser Val Ala Leu Asp Trp
 565 570 575

Leu Arg Asn Asn Gly Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Arg Ala Cys Val Val
 580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Ile Thr Thr Val Cys Gly Phe Arg Ser Arg Leu Tyr Ala Glu
 405 410 415
 Arg Trp Cys Ala Trp Ala Leu Leu Ala Ala Thr Val Ala Ile Pro Thr
 420 425 430
 Gly Leu Thr Ala Lys Leu Ile Ile Trp Tyr Pro His Tyr Ala Trp Leu
 435 440 445
 Leu Leu Ser Val Tyr Leu Thr Val Ala Leu Val Ala Leu Val Val Val
 450 455 460
 Gly Ser Met Ala His Val Arg Arg Val Ser Pro Val Val Lys Arg Thr
 465 470 475 480

 Leu Glu Leu Ile Asp Gly Ala Met Ile Ala Ala Ile Ile Pro Met Leu
 485 490 495
 Leu Trp Ile Thr Gly Val Tyr Asp Thr Val Arg Asn Ile Arg Phe
 500 505 510
 <210> 15
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 15
 Met Ala Glu Pro Leu Ala Val Asp Pro Thr Gly Leu Ser Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Lys Leu Ala Gly Leu Val Phe Pro Gln Pro Pro Ala Pro Ile Ala
 20 25 30
 Val Ser Gly Thr Asp Ser Val Val Ala Ala Ile Asn Glu Thr Met Pro
 35 40 45
 Ser Ile Glu Ser Leu Val Ser Asp Gly Leu Pro Gly Val Lys Ala Ala
 50 55 60
 Leu Thr Arg Thr Ala Ser Asn Met Asn Ala Ala Ala Asp Val Tyr Ala
 65 70 75 80
 Lys Thr Asp Gln Ser Leu Gly Thr Ser Leu Ser Gln Tyr Ala Phe Gly
 85 90 95

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

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

Gln Leu Gly Glu Thr Ala Ala Glu Leu Ala Pro Arg Val Val Ala Thr
 130 135 140

Val Pro Gln Leu Val Gln Leu Ala Pro His Ala Val Gln Met Ser Gln
 145 150 155 160

Asn Ala Ser Pro Ile Ala Gln Thr Ile Ser Gln Thr Ala Gln Gln Ala
 165 170 175

Ala Gln Ser Ala Gln Gly Gly Ser Gly Pro Met Pro Ala Gln Leu Ala
 180 185 190

Ser Ala Glu Lys Pro Ala Thr Glu Gln Ala Glu Pro Val His Glu Val
 195 200 205

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

Val Ala Ala Ala Arg Asp Glu Gly Ala Gly Ala Ser Pro Gly Gln Gln
 225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Val Pro Ala Gln Ala Met Asp Thr Gly Ala Gly Ala
 245 250 255

Arg Pro Ala Ala Ser Pro Leu Ala Ala Pro Val Asp Pro Ser Thr Pro
 260 265 270

Ala Pro Ser Thr Thr Thr Thr Leu
 275 280

<210> 16
 <211> 729
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 16

Met Ser Ile Thr Arg Pro Thr Gly Ser Tyr Ala Arg Gln Met Leu Asp
 1 5 10 15

Pro Gly Gly Trp Val Glu Ala Asp Glu Asp Thr Phe Tyr Asp Arg Ala

Leu Ala Tyr Ile Pro Asp Gly Met Glu Leu Pro Asn Lys Val Tyr Leu
 530 535 540

Ala Ser Ala Asp His Ala Ile Pro Val Asp Glu Ile Ala Arg Cys Ala
 545 550 555 560

Thr Tyr Pro Val Leu Ala Val Gln Ala Trp Ala Ala Phe His Asp Met
 565 570 575

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

Pro Gly Val Ala Lys Ile Val Leu Glu Pro Asp Asp Ile Pro Glu Ser
 595 600 605

Gly Lys Met Thr Gly Arg Ser Arg Leu Glu Val Val Asp Pro Ser Ala
 610 615 620

Ala Ala Gln Leu Ala Asp Thr Thr Asp Gln Arg Leu Leu Asp Leu Leu
 625 630 635 640

Pro Pro Ala Pro Val Asp Val Asn Pro Pro Gly Asp Glu Arg His Met
 645 650 655

Leu Trp Phe Glu Leu Met Lys Pro Met Thr Ser Thr Ala Thr Gly Arg
 660 665 670

Glu Ala Ala His Leu Arg Ala Phe Arg Ala Tyr Ala Ala His Ser Gln
 675 680 685

Glu Ile Ala Leu His Gln Ala His Thr Ala Thr Asp Ala Ala Val Gln
 690 695 700

Arg Val Ala Val Ala Asp Trp Leu Tyr Trp Gln Tyr Val Thr Gly Leu
 705 710 715 720

Leu Asp Arg Ala Leu Ala Ala Ala Cys
 725

<210> 17

<211> 115

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 17

Val Ser Met Asp Glu Leu Asp Pro His Val Ala Arg Ala Leu Thr Leu

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

 50 55 60
 Leu Lys Lys Leu Gly Ala Glu Ala Val Ala Gln Arg Val Asn Glu Ala
 65 70 75 80
 Leu His Asn Ala Gln Ala Ala Ala Ser Ala Tyr Asn Asp Ala Ala Gly
 85 90 95
 Glu Gln Leu Thr Ala Ala Leu Ser Ala Met Ser Arg Ala Met Asn Glu
 100 105 110
 Gly Met Ala
 115
 <210> 18
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

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

 65 70 75 80
 Tyr Gly Glu Val Asp Glu Glu Ala Ala Thr Ala Leu Asp Asn Asp Gly
 85 90 95

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

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

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

Val Ala Val Lys Ala Ala Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val

355 360 365

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

370 375 380

Pro Ala Gly Ala Gly Asp Ile Ala Gly Leu Gly Gln Gly Arg Ala Gly

385 390 395 400

Gly Gly Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Met Gly Met Pro Met Gly Ala

405 410 415

Ala His Gln Gly Gln Gly Gly Ala Lys Ser Lys Gly Ser Gln Gln Glu

420 425 430

Asp Glu Ala Leu Tyr Thr Glu Asp Arg Ala Trp Thr Glu Ala Val Ile

435 440 445

Gly Asn Arg Arg Arg Gln Asp Ser Lys Glu Ser Lys

450 455 460

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 19

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 20

Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn

1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 21
 Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 22
 Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 23
 Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 24
 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 25
 Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln
 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 26
 Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 27

Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 28

Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 29

Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 30

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

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

<210> 32
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 32
 Met Arg Asn Pro Leu Gly Leu Arg Phe Ser Thr Gly His Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Leu Ala Pro Pro Cys Ile Ile Ala Phe Leu Glu Thr Arg
 20 25 30
 Tyr Trp Trp Ala Gly Ile Ala Leu Ala Ser Leu Gly Val Ile Val Ala
 35 40 45
 Thr Val Thr Phe Tyr Gly Arg Arg Ile Thr Gly Trp Val Ala Ala Val
 50 55 60
 Tyr Ala Trp Leu Arg Arg Arg Arg Pro Pro Asp Ser Ser Ser Glu
 65 70 75 80
 Pro Val Val Gly Ala Thr Val Lys Pro Gly Asp His Val Ala Val Arg
 85 90 95
 Trp Gln Gly Glu Phe Leu Val Ala Val Ile Glu Leu Ile Pro Arg Pro
 100 105 110
 Phe Thr Pro Thr Val Ile Val Asp Gly Gln Ala His Thr Asp Asp Met
 115 120 125
 Leu Asp Thr Gly Leu Val Glu Glu Leu Leu Ser Val His Cys Pro Asp
 130 135 140
 Leu Glu Ala Asp Ile Val Ser Ala Gly Tyr Arg Val Gly Asn Thr Ala
 145 150 155 160

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

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

Arg Thr Arg Lys Ser Ala Gln Arg Arg Asp Glu Gly Val Ala Gly Leu
 195 200 205

Ala Arg Tyr Leu Val Ala Ser Ala Thr Arg Ile Ala Asp Arg Leu Ala
 210 215 220

Ser His Gly Val Asp Ala Val Cys Gly Arg Ser Phe Asp Asp Tyr Asp
 225 230 235 240

His Ala Thr Asp Ile Gly Phe Val Arg Glu Lys Trp Ser Met Ile Lys
 245 250 255

Gly Arg Asp Ala Tyr Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Pro Asp
 260 265 270

Val Trp Trp Ser Ala Arg Ala Asp His Thr Ile Thr Arg Val Arg Val
 275 280 285

Ala Pro Gly Met Ala Pro Gln Ser Thr Val Leu Leu Thr Thr Ala Asp
 290 295 300

Lys Pro Lys Thr Pro Arg Gly Phe Ala Arg Leu Phe Gly Gly Gln Arg
 305 310 315 320

Pro Ala Leu Gln Gly Gln His Leu Val Ala Asn Arg His Cys Gln Leu
 325 330 335

Pro Ile Gly Ser Ala Gly Val Leu Val Gly Glu Thr Val Asn Arg Cys
 340 345 350

Pro Val Tyr Met Pro Phe Asp Asp Val Asp Ile Ala Leu Asn Leu Gly
 355 360 365

Asp Ala Gln Thr Phe Thr Gln Phe Val Val Arg Ala Ala Ala Ala Gly
 370 375 380

Ala Met Val Thr Val Gly Pro Gln Phe Glu Glu Phe Ala Arg Leu Ile
 385 390 395 400

Gly Ala His Ile Gly Gln Glu Val Lys Val Ala Trp Pro Asn Ala Thr
 405 410 415

Thr Tyr Leu Gly Pro His Pro Gly Ile Asp Arg Val Ile Leu Arg His
 420 425 430

Asn Val Ile Gly Thr Pro Arg His Arg Gln Leu Pro Ile Arg Arg Val
 435 440 445

Ser Pro Pro Glu Glu Ser Arg Tyr Gln Met Ala Leu Pro Lys
 450 455 460

<210> 33

<211> 446

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

