



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104107425 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 22

(21) 申请号 201410141208. 5

(22) 申请日 2010. 04. 23

(30) 优先权数据

PA200900539 2009. 04. 24 DK

(62) 分案原申请数据

201080017717. 7 2010. 04. 23

(71) 申请人 国立血清研究所

地址 丹麦哥本哈根市阿特勒维杰 5 号

(72) 发明人 J·迪特里希 彼得·安德森

卡里纳·温斯波·伦德贝里

特吕克·蒂·吉姆·坦·候昂

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 39/04 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书17页

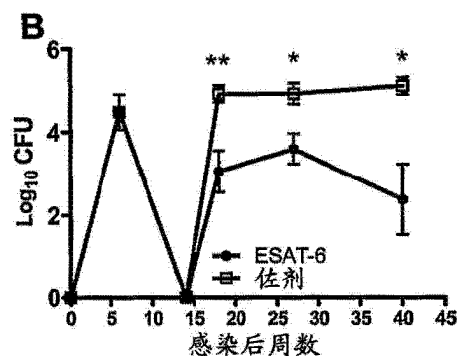
序列表51页 附图4页

(54) 发明名称

预防再激活的结核病 TB 疫苗

(57) 摘要

本发明公开可向潜伏感染个体施用以预防结核病复合群微生物物种(结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)、非洲分枝杆菌(*M. africanum*))引起的潜伏结核病感染的再激活的疫苗或者免疫原性组合物。本发明是基于在感染的不同阶段组成型表达的大量结核分枝杆菌来源的蛋白和蛋白片段。本发明涉及这些多肽、其免疫活性片段和编码它们的基因用于免疫组合物诸如疫苗的用途。



1. 一种疫苗,所述疫苗施用于潜伏感染个体,预防结核病的再激活,所述疫苗包含在结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)感染期间组成型表达的抗原或编码所述抗原的核酸,其中所述抗原是:

i) SEQ ID NO. 4 或

ii) SEQ ID NO. 4 的 T 细胞表位。

2. 如权利要求 1 所述的疫苗,其中所述抗原与分枝杆菌科的细菌组成型表达的抗原融合。

3. 如权利要求 2 所述的疫苗,所述疫苗包含与 CFP10 融合的 ESAT6。

4. 如前述权利要求任一项所述的疫苗,所述疫苗包含递送系统。

5. 如权利要求 4 所述的疫苗,其中所述递送系统是佐剂。

6. 如权利要求 5 所述的疫苗,其中所述佐剂包含 DDA/TDB 和 / 或聚 I:C。

7. 如前述权利要求 1-3 中任一项所述的疫苗,其中所述氨基酸序列被脂化以允许所述多肽的自佐剂作用。

8. 如权利要求 4 所述的疫苗,其中所述氨基酸序列被脂化以允许所述多肽的自佐剂作用。

9. 如权利要求 5 所述的疫苗,其中所述氨基酸序列被脂化以允许所述多肽的自佐剂作用。

10. 如权利要求 6 所述的疫苗,其中所述氨基酸序列被脂化以允许所述多肽的自佐剂作用。

11. 如权利要求 1-10 任一项中定义的疫苗,所述疫苗用于治疗潜伏结核病。

12. 权利要求 1-4 任一项中定义的抗原或编码所述抗原的核酸在制备用于治疗动物包括人类的由毒性分枝杆菌引起的结核病感染的再激活的疫苗中的用途,其中所述疫苗施用于所述动物。

13. 如权利要求 12 所述的用途,其中所述疫苗在急性感染阶段之后和 / 或潜伏感染阶段期间施用。

14. 选自权利要求 1-10 任一项中定义的组的抗原用于制备疫苗的用途,所述疫苗抵抗由结核病复合群的物种引起的潜伏感染的再激活。

15. 如权利要求 14 所述的用途,其中所述结核病复合群的物种选自由结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和非洲分枝杆菌组成的组。

16. 如权利要求 14 所述的用途,其中所述疫苗是用于急性感染阶段之后和 / 或潜伏感染阶段期间施用。

17. 如权利要求 14-15 任一项所述的用途,其中所述疫苗包含一种或多种权利要求 1-3 中定义的抗原。

预防再激活的结核病 TB 疫苗

[0001] 本申请是申请日为 2010 年 4 月 23 日,申请号为“201080017717.7”,发明名称为“预防再激活的结核病 TB 疫苗”的申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明公开可向潜伏感染个体施用以通过靶向组成型表达的抗原诸如 ESAT6、CFP10 和来自 ESX-1 分泌系统的其他抗原而预防结核病复合群微生物(tuberculosis complex microorganisms)物种(结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)、非洲分枝杆菌(*M. africanum*))引起的潜伏结核病感染的再激活的疫苗。

[0003] 一般背景

[0004] 由结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)引起的人类结核病是一个严重的全球性健康问题,根据 WHO,其造成每年约 3 百万人死亡。在二十世纪 60 年代和 70 年代期间,全世界新的结核病(TB)病例发生率已经处于下降中,但在近十年中,部分由于 AIDS 的来临和结核分枝杆菌的多药抗性菌株的出现,这种趋势已经发生明显的改变。

[0005] 结核病复合群(tuberculosis complex)的生物体可引起多种疾病,但最常见的侵入途径是通过吸入细菌。这在肺中开始感染,最终可扩散到身体其他部位。通常,这种感染在生长方面被免疫系统限制,使得大多数感染个体除了最终减退的咳嗽和发热以外显示极少的体征。大约 30% 的个体不能容纳感染,将发展原发性疾病,这在许多情况中最终将是致命的。然而,认为甚至表面上控制感染的那些个体仍保持被感染,很可能持续其余生。当然,已经健康了数年或甚至数十年的个体可能突然发展结核病,该结核病被证明是多年前其感染的相同生物体引起的。结核分枝杆菌和 TB 复合群的其他生物体的独特之处在于,分枝杆菌可躲避免疫应答,以难治的非复制或缓慢复制期存活长时间。这称为潜伏 TB,目前是非常严重的全球性健康问题,估计影响全世界人群的大约 1/3 (Anon., 2001)。

[0006] 目前唯一可供临床使用的疫苗是 BCG,该疫苗的效力仍然有些争议。虽然 BCG 在原代感染的动物模型中一直表现良好,但它显然未能控制 TB 流行。与此一致,BCG 接种表现为提供抵抗儿科 TB (由于原代感染)的保护,而对抵抗成年疾病(通常是童年获得的潜伏感染的再激活)提供极小或没有保护。还已显示,向目前对分枝杆菌敏感或潜伏感染的个体接种疫苗是无效的。

[0007] 结核分枝杆菌感染的过程主要经历 3 个时期,如图 1 所示。在急性期,细菌在器官中增殖,直到免疫应答增强到其可控制感染的点,此时细菌负荷(bacterial load)达到峰值并开始下降。此后,在细菌负荷稳定维持在低水平时形成潜伏期。在这个时期,目前认为结核分枝杆菌由活跃的增殖趋于休眠期,基本上转变为非复制状态并维持在肉芽肿内。

[0008] 然而,近来已经变得明显的是,即使在特征为恒定的低细菌数目的感染阶段,至少部分细菌群体仍保持活性代谢的状态(Talaat AM 等 2007)。因此,尽管有强的免疫应答,这些细菌存活,保持活性代谢和复制。所以,在感染个体中,存在非复制细菌(因为位于胞内,免疫系统可能难以检测到)与缓慢复制细菌之间的平衡,所述缓慢复制细菌具有活性但改变的表达谱,试图适应在免疫宿主中遇到的敌对环境。处于这一阶段的细菌通常不被 TB 领

域中目前正开发的大多数预防性疫苗所靶向,例证是当典型的预防性疫苗被提供给潜伏感染的实验动物时缺乏活性(Turner2000)。

[0009] 在一些情况中,由于病原菌和感染进入再激活阶段,这一平衡被倾斜,在再激活阶段细菌开始快速复制并且感染个体中的细菌数目增加。在潜伏感染个体中、在非常强的免疫压力下复制的细菌是本发明接种策略的靶。处于这一潜伏感染阶段的细菌通常不被 TB 领域中目前正开发的大多数预防性疫苗所靶向,例证是当预防性疫苗被提供给潜伏感染的实验动物时缺乏活性(Turner 等 2000)。这不令人惊讶,因为现在已知强的宿主免疫应答导致许多抗原诸如主要预防性疫苗抗原 Ag85 和 PstS 的下调(Rogerson, BJ 等 2006)。对于 Ag85B,已经显示,在感染后存在 Ag85B 表达的最初短暂增加,但在感染后 2 周,细菌 Ag85B 表达水平已经从峰值期间的 0.3 转录子 /CFU 结核分枝杆菌下降到 0.02 转录子 /CFU,且这一低水平在感染后持续至少达 100 天。因此在感染后 2 周的任何时间点,少于 2% 的细菌积极地表达 Ag85B (同前)。Ag85B 的低表达由以下支持:感染后 3 周或之后肺中能够响应于 Ag85B 产生 IFN- γ 的 T 细胞数目快速下降。

[0010] 相反,一些抗原贯穿不同感染阶段更稳定地(组成型)表达,一个实例是 ESAT6。在最初感染阶段后,ESAT-6 表达水平稳定在 0.8 转录子 /CFU 结核分枝杆菌。这是比 Ag85B 高得多的转录水平,这一水平稳定地保持达感染后至少 100 天(Rogerson, BJ 等 2006)。再一次地,转录数据被免疫数据支持,免疫数据显示在感染后期阶段在感染部位, T 细胞对 ESAT-6 的强的识别(同前)。这一组成型表达模式是个重要特征,说明这些分子实现对于病原体至关重要的必需功能,这些功能依赖于需要组成型表达以使病原体在免疫宿主中存活的基因。这些分子是本发明的基础,对于向潜伏感染个体施用的疫苗是尤其重要的抗原,因为它们靶向细菌生命周期的所有阶段,因而具有尽可能宽的活性基础。这与集中于鉴定在非复制持续期间被分枝杆菌上调的抗原的现有思路不同(Andersen, P. 2007、W002048391、W004006952、Lin MY 和 Ottenhoff TH2008 ;Leyten EM. 等 2006)。尽管这些抗原在非复制持续期间被上调,它们可能不总是免疫识别可获得的,因为从非复制细菌可获得的量低于检测或触发保护性免疫效应功能的合理阈值。

[0011] 相反,来自 ESX-1 分泌系统的多种蛋白已经显示为高度免疫原性和以高水平表达。ESX-1 在多种病原性分枝杆菌中是保守的,并参与结核杆菌(tubercle bacilli)的毒性。个体 ESX-1 蛋白在分泌 ESAT-6、CFP10 和 EspA 中的贡献已被充分记载(Pym AS 等 2003 ;Guinn KI 等, 2004 ;Stanley, SA 等 2003 ;Brodin, P. 等 2006 ;MacGurn JA 等 2005 ;Raghavan, S. 等 2008),效应分子的功能已显示为膜裂解,从吞噬体逃逸和细菌扩散(Gao LY 等 2004 ;Smith J. 等 2008)。

[0012] 控制潜伏性感染的免疫应答的所有特性和引起再活化的因素基本上是未知的。然而,有一些证据证明与主导细胞类型的转变有关。虽然 CD4T 细胞对急性期的感染控制是必要的和足够的,但研究揭示 CD8T 细胞反应在潜伏期更为重要(van Pinxteren LA 等. 2000)。

[0013] 本领域的技术人员将会容易地理解,一种基因的表达不足以使其成为一种好的候选疫苗。确定一种蛋白在结核分枝杆菌潜伏感染期间是否被免疫系统识别的唯一方法是制备出这种给定的蛋白,并按照这里描述的适当试验对该蛋白进行测试。在这方面,我们的研究组已经证实,被分枝杆菌强表达的抗原诸如 ESAT-6 (早期分泌抗原靶 -6) 在所有感染阶

段个体中被识别,事实上尤其在潜伏感染个体中被识别(Boesen, Ravn, Doherty2002)。然而在自然感染期间引发的 ESAT-6 特异性 T 细胞虽然可能大量存在,但作为抵抗传染病的保护性 T 细胞,它们几乎全部是所谓的效应表型,即具有非常有限的寿命和低活性的终末分化 T 细胞(Seder R, 等 2008)。这显著不同于本研究中证实的防止 TB 的再激活的疫苗促进的高质量、所谓的多功能 T 细胞。

[0014] 它远不同于可用作接触后疫苗的所有高表达和免疫原性的蛋白,因为许多这种蛋白将引发超敏反应,反而恶化情况。这在 Kock 的原始结核菌素疫苗的临床试验中清楚地证实。疫苗作为接触后疫苗向患有不同形式疾病包括皮肤 TB 和肺部 TB 的患者提供。试验完全失败,参与的几个患者因为严重的超敏反应而死亡(Guttstadt A. 1891)。在数百种已知在初次感染期表达并作为疫苗被测试的抗原中,少于半打的抗原表现出明显的潜力。迄今为止仅有一种抗原已经被证实具有作为接触后疫苗的所有潜质(Lowrie, 1999)。然而这个疫苗仅在作为 DNA 疫苗(目前还未被批准用于人类的实验技术)施用时起作用。而且,该技术被证明是有争议的,因为其它研究组声称使用该方案接种疫苗诱导了非特异性的保护或甚至使疾病恶化(Turner, 2000)。

[0015] 因此,防止感染个体的疾病再激活的有效接触后接种策略是高度期望的。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及由可向潜伏感染个体施用以通过靶向组成型表达的抗原诸如 ESAT6、CFP10 和 EspA 预防结核病复合群微生物物种(结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌)引起的潜伏结核病感染的再激活的疫苗治疗结核病复合群物种(结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌)引起的感染。ESAT6、CFP10 和 EspA 相互依赖地都是分泌所需的,都属于已知是毒性必需的 ESX-1 分泌系统。这些分泌的抗原对于细菌散播和裂解细胞膜是决定性的。ESAT6、CFP10 和 EspA 也是在疾病不同阶段组成型表达的抗原 - 而例如 Ag85 的表达在感染后立刻被下调。令人惊讶地,免疫原性、组成型表达的抗原当作为接触后疫苗施用预防潜伏结核病感染的再激活,从而保持感染潜伏。

[0018] 本发明的第一方面涉及一种疫苗或免疫原性组合物,所述疫苗或免疫原性组合物接触后地施用于潜伏感染个体,预防结核病的再激活,所述疫苗或免疫原性组合物包含在结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)感染期间组成型表达的抗原或编码所述抗原的核酸。

[0019] 在一些实施方案中,所述组成型表达的抗原可属于 ESX-1 分泌系统,选自以下组成的组:

[0020] i) SEQ ID NO. 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、32、33 和 34;

[0021] ii) (i) 中任一序列的免疫原性部分,如, T 细胞表位;和

[0022] iii) 与 (i) 或 (ii) 中任一序列具有至少 70% 序列同一性且同时具有免疫原性的氨基酸序列类似物。

[0023] 在一些实施方案中,所述组合物可包含免疫原性部分的混合物,诸如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或 13 种免疫原性部分的混合物。

[0024] 在一些实施方案中,所述抗原选自以下组成的组:SEQ ID NO. 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 和 31。

[0025] 在一些实施方案中,所述多肽可与分枝杆菌科的细菌表达的抗原融合。

[0026] 在一些实施方案中,所述融合配偶体可以是组成型表达的抗原。

[0027] 在一些实施方案中,所述组合物可包含与 CFP10 融合的 ESAT6。

[0028] 在一些实施方案中,所述组合物可包含选自以下的另外的递送系统:活的重组疫苗,即基因修饰的生物体诸如表达分枝杆菌基因的细菌或病毒;免疫原性递送系统,诸如 DNA 疫苗,即表达上述蛋白的基因或基因片段的质粒;蛋白疫苗,即在递送系统诸如佐剂中递送的蛋白本身或来源于蛋白本身的合成肽。

[0029] 在一些实施方案中,所述佐剂可包含 DDA/TDB 和 / 或聚 I:C。

[0030] 在一些实施方案中,所述氨基酸序列可被脂化以允许所述多肽的自佐剂作用。

[0031] 本发明的第二方面涉及一种选自以上第一方面中定义的组的抗原,所述抗原用于治疗潜伏结核病。

[0032] 本发明的第三方面涉及一种治疗动物包括人类的由毒性分枝杆菌,例如,由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、非洲分枝杆菌(*Mycobacterium africanum*)或牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)引起的结核病感染的再激活的方法,所述方法包括向动物施用本申请第一方面的疫苗或免疫原性组合物。

[0033] 在一些实施方案中,所述疫苗或免疫原性组合物可在感染后诸如急性感染阶段期间或急性感染阶段之后和 / 或潜伏感染阶段期间施用。

[0034] 在一些实施方案中,所述方法可包括鉴定潜伏感染毒性分枝杆菌的受治疗者的步骤。

[0035] 在一些实施方案中,所述潜伏感染毒性分枝杆菌的受治疗者可以以诸如以下的诊断方案鉴定:Mantoux 结核菌素皮肤试验(TST)、Quantiferon 试验、体外检测对 HBHA 的响应或在以组成型表达的抗原刺激后检测 IP10。

[0036] 本发明的第四方面涉及选自以上第一方面中定义的组的抗原用于制备接触后疫苗的用途,所述接触后疫苗抵抗由结核病复合群的物种如结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和非洲分枝杆菌引起的潜伏感染的再激活。

[0037] 在一些实施方案中,所述疫苗可以是用于感染后诸如急性感染阶段期间或急性感染阶段之后和 / 或潜伏感染阶段期间施用。

[0038] 在一些实施方案中,所述疫苗可包含以上第一方面中定义的免疫原性部分。

[0039] 发明详述

[0040] 本发明公开一种疫苗或免疫原性组合物,所述疫苗或免疫原性组合物接触后地施用于潜伏感染个体,预防结核病的再激活,所述疫苗或免疫原性组合物包含在结核分枝杆菌感染期间组成型表达的抗原或编码所述抗原的核酸。

[0041] 优选地所述组合物包含属于 ESX-1 分泌系统的组成型表达的抗原, ESAT6 (SEQ ID NO. 1)、CFP10 (SEQ ID NO. 2)、EspA (SEQ ID NO. 3)、Rv3614c (SEQ ID NO. 4)、Rv3615c (SEQ ID NO. 5)、EspR (SEQ ID NO. 6)、Rv3868 (SEQ ID NO. 7)、Rv3869 (SEQ ID NO. 8)、Rv3870 (SEQ ID NO. 9)、Rv3871 (SEQ ID NO. 10)、Rv3872 (SEQ ID NO. 11)、Rv3873 (SEQ ID NO. 12)、Rv3876 (SEQ ID NO. 13)、Rv3877 (SEQ ID NO. 14)、Rv3878 (SEQ ID NO. 15)、Rv3879c (SEQ ID NO. 16)、Rv3880c (SEQ ID NO. 17)、Rv3881c (SEQ ID NO. 18)、Rv3882c (SEQ ID NO. 32)、Rv3883c (SEQ ID NO. 33)、Rv3865c (SEQ ID NO. 34);或这些序列中任一序列的免疫原性部分,如 T 细胞表位;或与任一序列具有至少 70% 序列同一性且同时具有免疫原性的氨基酸序列类似物。

[0042] 可选地,所述组合物包含免疫原性部分的混合物,所述免疫原性部分优选地选自以下组成的组:SEQ ID NO. 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 和 31。

[0043] 本发明的另一实施方案是组合物,其中所述多肽与分枝杆菌科的细菌表达的抗原融合,优选地其中所述融合配偶体是组成型表达的抗原。优选的融合蛋白包含与 CFP10 融合的 ESAT6。

[0044] 根据本发明的组合物优选地包含选自以下的另外的递送系统:活的重组疫苗,即基因修饰的生物体诸如表达分枝杆菌基因的细菌或病毒;免疫原性递送系统,诸如 DNA 疫苗,即表达上述蛋白的基因或基因片段的质粒;蛋白疫苗,即在递送系统诸如佐剂中递送的蛋白本身或来源于蛋白本身的合成肽。佐剂优选地选自以下组成的组:二甲基双十八烷基溴化铵(dimethyldioctadecylammonium bromide) (DDA)、Quil A、聚 I:C、氢氧化铝、弗氏不完全佐剂、IFN- γ 、IL-2、IL-12、单磷酸脂质 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)、海藻糖二山萸酸酯(dibehenate) 和胞壁酰二肽(MDP),最优选地促进多功能 T 细胞应答的佐剂诸如 DDA/TDB 和 IC31。最优选的佐剂包含 DDA/TDB 和 / 或聚 I:C。可选地所述氨基酸序列被脂化以允许所述多肽的自佐剂作用(self-adjuvanting effect)。

[0045] 本发明还公开用于治疗潜伏结核病和预防感染的再激活的上述抗原。

[0046] 一种治疗动物包括人类的由毒性分枝杆菌,如,由结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌或牛分枝杆菌引起的结核病感染的再激活的方法,所述方法包括向动物施用上述的疫苗或免疫原性组合物,其中所述疫苗或免疫原性组合物在感染后,诸如急性感染阶段期间或急性感染阶段之后和 / 或潜伏感染阶段期间施用。

[0047] 所述方法可包括如以诸如以下的诊断方案鉴定潜伏感染毒性分枝杆菌的受治疗者的步骤:Mantoux 结核菌素皮肤试验(TST)、Quantiferon 试验、体外检测对 HBHA 的响应或以组成型表达的抗原刺激后检测 IP10。

[0048] 本发明还公开上述抗原用于制备接触后疫苗或免疫原性组合物的用途,所述接触后疫苗或免疫原性组合物抵抗由结核病复合群物种如结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和非洲分枝杆菌引起的潜伏感染的再激活,其中所述疫苗或免疫原性组合物是用于感染后诸如急性感染阶段期间或急性感染阶段之后和 / 或潜伏感染阶段期间施用并包含一种或多种上述的免疫原性部分。

[0049] 分枝杆菌作为病原体的成功是因为它与其宿主相互作用的复杂和精巧方式 - 部分地由专门的 ESX-1 细菌蛋白 - 分泌系统控制的过程。ESX-1 系统递送细菌蛋白(例如 ESAT-6、CFP10 和 EspA) 到宿主细胞,这对于毒性是关键。从杆菌分泌后,ESAT-6 蛋白在吞噬体膜上形成孔,允许杆菌逃离吞噬体限制而进入胞质,从而促进细胞间扩散。

[0050] 组成型表达模式是个重要特征,说明这些分子实现对于病原体至关重要的必需功能,这些功能依赖于需要组成型表达以使病原体在免疫宿主中存活的基因。这些分子是本发明的基础,对于向潜伏感染个体施用的疫苗是尤其重要的抗原,因为它们靶向细菌生命周期的所有阶段,因而具有尽可能宽的活性基础。

[0051] ESAT6、CFP10 和 EspA 相互依赖地都是分泌所需的,都属于已知是毒性必需的 ESX-1 分泌系统。这些分泌的抗原对于细菌散播和裂解细胞膜是决定性的。ESAT6、CFP10 和 EspA 也是在疾病不同阶段组成型表达的抗原 - 而例如 Ag85 的表达在感染后立刻被下调。免疫原性、组成型表达的抗原当作为治疗疫苗施用时预防潜伏结核病感染的再激活,从

而保持感染潜伏。

[0052] 定义

[0053] 多功能 T 细胞

[0054] 术语多功能 T 细胞被理解为同时表达所有细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α ，或 IL-2 加另外两种细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α 的至少一种的 T 细胞。

[0055] 多肽

[0056] 单词“多肽”在本发明中具有其通常的含义。即任何长度的氨基酸链，包括全长蛋白、寡肽、短肽及其片段，其中氨基酸残基经由共价的肽键连接。

[0057] 多肽可以是经化学修饰的，被糖基化、脂化（例如 Mowat 等 1991 年所述的用棕榈酰基氧基琥珀酰亚胺或 Lustig 等 1976 年所述的用十二烷酰氯化学脂化（lipidation））、包含辅基或者包含另外的氨基酸如组氨酸标签或信号肽。

[0058] 因此，每一多肽可由具体的氨基酸表征并由具体的核酸序列编码。应理解，这种序列包括重组或合成方法制备的类似物和变体，其中这种多肽序列已经通过重组多肽中一个或多个氨基酸残基的取代、插入、添加或者缺失而被修饰，但在这里所描述的任何生物检测中仍具有免疫原性。取代优选是“保守性的”。这些保守性取代根据下表定义。在第二列相同单元格里的氨基酸和优选在第三列相同行中的氨基酸，可以彼此取代。第三列中的氨基酸由单字母代码表示。

[0059]	脂肪族	非极性	GAP
			ILV
		极性-不带电	CSTM
			NQ
		极性-带电	DE
			KR
	芳香族		HFYW

[0060] 本发明的优选多肽是当结核分枝杆菌经受潜伏感染带来的压力时，从该生物体产生的免疫原性抗原。这样的抗原还可例如来源于结核分枝杆菌细胞和 / 或结核分枝杆菌培养物滤液。如此，包含以上抗原之一的免疫原性部分的多肽可完全由免疫原性部分组成，或可包含另外的序列。另外的序列可以来源于天然的结核分枝杆菌抗原或者是异源的，且这种序列可以但并非必需具有免疫原性。

[0061] 每一多肽由具体的核酸序列编码。应理解，这种序列包括其中这种核酸序列已经通过一个或多个核酸的取代、插入、添加或缺失而被修饰的类似物和其变体。在密码子使用中，取代优选是沉默取代，从而不会引起氨基酸顺序的任何一种改变，但可以被引入以提高蛋白质的表达。

[0062] 在本发明上下文中，术语“基本上纯的多肽片段”指多肽制品，其包含至多 5% 重量

的天然伴随所述多肽的其它多肽物质(较低百分数的其它多肽物质是优选的,例如至多 4%、至多 3%、至多 2%、至多 1% 和至多 0.5%)。优选基本上纯的多肽是至少 96% 纯的,即多肽存在于制品中的总的多肽物质重量的至少 96%,并优选更高的百分数,例如至少 97%、至少 98%、至少 99%、至少 99.25%、至少 99.5% 和至少 99.75%。特别优选多肽片段是“基本上纯的形式”,即多肽片段基本上不含天然伴随它的任何其它抗原,也就是不含有来自属于结核病复合群或毒性分枝杆菌的细菌的任何其它抗原。这可以通过在非分枝杆菌宿主细胞中经重组方法制备多肽片段实现,如以下将详细描述的一样,或通过公知的固相或液相肽合成方法例如通过 Merrifield 描述的方法或其变化形式合成多肽片段。为了本发明的目的,应理解以上定义“基本上纯的多肽或多肽片段”不排除与分枝杆菌或非分枝杆菌来源的其他纯化或合成抗原组合存在的多肽或多肽片段。

[0063] 术语“毒性分枝杆菌”理解成能引起动物或者人中结核疾病的细菌。毒性分枝杆菌的例子包括但不限于结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌和牛结核杆菌。相关动物的例子是牛、负鼠、獾和袋鼠。

[0064] “感染个体”被理解成通过培养或者显微镜检查证实感染了毒性分枝杆菌的个体,和/或临床上诊断有 TB 并对抗 -TB 化疗有反应的个体。培养、显微镜检查和临床诊断 TB 为本领域任何技术人员所熟知。

[0065] 术语“PPD 阳性个体”被理解为具有阳性 Mantoux 试验的个体、或其中 PPD (纯化的蛋白衍生物) 引起由 IFN- γ 的释放确定的阳性体外回忆应答的个体。

[0066] “潜伏感染个体”被理解为已被毒性分枝杆菌如结核分枝杆菌感染,但未显示活跃结核病体征的个体。已被接种疫苗如 BCG,或已被治疗 TB 的个体可能仍在体内保留分枝杆菌,而这目前是不可能证明的,因为这样的个体如果检验 PPD 反应性将预计是阳性的。然而,以其最准确的含义,“潜伏感染”可用于描述其组织中驻留结核分枝杆菌但临床上未发病的任何个体。潜伏感染个体可由目前临床使用的大量方法鉴定,诸如 Mantoux 结核菌素皮肤试验(TST)、Quantiferon 试验,未来可能存在甚至更灵敏的诊断这一特定感染阶段的手段,诸如近来提出的体外检测对 HBHA 的响应(Hougardy2007)或在以 ESAT6 体外刺激后检测 IP10 (Ruhwald2008)。

[0067] 术语“再激活”被理解为这样的情况,其中非复制细菌(因为位于胞内,免疫系统可能难以检测到它们)与试图适应在免疫宿主中遇到的敌对环境而具有活性但改变的表达谱的缓慢复制细菌之间的平衡向利于病原菌倾斜而感染进入该阶段,其中细菌又开始快速复制,感染个体中的细菌数目增加。在潜伏感染个体中、在非常强的免疫压力下复制的这些细菌是本发明接种策略的靶。

[0068] 术语“IFN- γ ”被理解为干扰素- γ 。IFN- γ 的测量用作免疫应答的指示。

[0069] 术语“核酸片段”和“核酸序列”被理解成任何一种核酸分子,包括 DNA、RNA、LNA (锁核酸, locked nucleic acid)、PNA、RNA、dsRNA 和 RNA-DNA 杂合体。还包括含有非天然存在的核苷酸的核酸分子。该术语包括取决于用途的任何长度的核酸分子,例如从 10 到 10000 个核苷酸。当核酸分子被用作例如在 DNA 治疗中的药品,或者用于制备根据本发明多肽的方法中时,优选使用编码至少一种表位的分子,其长度从约 18 到约 1000 个核苷酸,所述分子可任选地插入载体中。

[0070] 贯穿于说明书的全部,除非上下文另外要求,否则单词“包含/包括(comprise)”

或者其变化形式如“包含 / 包括 (comprises)” 或者 “包含 / 包括 (comprising)”, 将被理解成表示内含所称的组成部分或者整数或者组成部分或整数的组但不排除任何其它的组成部分或整数或组成部分或整数的组。

[0071] 组成型表达的基因定义为在感染后 3 周之后的时间点, 经群体水平详细分析 mRNA, 与肺中结核分枝杆菌 CFU 数目关联后, 在肺中体内表达同样好的基因。从这一定义推断, 组成型基因可能在单个细菌水平差异地表达。定量基因表达的方法是定量 PCR。“同样好” 定义为在此前测量的水平 ± 5 倍之内。比较通常是与在现在之前紧接着的时间点。各次测量之间的时间间隔不能长于感染时间与此前测量之间的时间间隔。例如, 如果基因的表达在感染后第 3 周第一次测量, 则第二次测量不能晚于感染后 6 周进行, 第三次测量不能晚于感染后 12 周进行, 等等。

[0072] 组成型表达的抗原是为组成型表达的基因的产物的多肽或这些多肽的部分。

[0073] 序列同一性

[0074] 术语“序列同一性”指两个等长的氨基酸序列或两个等长的核苷酸序列之间同源性程度的定量的度量标准。待比较的两个序列必须被比对成最佳可能的吻合, 允许插入空位或者在蛋白序列末端截短。序列同一性可以通过公式 $(N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}}) 100 / N_{\text{ref}}$ 计算, 其中 N_{dif} 是比对时两个序列中不同残基的总数, 其中 N_{ref} 是两个序列之一的残基的数量。因此, DNA 序列 AGTCAGTC 与序列 AATCAATC 具有 75% 的序列同一性 ($N_{\text{dif}}=2$ 和 $N_{\text{ref}}=8$)。空位被算作是具体残基的不一致, 即 DNA 序列 AGTGTC 与 DNA 序列 AGTCAGTC 将有 75% 的序列同一性 ($N_{\text{dif}}=2$ 和 $N_{\text{ref}}=8$)。序列同一性另外可以通过 BLAST 程序例如 BLASTP 程序 (Pearson, 1988 或 www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST) 计算。在本发明的一个方面, 比对是用序列对比方法 ClustalW、采用如 Thompson J. 等 1994 年描述的缺省参数进行的, 这些可以通过网址 <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/> 获得。

[0075] 优选序列同一性的最低百分数是至少 80%, 例如至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 和至少 99.5%。

[0076] 免疫原性部分

[0077] 在本发明的一个优选实施方案中, 多肽包含多肽的免疫原性部分如 B 细胞或 T 细胞表位。

[0078] 多肽的免疫原性部分是多肽的一部分, 其引起动物或者人中和 / 或由这里描述的任一生物实验测定的生物样品的免疫应答。多肽的免疫原性部分可能是 T 细胞表位或 B 细胞表位。免疫原性部分可以涉及多肽的一个或者几个相对小的部分, 它们可以分散于多肽序列或者位于多肽特定的部分中。对于一些多肽而言, 甚至已经证实表位分散于多肽的全部序列 (Ravn 等, 1999)。为了鉴定免疫应答期间被识别的相关 T 细胞表位, 有可能使用重叠寡肽用于探测 II 类 MHC 表位, 优选合成的、长度例如 20 个的来自于多肽的氨基酸残基的寡肽。这些肽可以在生物学分析 (例如这里描述的 IFN- γ 分析) 中被测定, 并且它们中的一些将产生阳性反应 (因此是免疫原性的), 这种反应是肽中存在 T 细胞表位的证据。对于 ESAT-6 和 CFP10, 这种研究已经显示抗原的每个部分包含 T 细胞表位 (Mustafa 等 2000, Arend SM 等 2000)。为了检测 I 类 MHC 表位, 可能预测那些将会结合的肽 (Stryhn 等, 1996), 之后合成制备出这些肽并在相关的生物学分析如这里描述的 IFN- γ 检测中进行测试。肽优选具有例如 8 到 11 个长度的来源于多肽的氨基酸残基。可以通过如 Harboe 等

1998 年描述的分析 B 细胞对覆盖感兴趣多肽的重叠肽的识别来确定 B 细胞表位。与此定义一致的是, 本文描述的多肽的免疫原性部分可被鉴定为引发免疫应答的部分, 参见下文对“免疫应答”的定义。

[0079] 尽管 T 细胞表位的最短长度已显示为至少 6 个氨基酸, 这种表位由更长的氨基酸段组成是正常的。因此, 优选地, 本发明的多肽片段长度为至少 7 个氨基酸残基, 诸如至少 8、至少 9、至少 10、至少 12、至少 14、至少 16、至少 18、至少 20、至少 22、至少 24 和至少 30 个氨基酸残基。因此, 在本发明方法的重要实施方案中, 优选多肽片段具有至多 50 个氨基酸残基诸如至多 40、35、30、25 和 20 个氨基酸残基的长度。预计长度为 10 至 20 个氨基酸残基的肽被证明是最有效地作为 II 类 MHC 表位, 因此本发明方法中使用的多肽片段的尤其优选长度是 18, 诸如 15、14、13、12 和甚至 11 个氨基酸残基。预计长度为 7 至 12 个氨基酸残基的肽被证明是最有效地作为 I 类 MHC 表位, 因此本发明方法中使用的多肽片段的尤其优选长度是 11, 诸如 10、9、8 和甚至 7 个氨基酸残基。

[0080] 多肽的免疫原性部分可以被遗传上不均一人群的大部分(高频率)或者小部分(低频率)识别。另外, 一些免疫原性部分诱导高免疫应答(优势的), 而其它的则诱导较低的但是仍然有效的应答(亚优势的)。高频率 > 低频率可与广泛分布的 MHC 分子(HLA 型)结合的乃至被多个 MHC 分子结合的免疫原性部分相关(Sinigaglia, 1988, Kilgus, 1991)。

[0081] 然而在为抵抗结核病的新疫苗提供候选分子的背景中, 亚优势的表位与优势的表位同样相关, 因为已经显示(Olsen, 2000), 这样的表位可诱导保护, 而不论其未被强烈地或广泛地识别的事实。

[0082] 变体

[0083] 本发明多肽的共同特征是如实施例中举例说明的, 它们诱导免疫应答的能力。当然, 通过取代、插入、添加或者缺失制备的本发明多肽的变体也可以具有免疫原性, 如任何这里描述的检测测定的。

[0084] 免疫个体

[0085] 免疫个体被定义成已经清除或控制了毒性分枝杆菌的感染或已经接受了诸如牛分枝杆菌 BCG 接种的预防性接种的人或动物。

[0086] 免疫应答

[0087] 免疫应答可以通过以下方法之一监测:

[0088] • 体外的细胞反应通过诱导相关细胞因子例如 IFN- γ 从淋巴细胞释放或者通过诱导淋巴细胞的增殖来确定, 所述淋巴细胞取自当前或者以前感染毒性分枝杆菌或被相关多肽免疫的动物或者人。诱导是通过添加多肽或者多肽的免疫原性部分到含有 2×10^5 个细胞到 4×10^5 个细胞每孔的悬浮液中进行的。细胞分离自血液、脾、肝或者肺, 添加多肽或者免疫原性部分至浓度不超过 $20 \mu\text{g/ml}$ 悬浮液, 刺激进行二到五天。为了监测细胞增殖, 细胞用放射性标记的胸苷脉冲, 孵育 16-22 小时后, 通过液体闪烁计数检测增殖。阳性反应定义为大于背景值加上两个标准偏差的反应。IFN- γ 的释放可以通过本领域技术人员熟知的 ELISA 方法确定。阳性反应是大于背景值加上两个标准偏差的反应。在监测对多肽的免疫应答时, IFN- γ 以外的细胞因子如 IL-12、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-6、TGF- β 也是相关的。用于检测免疫应答的另一个更灵敏的方法是 ELISpot 方法, 其中确定 IFN- γ 产生细胞的频率。在预包被抗鼠 IFN- γ 抗体(PharMingen)的 ELISpot 板(MAHA, Millipore)

中,将分离自血液、脾或者肺的梯度数量的细胞(通常 1×10^5 到 4×10^5 细胞 / 孔)在存在浓度不超过 $20 \mu\text{g/ml}$ 的多肽或者免疫原性部分下孵育 24-32 个小时。板随后与生物素化的抗-IFN- γ 抗体孵育,然后与链霉亲和素-碱性磷酸酶孵育。通过加入 BCIP/NBT (Sigma) 来鉴定 IFN- γ 产生细胞,该相关底物产生斑点。这些斑点可以使用解剖显微镜来计数。也可能通过使用 PCR 技术确定编码相关细胞因子的 mRNA 的存在。通常一种或多种细胞因子将利用如 PCR、ELISPOT 或者 ELISA 测定。本领域技术人员可以理解,由特定多肽诱导的任何所述细胞因子量的显著增加或减少可被用于评定多肽的免疫活性。

[0089] • 还可以通过利用来源于免疫个体或结核分枝杆菌感染者的 T 细胞系来确定体外的细胞反应,其中所述 T 细胞系已经由活的分枝杆菌、细菌细胞提取物或培养物滤液外加 IL-2 启动了 10 到 20 天。通过添加不超过 $20 \mu\text{g/ml}$ 悬浮液的多肽到含有 1×10^5 个细胞至 3×10^5 个细胞每孔的 T 细胞系并进行两到六天孵育来进行诱导。IFN- γ 的诱导或其它相关细胞因子的释放通过 ELISA 检测。对 T 细胞的刺激还可以通过使用如上所述的放射性标记的胸苷检测细胞增殖进行监测。对于两种检测而言,阳性反应是大于背景值加上两个标准偏差的反应。

[0090] • 在对临床上或者亚临床上感染了毒性分枝杆菌的个体进行皮内注射或者局部应用贴片(patch)至多 $100 \mu\text{g}$ 多肽或者免疫原性部分后,如果在注射或者应用后 72-96 小时产生了至少 5mm 直径的阳性反应,则体内的细胞反应可以被确定为阳性 DTH 反应。

[0091] • 通过免疫个体或者被感染个体中的特异性抗体反应,可以确定体外的体液反应。存在的抗体可以通过 ELISA 技术或者蛋白质印迹测定,其中多肽或者免疫原性部分被吸附至硝酸纤维膜或者聚苯乙烯的表面。血清优选用 PBS 稀释,稀释比例从 1:10 至 1:100,并被添加到已被吸附的多肽上,孵育进行 1 到 12 个小时。通过利用标记的第二抗体,如通过 ELISA 经测定 OD 可以确定特定抗体的存在,其中阳性反应是大于背景值加上两个标准偏差的反应,或者可选地通过蛋白质印迹中的可视反应来确定特定抗体的存在。

[0092] • 另一个相关参数是用存在于佐剂中的多肽接种之后或者 DNA 接种后动物模型中所诱导的保护的测量。适合动物模型包括经毒性分枝杆菌的感染激发的灵长类、豚鼠或者小鼠。诱导的保护的读数可以是靶器官中相对于未接种动物减少的细菌负荷、相对于未接种动物延长的存活时间和相对于未接种动物减少的重量损失。

[0093] 制备方法

[0094] 通常,结核分枝杆菌抗原、编码这种抗原的 DNA 序列可以使用各种各样的方法中的任何一种制备。

[0095] 它们可以通过如上述的方案从结核分枝杆菌细胞或培养物滤液纯化为天然蛋白。免疫原性抗原还可以使用编码该抗原的 DNA 序列重组制备,其中 DNA 序列被插入表达载体中并在适合的宿主中表达。宿主细胞的例子为大肠杆菌。具有少于约 100 个氨基酸和通常少于 50 个氨基酸的多肽或其免疫原性部分还可以被合成制备,并可以使用本领域普通技术人员所熟知的技术产生,例如市售可供的固相技术,该技术是向生长的氨基酸链上按顺序加入氨基酸。

[0096] 在构建和制备定义用于 DNA 接种的编码多肽的质粒 DNA 时,可使用宿主菌株诸如大肠杆菌(E. coli)。然后可从携带目的质粒的宿主菌株培养物制备质粒 DNA,使用如,包括内毒素去除步骤的 Qiagen Giga- 质粒纯化试剂盒(Qiagen, Santa Clarita, CA, USA)纯化。

优选用于 DNA 接种的质粒 DNA 不含内毒素。

[0097] 融合蛋白

[0098] 免疫原性多肽还可以制备为融合蛋白,通过该方法可以获得本发明多肽优越的特性。例如,在重组制备时促进多肽输出(export)的融合配偶体、促进多肽纯化的融合配偶体和提高本发明多肽片段的免疫原性的融合配偶体均是感兴趣的可能性。因此,本发明还涉及含有至少一种以上定义的多肽或免疫原性部分和至少一种融合配偶体的融合多肽。为了增强免疫原性,融合配偶体可以是来源于结核分枝杆菌的另一种多肽,诸如来源于属于结核病复合群的细菌的多肽片段,诸如 ESAT-6、CFP10、EspA、TB10.4、RD1-ORF5、RD1-ORF2、Rv1036、MPB64、MPT64、Ag85A、Ag85B (MPT59)、MPB59、Ag85C、19kDa 脂蛋白、MPT32 和 α -晶体蛋白,或上述任一抗原的至少一个 T 细胞表位(Skjøt 等 2000 ;W00179274 ;W00104151 ;美国专利申请 09/0505,739 ;Rosenkrands 等 1998 ;Nagai 等 1991)。本发明还涉及包括两种或多种本发明的多肽(或其免疫原性部分)的相互融合物的融合多肽。其它能提高产物免疫原性的融合配偶体有淋巴因子,例如 IFN- γ 、IL-2 和 IL-12。为了促进表达和/或纯化,融合配偶体可以例如,是细菌菌毛蛋白(fimbrial protein),例如菌毛组分菌毛素(pilin)和 papA ;蛋白 A ;ZZ-肽(ZZ-融合体由瑞典 Pharmacia 销售);麦芽糖结合蛋白;谷胱甘肽(glutathione)S-转移酶; β -半乳糖苷酶;或聚-组氨酸。融合蛋白可以在宿主细胞如大肠杆菌中重组生产,在不同的融合配偶体间诱导形成一个连接区域也是可行的。

[0099] 其他感兴趣的融合配偶体是被脂化使得免疫原性多肽以一种适合的方式存在于免疫系统中的多肽。这种效果是例如从如 W096/40718A 中所描述的基于包柔氏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)OspA 多肽的疫苗或基于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)OprI 脂蛋白的疫苗(Cote-Sierra J,1998)获知的。另一个可能性是在免疫原性多肽 N 末端融合已知的信号序列和 N 末端半胱氨酸。当在适合的生产宿主中制备时,这种融合引起免疫原性多肽在 N-末端半胱氨酸处的脂化。

[0100] 用途

[0101] 疫苗

[0102] 疫苗是建立或改进对具体疾病的免疫的生物制品。疫苗可以是预防性的(如,预防或改善未来被任何天然或“野生”病原体感染的作用)、接触后的(如,预防无临床症状的潜伏感染个体中的再激活)或治疗性的(如,用于单独或为缩短治疗与抗生素疗法联合治疗活跃疾病的疫苗)。

[0103] 用于潜伏 TB 的动物模型

[0104] 为了以结核分枝杆菌诱导低等级的潜伏感染,利用正常剂量的结核分枝杆菌(肺中大约 150 个细菌)首先对动物提供气雾剂感染。感染 6 周后,然后对动物提供次优的 6 周化疗,在此期间大多数-但并非所有-细菌被根除。剩余细菌将建立潜伏感染。化疗后一些动物被接种疫苗以检查疫苗预防潜伏感染再激活的能力,再激活将在化疗后 5-15 周自发地发生。参见图 2。

[0105] 蛋白疫苗

[0106] 本发明的另一部分涉及包含本发明多肽(或其至少一个免疫原性部分)或融合多肽的疫苗组合物。为了确保这种疫苗组合物的最佳性能,优选它包含免疫学上和药学上可接受的载体、赋形物或者佐剂。

[0107] 相对于未接种疫苗的动物,其中本发明多肽被动物识别的有效疫苗在动物模型中能够在毒性分枝杆菌攻击后减少靶器官内的细菌负荷,延长存活时间和/或减少重量损失。

[0108] 适合的载体选自由以下组成的组:(多个)多肽经疏水的非共价相互作用结合的聚合物,所述聚合物比如塑料,如聚苯乙烯,或(多个)多肽共价结合的聚合物,如多糖或者多肽如牛血清清蛋白、卵清蛋白或者匙孔青贝(keyhole limpet)血蓝蛋白。适合的赋形物选自稀释剂和悬浮剂所组成的组。佐剂优选选自下列所组成的组:二甲基双十八烷基溴化铵(DDA)、Quil A、聚 I:C、氢氧化铝、弗氏不完全佐剂、IFN- γ 、IL-2、IL-12、单磷酸脂质 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)、海藻糖二山嵛酸酯和胞壁酰二肽(MDP)。

[0109] 包含肽序列作为活性成分的疫苗的制备是本领域通常所知晓的,如美国专利 4,608,251、4,601,903、4,599,231 和 4,599,230 中例举的,它们全部被引入本文作为参考。

[0110] 用于获得疫苗佐剂效果的其它方法包括使用试剂,诸如使用氢氧化铝或者磷酸铝(明矾),糖的合成聚合物(聚羧乙烯(Carbopol)),通过热处理使疫苗中蛋白凝聚,通过胃蛋白酶处理的白蛋白(Fab)抗体再活化的凝聚,与细菌细胞如微小隐孢子虫(*C. parvum*)或者内毒素或者革兰氏阴性细菌的脂多糖成分相混合,在生理学上可接受的油类赋形物如二缩甘露醇(mannide)单油酸酯(Aracel A)中进行乳化或者与作为封闭替代物(block substitute)的 20% 全氟化碳溶液(全氟萘烷和全氟三丙胺混合乳剂(Fluosol-DA))乳化。其它的可能包括使用免疫调节物质如细胞因子或者合成 IFN- γ 诱导物如与上述佐剂结合的聚 I:C。

[0111] 实现佐剂效果的另一种感兴趣的可能性是使用 Gosselin 等 1992 年描述的技术(将其引入这里作为参考)。简言之,相关抗原诸如本发明的抗原可以与抗单核细胞/巨噬细胞上的 Fc γ 受体的抗体结合(或结合抗原的抗体片段)。

[0112] 疫苗以与剂量配方相容的方式施用,施用的量例如将是免疫原性的并有效预防再激活。施用的量取决于治疗的受试者,包括如引发免疫应答的个体免疫系统的能力和所需的防护程度。适合的剂量范围具有每次接种几百微克活性成分的数量级,优选从约 0.1 μ g 到 1000 μ g 的范围,例如在约 1 μ g 到 300 μ g 的范围,特别是在约 10 μ g 到 50 μ g 的范围。适合用于初次给药和加强注射的用药法也是可以变化的,但是代表性的是在初次给药后接着进行接种或者其它的给药。

[0113] 施用的方式可以广泛地变化。任何用于疫苗施用的常规方法均适用。认为这些方法包括基于生理学上可接受的固态或以生理学上可接受的分散液口服施用,肠胃外,通过注射,等等。疫苗的剂量取决于给药途径,并根据待接种疫苗人的年龄和次要程度上待接种疫苗人的身材大小而变化。

[0114] 疫苗通常经肺内例如通过气雾剂或吸入、经注射例如经皮下或者肌肉注射进行肠胃外给药。适合于其它给药方式的其它制剂包括栓剂和某些情况下的口服制剂。对于栓剂而言,传统的粘合剂和载体可以包括例如聚亚烷基二醇或者甘油三酯;这种栓剂可以形成自含有 0.5% 到 10% 范围的、优选 1-2% 范围的活性成分的混合物。口服制剂包括诸如通常使用的赋形剂,例如药品级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠(sodium saccharine)、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或者粉末的形式,有利的是含有 10-95% 的活性成分,优选 25-70%。

[0115] 在许多情况下,必须多次施用疫苗。在个体已经变得感染或怀疑已经变得感染的情况中,此前的疫苗接种可能已经提供了足够的免疫来预防原发性疾病,但如此前讨论的,强化这一免疫应答将不会有助于抵抗潜伏感染。在这样的情况下,疫苗将必须是设计为有效抵抗感染的潜伏阶段或再次出现的活跃结核病感染的接触后疫苗。

[0116] 由于遗传变异,不同的个体可以与相同多肽产生不同强度的免疫应答。因此,本发明的疫苗可以包含几种不同的多肽以提高免疫应答。疫苗可包含两种或更多种多肽或者免疫原性部分,其中所有多肽如上定义,或者某些(但并非全部)多肽可来源于毒性分枝杆菌。在后者的实例中,不一定达到上述多肽标准的多肽可能由于它们自身的免疫原性而发挥作用或者仅仅充当佐剂。

[0117] 疫苗可包含 1-20、如 2-20 或乃至 3-20 种不同的多肽或者融合多肽,诸如 3-10 种不同的多肽或者融合多肽。

[0118] DNA 疫苗

[0119] 本发明的核酸片段可用于实现抗原的体内表达,即该核酸片段可用在所谓的 DNA 疫苗中,如 Ulmer 等 1993 年所评述的,其被引入作为参考。

[0120] 因此,本发明还涉及包含本发明的核酸片段的接触后疫苗,该疫苗引起施用了疫苗的动物包括人体内抗原的表达,表达的抗原的量有效地赋予对动物包括人的毒性分枝杆菌引起的感染的治疗。

[0121] 通过联合施用编码表达产物的基因与编码具有调节免疫应答能力的多肽的 DNA 片段,这种 DNA 疫苗的效力可以得到加强。

[0122] 活的重组疫苗

[0123] 用于有效激活对接触后疫苗的细胞免疫应答的一种可能性可以通过在非病原的微生物或者病毒中表达疫苗中相关的抗原来实现。这种微生物的公知实例是牛结核杆菌 BCG、沙门氏菌和假单胞菌,病毒的例子是牛痘病毒和腺病毒。

[0124] 因此,本发明另一个重要的方面是对目前可用的活的 BCG 疫苗进行加强,其中通过特定方式将一个或多个拷贝的编码一种或多种如上定义的多肽的 DNA 序列引入微生物的基因组中,所述特定方式使微生物得以表达和分泌所述多肽。预期超过一个拷贝的本发明的核苷酸序列的引入增强了免疫应答。

[0125] 另一个可能性是将编码根据本发明的多肽的 DNA 整合入减毒病毒如牛痘病毒或者腺病毒中(Rolph 等,1997)。重组牛痘病毒可以在受感染宿主细胞的细胞质内复制,由此感兴趣的多肽可以诱导预期诱导抗 TB 的保护的免疫应答。

[0126] 本申请中提及的所有专利和非专利参考文献通过引用全文并入本文。现在以以下非限制性实施例进一步详细描述本发明。

[0127] 附图图例

[0128] 图 1:结核分枝杆菌感染的过程基本上经历 3 个阶段。

[0129] 图 2:接触后接种疫苗以预防再激活的模型

[0130] 图 3:TB 接种模型。

[0131] 用于在 SSI 检验接触后疫苗的模型的示意性概括。通过气雾剂途径以毒性结核分枝杆菌感染小鼠。从感染后第 6 周到第 12 周,用抗生素治疗小鼠以建立潜伏 TB 状态。在感染后第 10 周开始,以 3 周的间隔,用接触后疫苗候选物接种小鼠 2 至 3 次。为小鼠留出

时间来再激活疾病,大约 20 周后评价肺的细菌数目以评价疫苗的保护效力。

[0132] 图 4:ESAT6 而不是 Ag85 的接触后疫苗诱导保护。

[0133] 按照实施例 1 的示意性概括将小鼠感染、治疗和接种疫苗。在感染后第 30-40 周杀死小鼠,在此时间点评价肺的细菌负荷(图 A、C-E)或如图 4B 所示,其中对 ESAT6,在感染期间多个时间点确定细菌负荷。(A 和 B)ESAT6 接种的动物与对照动物相比的细菌负荷。(C) Ag85B 接种的动物与对照动物相比的细菌负荷。(D)ESAT-6 肽混合物(覆盖完整 ESAT6 序列的重叠肽池)接种的动物与 Ag85B 接种的动物和对照动物二者相比的细菌。(E) 接触后接种疫苗 Ag85B-ESAT-6 (H1) 接种的小鼠与未接种疫苗的对照小鼠相比抵抗再激活的保护。图 4A、C-E 中的所有数据展示为代表每个个体动物的点图,并绘出平均值,而图 4B 中的每个时间点代表 6 个个体动物,展示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM)(B)。所有统计分析利用非配对 t 检验(图 A-C 和 E)或 Tukey 多重比较检验(图 D)进行,其中 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0134] 图 5:接触后接种疫苗 ESAT-6 诱导多功能 T 细胞。

[0135] 来自未接种疫苗的动物或 ESAT-6 接种的动物的感染的肺的细胞体外用 ESAT-6 刺激,随后以抗-CD4、抗-CD8、抗-IFN- γ 、抗-TNF- α 和抗-IL-2 染色。(A 和 B) 通过首先将 CD4T 细胞分为 IFN- γ 阳性(+)或 IFN- γ 阴性(-)细胞来确定细胞因子谱。对 IFN- γ + 细胞和 IFN- γ - 细胞二者分析 TNF- α 和 IL-2 的产生。饼形图(A 和 B)按照细胞因子产生谱以颜色编码,概括了对指定细胞因子产生谱为阳性的 CD4⁺T 细胞响应的比例(占 ESAT-6 特异性 CD4T 细胞)。(C) 细胞因子的每种可能的组合展示在条形图的 x 轴,未接种疫苗的小鼠(灰色条)或 ESAT-6 接种的小鼠(黑色条)中表达细胞因子的任何组合的 ESAT-6 特异性 CD4⁺T 细胞百分比对每个免疫组给出。D. 用 ESAT-6 对潜伏感染小鼠接种 2 次,最后一次接种后 20 周,评价肺的细菌数目以确定保护效力。(** $p < 0.01$, 单向 ANOVA Tukey 多重比较检验)。

[0136] 图 6:所有接触后实验的汇集分析

[0137] 对于其中 ESAT6、Rv3871、Ag85B、Rv3905、Rv3445、Rv0569 或 Rv2031c (图 A)、Ag85B-ESAT6 (H1) 或 Ag85B-ESAT6-Rv2660 (H56) (图 B) 用于接触后接种疫苗的单独实验,将佐剂对照组的细菌负荷中值与以上述任一种抗原接种的接种组中的每个个体小鼠的细菌负荷比较。图 A 和 B 中,每个点对应接种组相比于佐剂对照组赋予的保护水平,即 $\Delta \text{Log}_{10}\text{CFU}$,并由多次独立实验组成。(A) 单个抗原 ESAT6、Rv3871、Ag85B、Rv3905、Rv3445、Rv0569 或 Rv2031c 的 Log_{10} 保护;(B) 或与仅 ESAT6 相比杂合抗原 H1 和 H56 的 Log_{10} 保护。使用 Kruskal Wallis 多重比较检验,统计分析用于比较不同组之间的中值。 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0138] 图 7:接触后用 Rv3871 接种的效力与 ESAT6 和对照动物比较。

[0139] 将小鼠感染、治疗、并在感染后第 10、13 和 18 周接种疫苗。在感染后第 36 周,处死小鼠,用 Rv3871 (图 7A) 或 ESAT6 (图 7B) 体外再次刺激来自接种疫苗的小鼠和未接种疫苗的盐水对照小鼠的肺淋巴细胞。IFN- γ 释放由 ELISA 评价,样品以三份进行。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。疫苗赋予的保护效力通过计算从全肺匀浆培养的肺中的细菌来确定($n=16-18$)。数据展示为点图,其中每个点代表个体动物,并绘有中值(红线)。

实施例

[0140] 实施例 1: 用于接种疫苗的鼠 TB 模型

[0141] Cornell 模型已经广泛用作鼠模型来研究潜伏 TB。在我们的实验室中这一模型已被修改用于检验疫苗候选物预防再激活的能力。最初将小鼠气雾地感染毒性结核分枝杆菌, 感染后第 6 周开始抗生素治疗以减少细菌负荷。这是为了模拟人类感染的潜伏阶段, 其小鼠不会自发地发生。在这一潜伏阶段期间(具有持续低的细菌数目的阶段), 小鼠被免疫两次, 疫苗预防再激活的能力通过最后一次免疫后 20 周, 培养脾和肺的活结核分枝杆菌来确定。实验的长时间间隔是必需的, 以允许足够时间来再激活疾病, 这是读出疫苗效力的前提(图 3)。

[0142] 实施例 2: ESAT6 而不是 Ag85B 的接触后疫苗诱导保护。

[0143] ESAT-6 和 Ag85B 已被证明作为单组分以及作为融合分子 Ag85B-ESAT6 (H1) 在预防性接种中是保护性的。然而, 当在接触后模型中检验这些抗原时(如实施例 1 中上述), 只有 ESAT6 具有保护作用, 在再激活阶段期间控制细菌生长(图 4)。而且, 如图 4B 中可见, ESAT6 抵抗再激活的保护早在感染后第 18 周就表现出, 且这种保护在实验过程中一直保持(直到感染后第 40 周)。这不同于 Ag85B 用作接触后疫苗时观察到的(图 4C 和 D), Ag85B 用作接触后疫苗时细菌负荷与对照相比没有显著下降。此外, 我们评价了包括 TB 抗原 Ag85B 和 ESAT-6 的 H1 融合蛋白, 它在预防性情况中显示了有希望的效力。当这一分子在 SSI 接触后模型中用作接触后疫苗时, 其能够显著减少细菌数目(图 4E)。

[0144] 实施例 3: ESAT6 肽混合物的接触后疫苗诱导保护

[0145] 如以上实施例所示, ESAT-6 分子在接触后提供时非常有活性, 导致与对照组相比和与 Ag85B 相比细菌负荷的降低。而且, 我们还显示, 作为重叠肽的池而不是重组蛋白提供的 ESAT-6 也导致与对照组和 Ag85B 二者相比, 抵抗再激活的更好的保护, 证明 ESAT6 的强活性, 和作为接触后疫苗起作用的能力(图 4D)。

[0146] 用于保护实验的重叠 ESAT-6 肽(P1-P13):

[0147] P1MTEQQWNFAGIEAAA (SEQ ID NO. 19)

[0148] P2NFAGIEAAASAIQGN (SEQ ID NO. 20)

[0149] P3ASAIQGNVTSIHSL (SEQ ID NO. 21)

[0150] P4NVTSIHSLDEGKQS (SEQ ID NO. 22)

[0151] P5SLLDEGKQSLTKLAA (SEQ ID NO. 23)

[0152] P6KQSLTKLAAWGGSG (SEQ ID NO. 24)

[0153] P7AAWGGSGSEAYQGVQ (SEQ ID NO. 25)

[0154] P8GSEAYQGVQKWDAT (SEQ ID NO. 26)

[0155] P9QQKWDATATELNNAL (SEQ ID NO. 27)

[0156] P10ATELNNALQNLART (SEQ ID NO. 28)

[0157] P11ALQNLARTISEAGQA (SEQ ID NO. 29)

[0158] P12TISEAGQAMASTEGN (SEQ ID NO. 30)

[0159] P13QAMASTEGNVTGMFA (SEQ ID NO. 31)

[0160] 实施例 5: 接触后以 ESAT-6 接种诱导多功能 T 细胞

[0161] 为了检查接触后以 ESAT-6 接种对 ESAT-6 特异性细胞的细胞因子表达谱的作用,

首先用毒性结核分枝杆菌气雾感染小鼠,在感染后第 6 周开始抗生素治疗以减少细菌负荷和建立潜伏感染。在潜伏阶段期间以 3 周的间隔将小鼠接种疫苗(如图 3 所示)3 次,在最后一次接种疫苗后 20 周确定 ESAT-6 疫苗影响多功能 T 细胞的数目和预防结核分枝杆菌再激活的能力。结果显示,在未接种疫苗组有明显的 ESAT-6 响应,但细胞因子表达谱显著不同于 ESAT-6 接种组(图 5),尤其是在多功能 T 细胞($\text{IFN-}\gamma + \text{TNF-}\alpha + \text{IL-2} + \text{CD4T}$ 细胞)方面。因此,与未接种疫苗组相比,我们观察到 $\text{IFN-}\gamma / \text{TNF-}\alpha$ CD4T 细胞数目减少,共表达 $\text{IFN-}\gamma / \text{TNF-}\alpha / \text{IL-2}$ 的三重阳性多功能 CD4T 细胞数目增加。多功能 T 细胞的存在增加与 ESAT-6 接种的动物肺中细菌数目减少相关联(图 5D)。

[0162] 实施例 6 :与早期感染和晚期感染关联的其他抗原相比,接触后用 ESAT6 接种更持续地防止再激活。

[0163] 为了确定哪种抗原最持续地防止再激活,我们对基于进行的所有接触后实验的标准化数据进行汇集分析。通过比较组中每个个体小鼠的细菌负荷与对照组的中值将来自单独实验的数据集标准化,即每个数据点代表对照中值 CFU 与每个个体动物的 CFU 之间的差($\text{Log}_{10}\text{CFU}$ 对照中值 $-\text{Log}_{10}\text{CFU}$ 疫苗组)(图 6)。图 6A 中,对潜伏相关抗原 Rv0569、Rv2031c 与早期抗原 Ag85B、ESAT6、Rv3871、Rv3905 和 Rv3445 (其中后两个为 ESAT6 家族蛋白)的保护的汇集数据集的比较显示,ESAT6 接种的动物与评价的其他抗原相比显著更好地防止再激活。而且,在接触后以 Rv3871 (一种 ESX-1 蛋白)接种后获得的保护水平也表现为比其他抗原提高(图 6A)。为了进一步证明尤其是 ESAT6 的活性,我们比较了 ESAT6 赋予的保护与两种融合构建体 H1 (Ag85B-ESAT6)和 H56 (Ag85B-ESAT6-Rv2660)赋予的保护,二者都包含 ESAT6(图 6B)。分析显示,当被包括在上述两种融合构建体中时,ESAT6 活性仍导致抵抗再激活的保护。

[0164] 实施例 7 :接触后以 ESX-1 家族另一成员 Rv3871 接种表现为对再激活过程具有抑制作用。

[0165] 我们与 ESAT6 平行地评价了 ESX-1 家族的其他成员,发现接触后接种 Rv3871 导致诱导 Rv3871 特异性免疫应答(图 7B),尽管未达到 ESAT6 诱导的免疫应答(图 7A)的程度。然而 ESAT6 和 Rv3871 二者诱导的免疫应答比盐水对照动物大。疫苗特异性免疫应答的诱导伴随着两个疫苗组中与盐水组相比(中值)细菌负荷下降。这表示,Rv3871 在防止再激活方面可具有与 ESAT6 相比相似的作用,这由与对照组中略微升高的水平相比,这两组中细菌数目水平相似证明(图 7C)。

[0166] 参考文献

[0167] Andersen, P. 200715(1), 7-13

[0168] Anon. 2001. Global Tuberculosis Control. WHO Report.

[0169] Arend, SM., Infect Immun. 200068(6):3314-3321.

[0170] Brodin, P. 等 Infect Immun. 2006, 74, 88-98

[0171] Cote-Sierra J, 等 1998, Gene Oct9; 221(1):25-34

[0172] Doherty TM 等, 2002, J Clin Microbiol. Feb; 40(2):704-6.

[0173] Gao LY 等 2004, Molecular Microbiology 1677-93

[0174] Gosselin 等, 1992. J. Immunol. 149:3477-3481

[0175] Guinn KI 等, 2004, Mol Microbiol. 51, 359-70

- [0176] Guttstadt, A1891. Die Wirksamkeit des Koch'schen Heilmittels gegen Tuberculosis, Polykliniken und Pathologisch/Anatomischen Institute der Preussischen **Universitäten**. Springer, Berlin.
- [0177] Harboe, M., 等 1998 *Infect. Immun.* 66:2;717-723
- [0178] Hougardy 等 2007, *PLoS ONE*. Oct3;2(10):e926
- [0179] Kilgus J 等, *J Immunol.* 1991 Jan1;146(1):307-15
- [0180] Leyten EM. 等 *Microbes Infect.* 2006 8(8):2052-60.
- [0181] Lin MY 和 Ottenhoff TH, *Biol. Chem.* 2008, 389(5):497-511
- [0182] Lowrie, D. B. 等 1999, *Nature* 400:269-71
- [0183] Lustig 等 1976, *Cell Immunol* 24(1):164-7
- [0184] MacGurn JA 等 *Mol Microbiol.* 2005, 57:1653-63
- [0185] Merrifield, R. B. *Fed. Proc. Am. Soc. Ex. Biol.* 21:412, 1962 和 *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1963
- [0186] Mowat 等 1991, *Immunology* 72(3):317-22
- [0187] Mustafa, AS 等 2000, *Clin. Infect. Dis.* 30(suppl. 3)S201-S205
- [0188] Nagai 等 1991, *Infect. Immun* 59:1;372-382
- [0189] Olsen AW 等, *Eur J Immunol.* 2000 Jun;30(6):1724-32
- [0190] Pym AS 等 *Nat Med* 2003, 9, 533-9;
- [0191] Pearson, WR. 等 1988. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 2444-2448.
- [0192] Raghavan, S. 等 2008, *Nature* 454, 717-721
- [0193] Ravn, P. 等 1999. *J. Infect. Dis.* 179:637-645
- [0194] Rolph, MS, 和 I. A. Ramshaw. 1997. *Curr. Opin. Immunol.* 9:517-24
- [0195] Rogerson, BJ 等 *Immunology* 2006, 118, 195-201
- [0196] Rosenkrands, I., 等 1998, *Infect, Immun* 66:6;2728-2735
- [0197] Ruhwald M. 等 2008 *PLoS ONE*. Aug6;3(8):e2858
- [0198] Sambrook 等 *Molecular Cloning; A laboratory manual* (分子克隆实验手册), Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1989
- [0199] Seder, *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(4):247-58
- [0200] Sinigaglia F 等 *Nature* 1988 Dec 22-29;336(6201):778-80
- [0201] **Skjot**, RLV., 等 2000, *Infect, Immun* 68:1;214-220
- [0202] Smith J. 等 2008, *Infect Immun* 76, 5478-87
- [0203] Stanley, SA 等 2003 *Proc Natl Acad. Sci USA* 100:12420-5
- [0204] Stryhn. A., 等 1996 *Eur. J. Immunol.* 26:1911-1918
- [0205] Turner, OC 等 2000 *Infect Immun.* 68:6:3674-9.
- [0206] Talaat AM 等 2007, *J of Bact* 189, 4265-74
- [0207] Thompson J., 等 *Nucleic Acids Res* 1994 22:4673-4680
- [0208] Ulmer J. B 等 1993, *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2(9):983-989
- [0209] van Pinxteren LA 等 2000. *Eur. J. Immunol.* 30:3689-98.

[0001]

序列表

<110> 国立血清研究所

<120> 预防再激活的结核病 TB 疫苗

<130> 15034

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 95

<212> PRT

<213> 结核分枝杆菌 (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

[0002]

<211> 100

<212> PRT

<213> 结核分枝杆菌 (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
65 70 75 80

Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser
85 90 95

Gln Met Gly Phe
100

<210> 3

<211> 392

<212> PRT

<213> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 3

Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
1 5 10 15

[0003]

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala
50 55 60

Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu
65 70 75 80

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val
100 105 110

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

Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val
130 135 140

Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala
145 150 155 160

Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala
165 170 175

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

[0004]

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

[0005]

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> 结核分枝杆菌 (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

[0006]

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> 结核分枝杆菌 (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

[0007]

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> 结核分枝杆菌 (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			

[0008]

Ala Gln Gln Lys Val Leu Asp Arg Ile Asp Glu Leu Arg Arg Ala Glu
115 120 125

Gly Ile Asp Ala
130

<210> 7
<211> 573
<212> PRT
<213> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 7

Met Thr Asp Arg Leu Ala Ser Leu Phe Glu Ser Ala Val Ser Met Leu
1 5 10 15

Pro Met Ser Glu Ala Arg Ser Leu Asp Leu Phe Thr Glu Ile Thr Asn
20 25 30

Tyr Asp Glu Ser Ala Cys Asp Ala Trp Ile Gly Arg Ile Arg Cys Gly
35 40 45

Asp Thr Asp Arg Val Thr Leu Phe Arg Ala Trp Tyr Ser Arg Arg Asn
50 55 60

Phe Gly Gln Leu Ser Gly Ser Val Gln Ile Ser Met Ser Thr Leu Asn
65 70 75 80

Ala Arg Ile Ala Ile Gly Gly Leu Tyr Gly Asp Ile Thr Tyr Pro Val
85 90 95

Thr Ser Pro Leu Ala Ile Thr Met Gly Phe Ala Ala Cys Glu Ala Ala
100 105 110

[0009]

Gln Gly Asn Tyr Ala Asp Ala Met Glu Ala Leu Glu Ala Ala Pro Val
115 120 125

Ala Gly Ser Glu His Leu Val Ala Trp Met Lys Ala Val Val Tyr Gly
130 135 140

Ala Ala Glu Arg Trp Thr Asp Val Ile Asp Gln Val Lys Ser Ala Gly
145 150 155 160

Lys Trp Pro Asp Lys Phe Leu Ala Gly Ala Ala Gly Val Ala His Gly
165 170 175

Val Ala Ala Ala Asn Leu Ala Leu Phe Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu
180 185 190

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

[0010]

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
435 440 445

Thr Asn Glu Gly Leu Arg Ser Arg Phe Ala Thr Arg Ile Glu Phe Asp
450 455 460

[0011]

Thr Tyr Ser Pro Glu Glu Leu Leu Glu Ile Ala Asn Val Ile Ala Ala
465 470 475 480

Ala Asp Asp Ser Ala Leu Thr Ala Glu Ala Ala Glu Asn Phe Leu Gln
485 490 495

Ala Ala Lys Gln Leu Glu Gln Arg Met Leu Arg Gly Arg Arg Ala Leu
500 505 510

Asp Val Ala Gly Asn Gly Arg Tyr Ala Arg Gln Leu Val Glu Ala Ser
515 520 525

Glu Gln Cys Arg Asp Met Arg Leu Ala Gln Val Leu Asp Ile Asp Thr
530 535 540

Leu Asp Glu Asp Arg Leu Arg Glu Ile Asn Gly Ser Asp Met Ala Glu
545 550 555 560

Ala Ile Ala Ala Val His Ala His Leu Asn Met Arg Glu
565 570

<210> 8

<211> 480

<212> PRT

<213> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 8

Met Gly Leu Arg Leu Thr Thr Lys Val Gln Val Ser Gly Trp Arg Phe
1 5 10 15

Leu Leu Arg Arg Leu Glu His Ala Ile Val Arg Arg Asp Thr Arg Met
20 25 30

[0012]

Phe Asp Asp Pro Leu Gln Phe Tyr Ser Arg Ser Ile Ala Leu Gly Ile
35 40 45

Val Val Ala Val Leu Ile Leu Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Tyr Phe
50 55 60

Lys Pro Gln Gly Lys Leu Gly Gly Thr Ser Leu Phe Thr Asp Arg Ala
65 70 75 80

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

[0013]

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

[0014]

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> 结核分枝杆菌 (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

[0015]

50	55	60
Leu Ser Pro Tyr Met Leu Met Met Pro Leu Met Met Ile Val Met Met		
65	70	75
		80
Val Gly Gly Leu Ala Gly Ser Thr Gly Gly Gly Gly Lys Lys Val Pro		
	85	90
		95
Glu Ile Asn Ala Asp Arg Lys Glu Tyr Leu Arg Tyr Leu Ala Gly Leu		
	100	105
		110
Arg Thr Arg Val Thr Ser Ser Ala Thr Ser Gln Val Ala Phe Phe Ser		
	115	120
		125
Tyr His Ala Pro His Pro Glu Asp Leu Leu Ser Ile Val Gly Thr Gln		
	130	135
		140
Arg Gln Trp Ser Arg Pro Ala Asn Ala Asp Phe Tyr Ala Ala Thr Arg		
	145	150
		155
		160
Ile Gly Ile Gly Asp Gln Pro Ala Val Asp Arg Leu Leu Lys Pro Ala		
	165	170
		175
Val Gly Gly Glu Leu Ala Ala Ala Ser Ala Ala Pro Gln Pro Phe Leu		
	180	185
		190
Glu Pro Val Ser His Met Trp Val Val Lys Phe Leu Arg Thr His Gly		
	195	200
		205
Leu Ile His Asp Cys Pro Lys Leu Leu Gln Leu Arg Thr Phe Pro Thr		
	210	215
		220
Ile Ala Ile Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu Met Thr Ala		

[0016]

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

[0017]

	405	410	415
Trp His Gln Leu Val Gly Ala Gln Ser Val Glu Glu Ile Thr Pro Ser			
	420	425	430
Arg Trp Arg Met Tyr Thr Asp Thr Asp Arg Asp Arg Leu Lys Ile Pro			
	435	440	445
Phe Gly His Glu Leu Lys Thr Gly Asn Val Met Tyr Leu Asp Ile Lys			
	450	455	460
Glu Gly Ala Glu Phe Gly Ala Gly Pro His Gly Met Leu Ile Gly Thr			
465	470	475	480
Thr Gly Ser Gly Lys Ser Glu Phe Leu Arg Thr Leu Ile Leu Ser Leu			
	485	490	495
Val Ala Met Thr His Pro Asp Gln Val Asn Leu Leu Leu Thr Asp Phe			
	500	505	510
Lys Gly Gly Ser Thr Phe Leu Gly Met Glu Lys Leu Pro His Thr Ala			
	515	520	525
Ala Val Val Thr Asn Met Ala Glu Glu Ala Glu Leu Val Ser Arg Met			
	530	535	540
Gly Glu Val Leu Thr Gly Glu Leu Asp Arg Arg Gln Ser Ile Leu Arg			
545	550	555	560
Gln Ala Gly Met Lys Val Gly Ala Ala Gly Ala Leu Ser Gly Val Ala			
	565	570	575
Glu Tyr Glu Lys Tyr Arg Glu Arg Gly Ala Asp Leu Pro Pro Leu Pro			

[0018]

580	585	590
Thr Leu Phe Val Val Val Asp Glu Phe Ala Glu Leu Leu Gln Ser His		
595	600	605
Pro Asp Phe Ile Gly Leu Phe Asp Arg Ile Cys Arg Val Gly Arg Ser		
610	615	620
Leu Arg Val His Leu Leu Leu Ala Thr Gln Ser Leu Gln Thr Gly Gly		
625	630	635 640
Val Arg Ile Asp Lys Leu Glu Pro Asn Leu Thr Tyr Arg Ile Ala Leu		
645	650	655
Arg Thr Thr Ser Ser His Glu Ser Lys Ala Val Ile Gly Thr Pro Glu		
660	665	670
Ala Gln Tyr Ile Thr Asn Lys Glu Ser Gly Val Gly Phe Leu Arg Val		
675	680	685
Gly Met Glu Asp Pro Val Lys Phe Ser Thr Phe Tyr Ile Ser Gly Pro		
690	695	700
Tyr Met Pro Pro Ala Ala Gly Val Glu Thr Asn Gly Glu Ala Gly Gly		
705	710	715 720
Pro Gly Gln Gln Thr Thr Arg Gln Ala Ala Arg Ile His Arg Phe Thr		
725	730	735
Ala Ala Pro Val Leu Glu Glu Ala Pro Thr Pro		
740	745	
<210> 10		

[0019]

<211> 591
<212> PRT
<213> 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)

<400> 10

Met Thr Ala Glu Pro Glu Val Arg Thr Leu Arg Glu Val Val Leu Asp
1 5 10 15

Gln Leu Gly Thr Ala Glu Ser Arg Ala Tyr Lys Met Trp Leu Pro Pro
20 25 30

Leu Thr Asn Pro Val Pro Leu Asn Glu Leu Ile Ala Arg Asp Arg Arg
35 40 45

Gln Pro Leu Arg Phe Ala Leu Gly Ile Met Asp Glu Pro Arg Arg His
50 55 60

Leu Gln Asp Val Trp Gly Val Asp Val Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ile
65 70 75 80

Gly Ile Gly Gly Ala Pro Gln Thr Gly Lys Ser Thr Leu Leu Gln Thr
85 90 95

Met Val Met Ser Ala Ala Ala Thr His Ser Pro Arg Asn Val Gln Phe
100 105 110

Tyr Cys Ile Asp Leu Gly Gly Gly Gly Leu Ile Tyr Leu Glu Asn Leu
115 120 125

Pro His Val Gly Gly Val Ala Asn Arg Ser Glu Pro Asp Lys Val Asn
130 135 140

Arg Val Val Ala Glu Met Gln Ala Val Met Arg Gln Arg Glu Thr Thr
145 150 155 160

[0020]

Phe Lys Glu His Arg Val Gly Ser Ile Gly Met Tyr Arg Gln Leu Arg
 165 170 175

Asp Asp Pro Ser Gln Pro Val Ala Ser Asp Pro Tyr Gly Asp Val Phe
 180 185 190

Leu Ile Ile Asp Gly Trp Pro Gly Phe Val Gly Glu Phe Pro Asp Leu
 195 200 205

Glu Gly Gln Val Gln Asp Leu Ala Ala Gln Gly Leu Ala Phe Gly Val
 210 215 220

His Val Ile Ile Ser Thr Pro Arg Trp Thr Glu Leu Lys Ser Arg Val
 225 230 235 240

Arg Asp Tyr Leu Gly Thr Lys Ile Glu Phe Arg Leu Gly Asp Val Asn
 245 250 255

Glu Thr Gln Ile Asp Arg Ile Thr Arg Glu Ile Pro Ala Asn Arg Pro
 260 265 270

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

[0021]

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

[0022]

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> 结核分枝杆菌 (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

[0023]

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
245 250 255

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

[0025]

Ala Gly Ala Gly Leu Leu Arg Ala Glu Ser Leu Pro Gly Ala Gly Gly
275 280 285

Ser Leu Thr Arg Thr Pro Leu Met Ser Gln Leu Ile Glu Lys Pro Val
290 295 300

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

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

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

Glu Arg Glu Glu Asp Asp Glu Asp Asp Trp Asp Glu Glu Asp Asp Trp
355 360 365

<210> 13

<211> 666

<212> PRT

<213> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 13

Met Ala Ala Asp Tyr Asp Lys Leu Phe Arg Pro His Glu Gly Met Glu
1 5 10 15

Ala Pro Asp Asp Met Ala Ala Gln Pro Phe Phe Asp Pro Ser Ala Ser
20 25 30

Phe Pro Pro Ala Pro Ala Ser Ala Asn Leu Pro Lys Pro Asn Gly Gln
35 40 45

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

[0026]

50	55	60
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Thr Pro Met		
65	70	75 80
Pro Ile Ala Ala Gly Glu Pro Pro Ser Pro Glu Pro Ala Ala Ser Lys		
	85	90 95
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		

[0027]

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			

[0028]

	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			

[0029]

580	585	590
Ile Asn His Ile Met Pro Gly Glu Pro Asn Val Ala Val Lys Asp Leu		
595	600	605
Val Arg His Phe Glu Gln Gln Val Gln Pro Gly Arg Val Val Val Met		
610	615	620
Pro Trp Asp Arg His Ile Ala Ala Gly Thr Glu Ile Ser Leu Asp Leu		
625	630	635 640
Leu Asp Pro Ile Tyr Lys Arg Lys Val Leu Glu Leu Ala Ala Ala Leu		
645	650	655
Ser Asp Asp Phe Glu Arg Ala Gly Arg Arg		
660	665	
<210> 14		
<211> 511		
<212> PRT		
<213> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)		
<400> 14		
Leu Ser Ala Pro Ala Val Ala Ala Gly Pro Thr Ala Ala Gly Ala Thr		
1 5 10 15		
Ala Ala Arg Pro Ala Thr Thr Arg Val Thr Ile Leu Thr Gly Arg Arg		
20 25 30		
Met Thr Asp Leu Val Leu Pro Ala Ala Val Pro Met Glu Thr Tyr Ile		
35 40 45		
Asp Asp Thr Val Ala Val Leu Ser Glu Val Leu Glu Asp Thr Pro Ala		
50 55 60		

[0030]

Asp Val Leu Gly Gly Phe Asp Phe Thr Ala Gln Gly Val Trp Ala Phe
65 70 75 80

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Pro Leu Lys Leu Asp Gln Ser Leu Asp Asp
85 90 95

Ala Gly Val Val Asp Gly Ser Leu Leu Thr Leu Val Ser Val Ser Arg
100 105 110

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

Val Leu Asp Glu Ser Pro Glu Phe Asp Arg Thr Ala Leu Asn Arg Phe
130 135 140

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

[0031]

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

[0032]

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> 结核分枝杆菌 (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

[0033]

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

[0034]

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> 结核分枝杆菌 (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
20 25 30

Gln Glu Tyr Ser Gln Val Leu Gln Arg Val Thr Asp Val Leu Asp Thr
35 40 45

Cys Arg Gln Gln Lys Gly His Val Phe Glu Gly Gly Leu Trp Ser Gly
50 55 60

Gly Ala Ala Asn Ala Ala Asn Gly Ala Leu Gly Ala Asn Ile Asn Gln
65 70 75 80

[0035]

Leu Met Thr Leu Gln Asp Tyr Leu Ala Thr Val Ile Thr Trp His Arg
85 90 95

His Ile Ala Gly Leu Ile Glu Gln Ala Lys Ser Asp Ile Gly Asn Asn
100 105 110

Val Asp Gly Ala Gln Arg Glu Ile Asp Ile Leu Glu Asn Asp Pro Ser
115 120 125

Leu Asp Ala Asp Glu Arg His Thr Ala Ile Asn Ser Leu Val Thr Ala
130 135 140

Thr His Gly Ala Asn Val Ser Leu Val Ala Glu Thr Ala Glu Arg Val
145 150 155 160

Leu Glu Ser Lys Asn Trp Lys Pro Pro Lys Asn Ala Leu Glu Asp Leu
165 170 175

Leu Gln Gln Lys Ser Pro Pro Pro Pro Asp Val Pro Thr Leu Val Val
180 185 190

Pro Ser Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro Ile Thr Pro Gly
195 200 205

Thr Pro Ile Thr Pro Gly Thr Pro Ile Thr Pro Ile Pro Gly Ala Pro
210 215 220

Val Thr Pro Ile Thr Pro Thr Pro Gly Thr Pro Val Thr Pro Val Thr
225 230 235 240

Pro Gly Lys Pro Val Thr Pro Val Thr Pro Val Lys Pro Gly Thr Pro
245 250 255

[0036]

Gly Glu Pro Thr Pro Ile Thr Pro Val Thr Pro Pro Val Ala Pro Ala
260 265 270

Thr Pro Ala Thr Pro Ala Thr Pro Val Thr Pro Ala Pro Ala Pro His
275 280 285

Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Gly Pro Gln Pro Val
290 295 300

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

Gly Gly Glu Pro Ala Pro His Val Lys Pro Ala Ala Leu Ala Glu Gln
325 330 335

Pro Gly Val Pro Gly Gln His Ala Gly Gly Gly Thr Gln Ser Gly Pro
340 345 350

Ala His Ala Asp Glu Ser Ala Ala Ser Val Thr Pro Ala Ala Ala Ser
355 360 365

Gly Val Pro Gly Ala Arg Ala Ala Ala Ala Pro Ser Gly Thr Ala
370 375 380

Val Gly Ala Gly Ala Arg Ser Ser Val Gly Thr Ala Ala Ala Ser Gly
385 390 395 400

Ala Gly Ser His Ala Ala Thr Gly Arg Ala Pro Val Ala Thr Ser Asp
405 410 415

Lys Ala Ala Ala Pro Ser Thr Arg Ala Ala Ser Ala Arg Thr Ala Pro
420 425 430

[0037]

Pro Ala Arg Pro Pro Ser Thr Asp His Ile Asp Lys Pro Asp Arg Ser
435 440 445

Glu Ser Ala Asp Asp Gly Thr Pro Val Ser Met Ile Pro Val Ser Ala
450 455 460

Ala Arg Ala Ala Arg Asp Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Arg Gln
465 470 475 480

Arg Gly Arg Gly Asp Ala Leu Arg Leu Ala Arg Arg Ile Ala Ala Ala
485 490 495

Leu Asn Ala Ser Asp Asn Asn Ala Gly Asp Tyr Gly Phe Phe Trp Ile
500 505 510

Thr Ala Val Thr Thr Asp Gly Ser Ile Val Val Ala Asn Ser Tyr Gly
515 520 525

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

[0038]

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> 结核分枝杆菌 (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

[0039]

	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> 结核分枝杆菌 (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	

[0040]

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

[0041]

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 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

[0042]

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> 结核分枝杆菌 (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> 结核分枝杆菌 (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> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

[0043]

<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> 结核分枝杆菌 (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> 结核分枝杆菌 (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> 结核分枝杆菌 (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> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

[0044]

<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> 结核分枝杆菌 (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> 结核分枝杆菌 (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> 结核分枝杆菌 (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> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

[0045]

<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> 结核分枝杆菌 (*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> 结核分枝杆菌 (*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> 结核分枝杆菌 (*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

[0046]

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 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

[0047]

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

[0048]

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> 结核分枝杆菌 (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

[0049]

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
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
Asp Cys Val Gln Asn Pro Ala Pro Asp Pro Ser Thr Pro Gly Asp Pro			

[0050]

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

[0051]

420

425

430

Leu Gly Leu Gly Ala Leu Ala Arg Arg Ala Leu Ser Arg Arg

435

440

445

<210> 34

<211> 103

<212> PRT

<213> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 34

Met Thr Gly Phe Leu Gly Val Val Pro Ser Phe Leu Lys Val Leu Ala

1

5

10

15

Gly Met His Asn Glu Ile Val Gly Asp Ile Lys Arg Ala Thr Asp Thr

20

25

30

Val Ala Gly Ile Ser Gly Arg Val Gln Leu Thr His Gly Ser Phe Thr

35

40

45

Ser Lys Phe Asn Asp Thr Leu Gln Glu Phe Glu Thr Thr Arg Ser Ser

50

55

60

Thr Gly Thr Gly Leu Gln Gly Val Thr Ser Gly Leu Ala Asn Asn Leu

65

70

75

80

Leu Ala Ala Ala Gly Ala Tyr Leu Lys Ala Asp Asp Gly Leu Ala Gly

85

90

95

Val Ile Asp Lys Ile Phe Gly

100

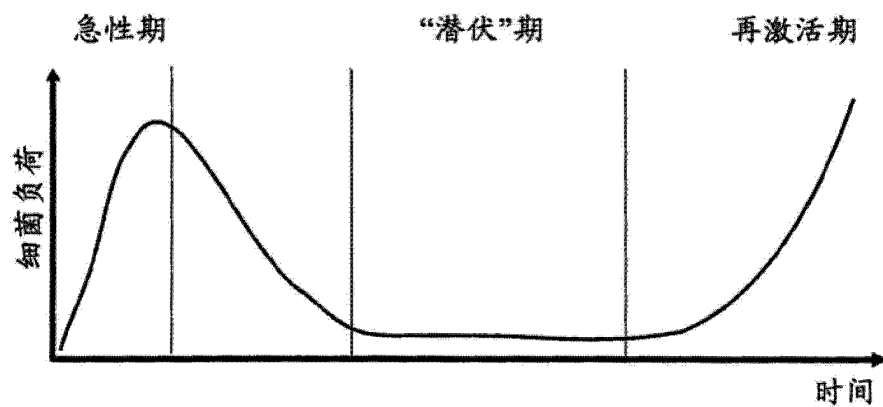


图 1

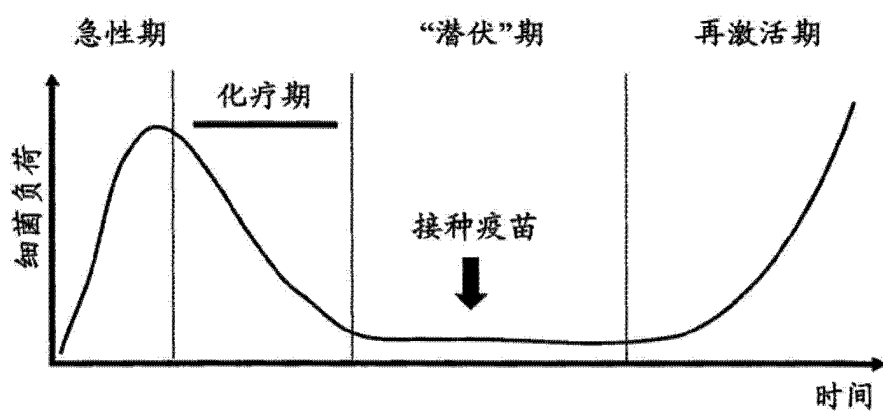


图 2

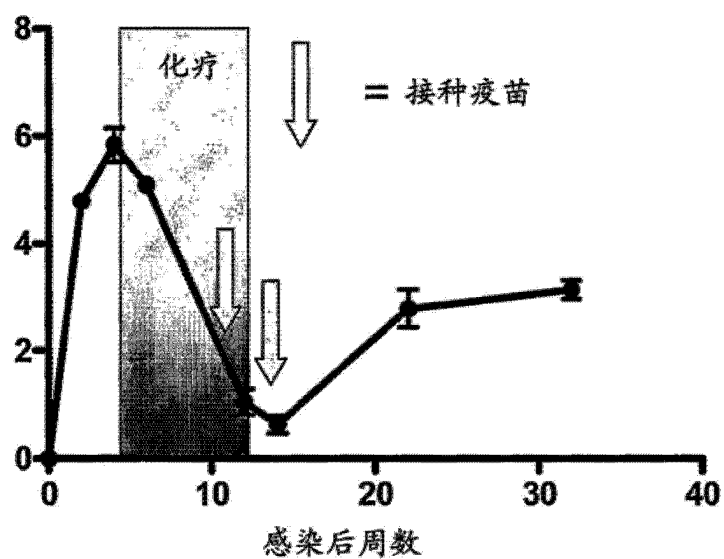


图 3

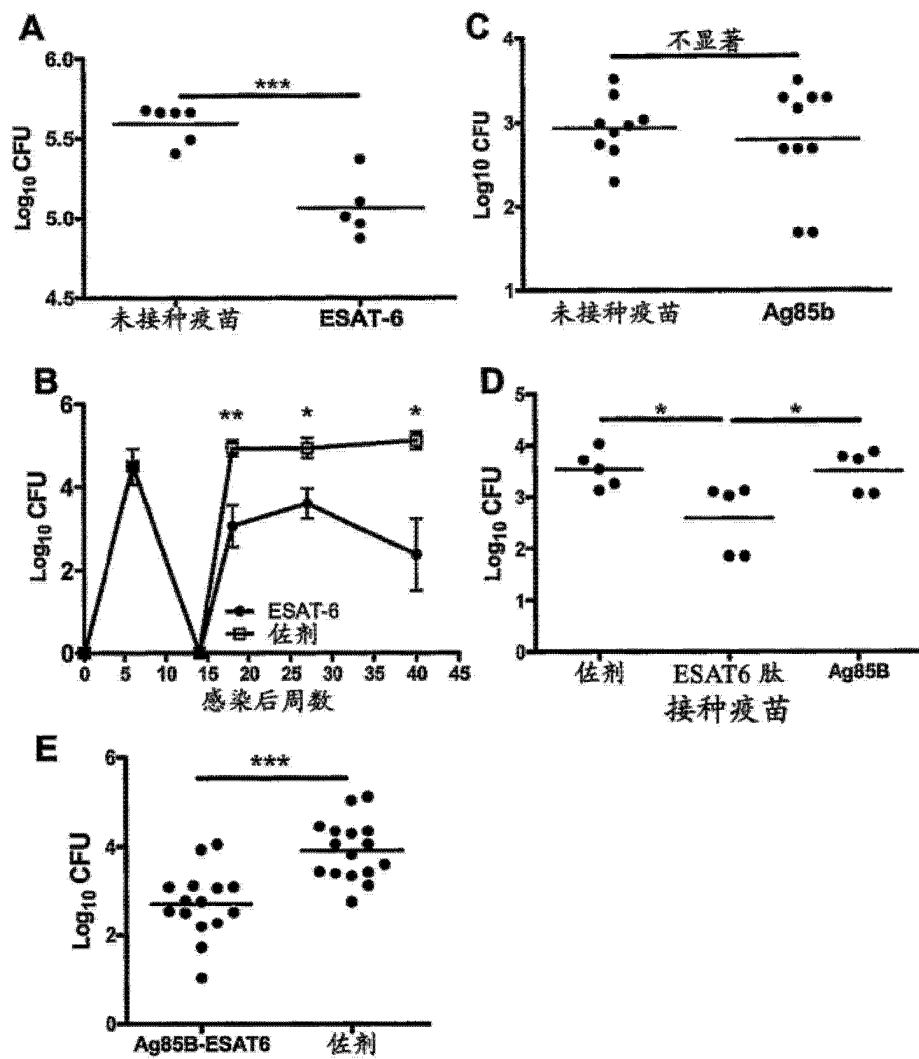


图 4

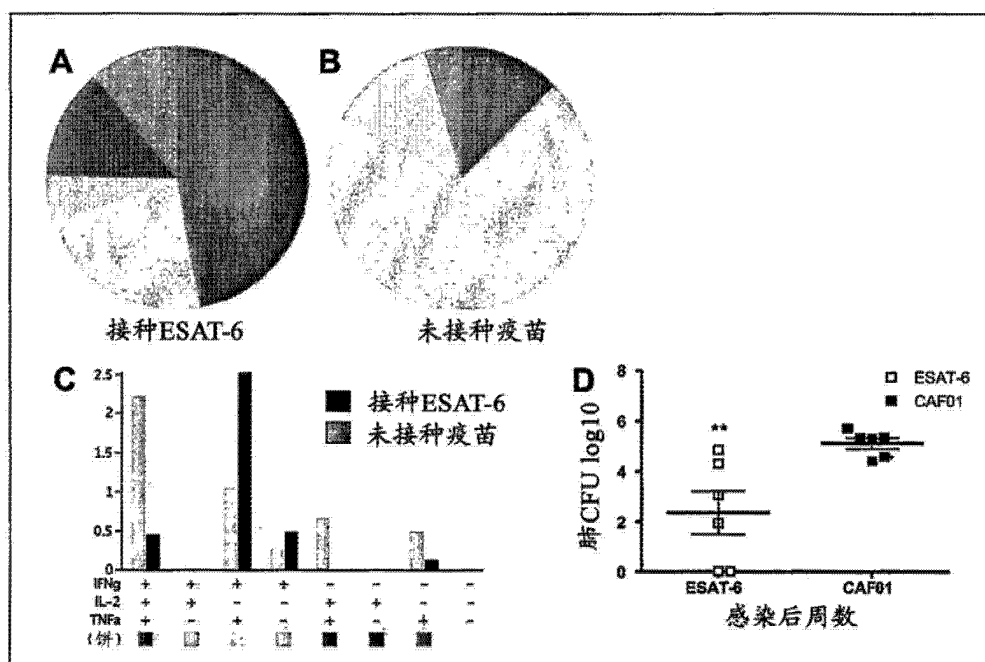


图 5

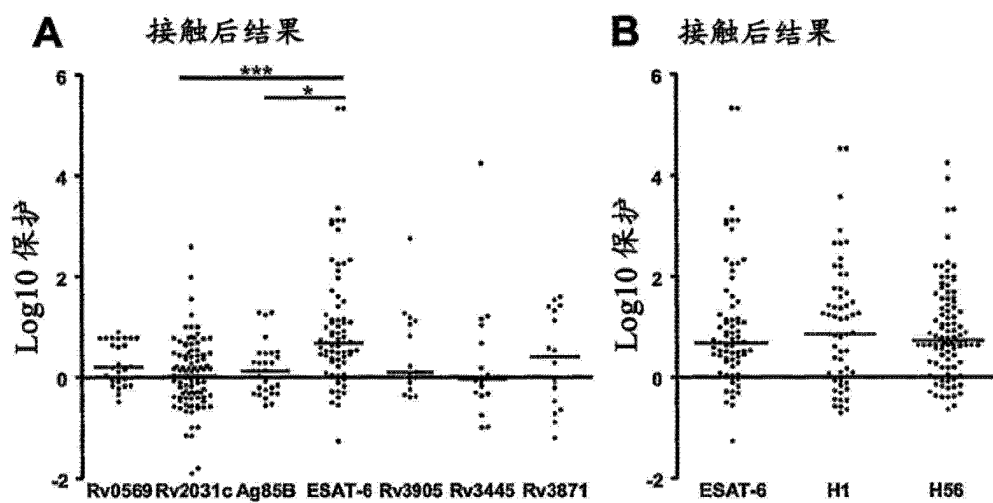


图 6

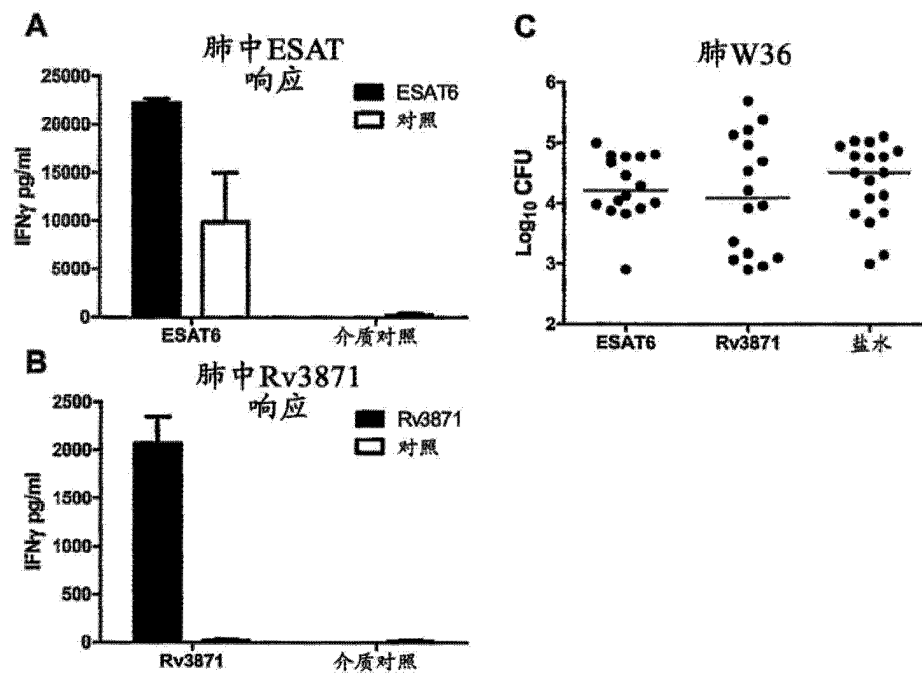


图 7

Abstract

The present invention discloses a vaccine or immunogenic composition that can be administered to latently infected individuals to prevent reactivation of latent tuberculosis infection caused by species of the tuberculosis complex microorganisms (*Mycobacterium tuberculosis*., *M.bovis*, *M.africanum*), The invention is base on a number of *M. tuberculosis* derived proteins and protein fragments which are constitutively expressed in different stages of the infection. The invention is directed to the use of these polypeptides, immunologically active fragments thereof and the genes encoding them for immunological compositions such as vaccines.