



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0024292
(43) 공개일자 2009년03월06일

(51) Int. Cl.

A61K 39/04 (2006.01) A61K 39/29 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 31/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7001606

(22) 출원일자 2009년01월23일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2009년01월23일

(86) 국제출원번호 PCT/DK2007/000312

국제출원일자 2007년06월26일

(87) 국제공개번호 WO 2008/000261

국제공개일자 2008년01월03일

(30) 우선권주장

PA 2006 00861 2006년06월28일 텐마크(DK)

(71) 출원인

스태튼스 세륨 인스티튜트

덴마크 디케이-2300 코펜하겐 에스 아틸레리베지
5

(72) 발명자

아가르드, 클라우스

덴마크 디케이-2300 코펜하겐 에스, 5 티에이치,
아일랜드 브리제63비

디에트리히, 제스

덴마크, 디케이-240 코펜하겐 엔브이, 2. 티에이
치., 툴드스크리버바이 4

안데르센, 피터

덴마크 디케이-2700 브뢴소이, 스파레쇼룸바이 47

(74) 대리인

특허법인다래

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 단백질 단편 또는 웹타이드 혼합물로서 전달되는 항원을 가진 백신접종에 의해 준우성 항원결정기를 포함하는 T세포 레퍼토리 확장

(57) 요 약

본 발명은 적당한 보강제 내의 바람직한 항원의 중복 단편(합성 웹타이드, 예를 들어 2-20 aa를 가진 10-30 미 중복)의 풀(pool)로 면역항에 의하여 만성질병의 예방 또는 치료를 위한 어떤 중요 항원의 항원결정기에서 우성 및 준우성 반응의 광범위한 인지를 포함하는 편리한 방법을 개시한다. T-세포 레파토리는 무손상 문자가 면역을 위해 사용되고 만성감염 바로 그 자체에 의하여 유도될 때 인지된 면역우성 항원결정기 뿐만 아니라 다수의 준우성 항원결정기에 더 광범위하고 균형적인 반응을 유도하는 것도 포함하여 초회감작된다. 준우성 항원결정기에 대한 T-세포 반응 결과는 면역우성 항원결정기에 대하여만 접종되는 반응을 스스로 유도하는 만성질병에 대한 방어를 위하여 중요하다. 본 발명의 주요한 이점은 준우성 항원결정기의 중요한 국소화와 동정 및 인간에서 그들의 인지에 대한 종래의 지식을 요구하지 않으나 T-세포 레파토리 및 그로인한 약간의 면역우성 항원결정기로 다양한 백신관련 항원결정기로부터 백신접종에 의하여 초회감작 특이 T-세포에 의해 인지된 다수의 항원결정기 총 수를 확장한다. 체액면역에 의해 통제된 만성질병을 위한 웹타이드 혼합으로 초기감작된 T-도움세포 반응은 게다가 항체 반응의 최대 유도를 위하여 전체 크기 단백질에 의해 알맞게 증대 될 수 있다.

대 표 도

A

```

MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTIHSLLDECKQSLTKLAAANGGGSEAYQGVQQKWDATTELNNALQNLARTISEAGQAMASTEGNVNTGMFA
MTEQQWNFAGIEAAA
NFAGIEAAAASAIQGN
ASA1QGNVTIHSLL
NVTIHSLLDEGKQ
SLLDECKQSLTKLAA
KOSLTKLAAANGGG
AAWGGSSEAYQGVQ
GSEAYQGVQQKWDAT
QQKWDATTELNNAL
ITELNNALQNLART
ALQNLARTISEAGQ
TISEAGQAMASTEGN
QAMASTEGNVNTGMFA

```

B

```

Δ15-ESAT6 SAIQGNVTIHSLLDEGKQSLTKLAAANGGGSEAYQGVQQKWDATTELNNALQNLARTISEAGQAMASTEGNVNTGMFA

```

특허청구의 범위

청구항 1

질병의 만성기 동안에 발현되는 단백질의 전체 아미노산 서열에 걸친 인접 중복 웨타이드로 이루어진 웨타이드 혼합물을 포함하는, 박테리아성, 바이러스성 또는 기생체 감염, 또는 암과 같은 만성질병에 대한 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물은 박테리아, 바이러스 또는 기생충인 백신.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 웨타이드는 10내지 30 아미노산, 바람직하게는 12-20 아미노산인 백신.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인접 웨타이드와의 중복은 6-20 아미노산, 바람직하게는 10-12 아미노산인 백신.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 악성 마이코박테리아, 예를 들어 결핵균, 마이코박테리움 아프리카룸 또는 소결핵균, 나병균 또는 클라미디아 트라코마티스와 같은 박테리아, 또는 간염 B 또는 C와 같은 바이러스, 또는 리슈마니아종 또는 말라리아의 원인인 열대열원충과 같은 기생충, 또는 악성종양으로 발현된 분자로부터 선택된 것인 백신.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 웨타이드는 ESAT6, Ag85A, Ag85B 또는 TB10.4와 같은 결핵균, 또는 CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 또는 CT681과 같은 클라미디아 트라코마티스, 또는 간염 바이러스, 또는 Msp1, Msp2, Msp3, Ama1, GLURP, LSA1, LSA3 또는 CSP와 같은 열대열원충으로부터 선택된 단백질에서 얻는 백신.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 보강제와 같은 전달 시스템으로 전달된 백신.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 보강제는 양이온성 리포좀에 기초한 백신.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 웨타이드는 리포좀으로 캡슐화되어 전달되는 백신.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 하나 이상의 웨타이드는 지질화된 백신.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 웨타이드 혼합물의 각 웨타이드는 혼합물을 만들기 전에 혼합되거나 개별적으로 리포좀으로 혼합된 백신.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보강제는 DDA/TDB인 백신.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 백신의 웨타이드 혼합물은 둘 이상 단백질 가수분해제와 함께 단백질의 단백질 가수분해에 의하여 제조되는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 백신의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 단백질 가수분해제는 트립신, V-8 프로테아제, AspN 또는 키모트립신과 같은 단백질 가수분해 효소 중에서 선택하거나, CNBr 또는 BNPS-스케톨과 같은 화학약품 중에서 선택되는 백신 제조방법.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 백신을 동물에 처리하는 것을 포함하여 동물(사람 포함)에서 만성질병의 예방 또는 치료 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 예방 또는 치료는 보강제내의 웨타이드 혼합물 또는 전달 시스템내의 발현에 걸쳐 전체 크기 단백질을 포함하는 두 번째 백신을 투여하여 증대된 예방 또는 치료에 대한 방법.

명세서

기술분야

<1>

본 발명은 박테리아, 잠복기가 긴 바이러스 또는 기생충 또는 악성 종양에서 발현된 단백질로부터 야기되는 만성 감염과 같은 질병의 만성기 동안에 발현되는 단백질의 전체 아미노산 서열에 걸친 인접 중복 웨타이드의 웨타이드 혼합물을 포함하는, 박테리아성, 바이러스성 또는 기생체의 감염, 또는 암과 같은 만성질병에 대한 백신에 관한 것으로서, 만성질병의 백신, 예방, 치료 및 백신의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

<2>

현재 백신이 이용가능한 제한된 수의 질병과 비교하여, 효과적인 백신을 개발하기 위하여 지금까지 많은 수의 빗나간 시도가 있다. 암뿐만 아니라 감염질병의 대다수 공통적인 특징은 질병이 기존 호스트 면역성 반응에 부딪쳐 수년간 유지되는 만성질병으로 그들 자신을 나타내고 천천히 발전한다는 것이다. 이는 불임을 유발하는 난관의 염증성 자국과 같은 인간 질병의 실제 원인은 클라미디아 트라코마티스(*Clamydia trachomatis*)인 경우와 같은 면역병리학을 야기한다. 결핵감염(TB)과 같은 질병을 위한 백신(BCG)은 존재하지만 상기 백신이 질병의 급성 발현을 예방할지라도 박테리아는 처리되지 않으므로 만성 또는 잠재적 질병이 생성된다. TB는 본질적으로 3단계를 통해 진행한다. 급성 단계 동안에, 면역반응이 감염을 통제할 수 있는 지점으로 증가할 때까지 박테리아는 조직에서 증식하고, 그래서 박테리아 로드는 정점에 도달하고 쇠퇴하기 시작한다. 이후에, 만성 또는 잠재적인 단계는 박테리아 로드가 낮은 수준에서 안정되게 유지되는 점에 확립된다. 이 단계에서 결핵균(*M. tuberculosis*)은 활성 증가로부터 수년간 계속될 수 있는 느리거나 비복제 지속성의 상태로 지나간다. 그러나, 어떠한 TB경우에서, 감염은 갑자기 재활성되고 명백한 질병이 나타날 것이다. 이러한 재활성을 이끌어 내는 요인은 대부분 알 수 없다. 클라미디아와 같은 다른 경우에 감염은 징후가 없이 남아있을 수도 있으나 진행중에 염증을 일으키는 과정은 불임과 같은 이후의 임상 발현을 유발한다.

<3>

다수의 곤란한 질병들에서 면역반응은 체액성 및 세포성면역(CMI)반응 요소를 둘 다 포함한다. CMI반응은 병원균으로부터 T-세포 항원과 항원결정기(epitopes)의 서열에서 유도된다. 항원결정기는 7-9 aa (MHC I)와 12-15 aa (MHC II) (1)에서 아미노산(aa)이 확장한다. 암뿐만 아니라 HIV, TB와 같은 만성 바이러스와 박테리아 질병에서, 항원결정기 반응의 서열은 총 T-세포 반응의 큰 부분을 점차적으로 구성하는 약간의 면역우성 항원결정기에서 한동안 변화하는 반면에 MHC 종류 I 또는 II 항원표시 분자를 연결하는 가능성을 가진 다수의 다른 항원결정기는 겹출 레벨에 가깝거나 겹출 레벨 아래에서 T-세포 반응을 유발하는 준우성이거나 더욱 애매한 것이다(2-6). 이러한 준우성 항원결정기에서 반응하는 백신접종(우성 항원결정기에서 경쟁없이)에 의해 유도된 경우에는, 항원결정기가 자연 감염기간동안 실제로 발현되고 침입 병원체에 작용체 세포로 인식될 수 있다는 것을 나타내기 위해 예를 들어 TB에서 방어되는 것이 보고되어 왔다(7). 면역우성 항원결정기에 대한 반응과 비교하여 잇점을 가지는 이러한 반응은 면역우성 항원결정기가 부족한 이탈변이형(escape mutants)인 HIV에서 학문에 의해 제안되고, 그러므로 면역 시스템에 의해 보이지 않는다는 것은 현재의 백신 발전을 위한 중요한 관심사이다(8).

- <4> 백신 디자인에서 준우성 T-세포 항원결정기의 이용은; i) 다른 HLA 구성과 함께 각개에 의하여 인식된 각개 항원결정기의 변이 때문에 다양한 인간을 포함하기 위한 다른 항원결정기의 넓은 혼합에 대한 요구; ii) 단지 낮은 수준 T-세포 반응이 면역학 분석검사 (예를 들면 ELISPOT)의 탐지 수준과 곤립하거나 낮은 준우성 항원결정기 확인의 요구가 발견된 두 개의 주요한 장애에 의해 지금까지 방해되어 왔다
- <5> Olsen et al (7)은 ESAT6의 한 준우성 항원결정기에 기초한 백신이 TB로 부터 방어할 수 있다는 것을 기재하였다. 그러나, ESAT6의 전체 영역에 걸친 중복 펩타이드의 혼합은 이 연구에서 이용되지 않았다.
- <6> W001016163에서 HLA유전자형에 개의치 않는 T-세포를 활성화하는 펩타이드로 이루어진 펩타이드 혼합을 포함하는 바이러스에 대비한 백신이 기재되었다. 이 출원은 유전학적으로 다양한 인간에 백신접종을 할 때 넓은 적용범위를 가능하게 하는 B형 간염에서 펩타이드 혼합의 사용을 기재하며, 이에 의해 단일 펩타이드와 함께 면역화 할 때 발견되는 비반응군을 회피한다. 상기 발명에서는 본 발명에서 기재하는 것과 같은 만성질병에 대한 예방 및 치료 백신접종에 관련된 준우성 T-세포 항원결정기에 대하여 직접적인 T-세포의 펩타이드 구동 연장을 가르치지 않는다.
- <7> W003011331에서는 제1 상승 백신이 기재되었다. 우성 항원결정기에서 증가된 반응과 준우성 항원결정기 초회 감작에서 감소된 반응을 예방하는 것은 일련의 항원결정기를 부호화하는 DNA 또는 바이러스성의 벡터에 의해 달성된다. 초회감작 단계 후에, 항원결정기는 단일 폴리-항원결정기 DNA 또는 바이러스 구조로서 투여되는 것과 반대로 반응을 상승시키기 위하여, 분리된 구조 또는 분리된 전달체에 적재되어 개별적으로 사용된다. 이와 달리 본 발명은 체액성 반응의 최대 유도를 위해서, 초회감작을 위해 6-20 아미노산의 겹침을 가진 펩타이드 혼합물 내에 전체 단백질에 걸쳐지고, 선택적으로 바이러스성 전달 시스템에서 발현되거나 서브유닛 백신의 보강으로서 전체 단백질을 촉진하는 아미노산 서열의 확장을 이용한다.
- <8> 만성질병에서 항원결정기 반응의 체계가 단지 소수의 우성 항원결정기에 대하여 반응을 구성하기 위하여 오랜 시간에 걸쳐 변화한다는 것이 일반적으로 관찰된다. 그러나, 준우성 항원결정기에 대한 반응이 방어적으로 입증되는 것으로서(7), 그리고 이러한 항원결정기에 대한 반응은 만성질병 바로 그것에 의하여 촉진되지 않기 때문에, 만성질병은 우성 및 가장 중요하게 준우성 항원결정기를 포함하는 항원결정기의 넓은 범위에 대한 면역 반응을 유도하는 본 발명의 명백한 표적이다.

발명의 상세한 설명

- <9> 본 발명은 어떤 주어진 항원에서 우성 및 준우성 반응의 넓은 인지를 유도하는 백신을 기재한다. 백신은 적합한 보강제 내에 바람직한 항원의 단편을 중복하는 것을 포함한다. 그것에 의하여 T-세포 레파토리는 손상되지 않은 분자가 면역을 위해 사용되거나 만성 감염 바로 그것에 의해 유도될 때 그로 인하여 인식된 면역우성 항원결정기를 다수의 준우성 항원결정기에 매우 넓고 안정된 반응을 포함하기 위하여 확장된다. 본 발명의 주요 이점은 준우성 항원결정기의 중요한 국소화 또는 동정 및 인간에서 그들의 인지에 대한 종래의 지식을 요구하지 않으나 T-세포 레파토리를 확장함으로써 약간의 면역우성 항원결정기에서 다수의 항원결정기까지 백신접종에 의하여 표적특이 T-세포를 초회감작한다. 본 발명에 기재된 바와 같이, 준우성 항원결정기에 대한 넓은 범위의 반응을 가지는 만성질병을 표적하는 것은 이러한 질병에 대한 면역성을 획기적으로 이용하는 것이다.
- <10> 본 발명에는 질병의 만성기 동안에 발현되는 단백질의 전체 아미노산 서열에 걸친 인접 중복 펩타이드로 이루어진 펩타이드 혼합물을 포함하는, 박테리아성, 바이러스성 또는 기생체의 감염, 또는 암과 같은 만성질병에 대한 백신이 개시된다.
- <11> 본 발명에는 박테리아성, 바이러스성 또는 기생체 감염, 또는 암과 같은 만성질병에 대하여 백신을 위하여 펩타이드를 부호화하는 항원 단백질 및/또는 핵산으로부터 유래된 중복 펩타이드의 혼합물의 이용이 개시된다.
- <12> 상기 펩타이드는 인접 펩타이드와의 중복이 6-20 아미노산, 바람직하게는 10-12 아미노산인 10 내지 30 아미노산, 바람직하게는 12-20 아미노산이다.
- <13> 펩타이드 혼합물에 걸친 항원 단백질은 질병의 만성기 동안에 발현되고 만성질병의 경우에 세포성 면역 반응을 유도하는 단백질 중에서 선택된다.
- <14> 바람직하게 상기 단백질은 악성 마이코박테리아, 예를 들어 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*Mycobacterium africanum*) 또는 소결핵균(*Mycobacterium bovis*), 나병균(*Mycobacterium leprae*) 또는 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)와 같은 박테리아, 또는 간염 B 또는 C와 같은 바이러스, 또는 리슈마니아종(*Leishmania*) 또는 말라리아의 원인인 열대열원충(*Plasmodium falciparum*)과 같은 기생충, 또

는 악성종양으로 발현된 분자로부터 선택된다.

- <15> 상기 웨타이드는 ESAT6, Ag85A, Ag85B 또는 TB10.4와 같은 결핵균(*M. tuberculosis*), 또는 CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 또는 CT681과 같은 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 또는 간염 B 또는 C, 또는 Msp1, Msp2, Msp3, Ama1, GLURP, LSA1, LSA3 또는 CSP와 같은 열대열 원충(*Plasmodium falciparum*)으로부터 선택된 단백질이나 이에 한정되지 않는다.
- <16> 또한, 본 발명에는 트립신, V-8 프로테아제, AspN 또는 카모트립신과 같은 단백질 가수분해 효소이거나 CNBr 또는 BNPS-스케톨(skatole)과 같은 화학약품과 같은 둘 이상의 단백질 가수분해제로 단백질의 가수분해에 의한 본 발명에 따른 웨타이드 혼합물을 제조하는 방법이 개시된다.
- <17> 본 발명에 따른 웨타이드 혼합물은 박테리아성, 바이러스성 또는 기생체 감염, 또는 암과 같은 만성질병에 대한 백신을 제조하기 위해 이용될 수 있다. 상기 백신은 보강제와 같은 전달 시스템을 선택적으로 포함한다. 보강제는 디메틸디옥타데실암모늄브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide)/ 트레할로스 디비히네이트(Trehalose dibehenate) (DDA/TDB)와 같은 양이온성 리포좀에 기초하는 것이 바람직하다. 백신접종에 사용되는 웨타이드 혼합물은 미리 형성된 리포좀과 함께 혼합되거나 각 웨타이드가 미리 형성된 리포좀과 함께 혼합되어 이용될 수 있고, 리포좀 내에 제조된 각개 웨타이드는 면역화 이전에 혼합된다.
- <18> 웨타이드 혼합물 내의 각 웨타이드는 면역 시스템으로부터 각개 항원제시세포(APC; Antigen Presenting Cell)와 최적의 상호작용을 위하여 웨타이드 혼합물을 만들기 전에 리포좀과 각개로 혼합되는 것이 바람직하고 그로 인하여 분자 내의 모든 가능한 항원결정기에 최대 반응을 확보한다.
- <19> 또한 본 발명에는 본 발명의 백신이 동물에게 투여되는 것을 포함하는 인간을 포함하는 동물에서 만성질병의 예방 또는 치유적 치치에 대한 방법 및 백신이 개시된다. 선택적으로 예방 또는 치료는 보강제 내의 웨타이드 혼합물에 의하여 걸쳐지거나 바이러스성 전달 시스템 내에 발현된 전체 크기 단백질을 포함하며, 체액성 반응뿐만 아니라 CMI를 최상으로 증대하기 위한 순수 DNA 백신으로서 두 번째 백신을 투여하여 증대된다.
- <20> 본 발명은 아미노산 서열이 폴리웨타이드의 자가-보강제(self-adjuvanting) 효과를 허용하기 위하여 CPG와 같은 TLR작용제에 직접적으로 지질화되거나 결합된 백신을 추가로 개시한다.
- <21> 본 발명의 바람직한 구현예는 상기 기재한 바와 같이 보강제를 가진 본 발명의 웨타이드 혼합물을 포함하는 백신이다.
- <22> [정의]
- <23> 만성질병
- <24> 만성질병은 장기간에 걸치거나 재발하는 질병이다. “만성” 용어는 질병의 진행, 또는 그것의 발병 및 발달의 속도를 설명한 것이다. 만성진행은 중간에 완화 기간을 가지고 재발하는 진행(반복하는 재발성 질병 재발)과 구별된다. 만성감염은 박테리아 중에서도 예를 들어 마이코박테리아속(*Mycobacteria* sp) 또는 클라미디아 속(*Chlamydia* s.p)박테리아, 간염 또는 HIV와 같은 바이러스, 말라리아의 원인인 기생충 또는 리슈마니아(*Leishmania*)와 같은 기생충, 또는 암, 당뇨병 등과 같은 질병에 의해 야기될 수 있다.
- <25> 웨타이드
- <26> 본 발명에서 “웨타이드”는 그것의 통상의 의미를 가진다. 즉 단백질 일부 또는 단편인 어떤 길이의 아미노산 사슬이며, 상기에서 아미노산 잔기는 웨타이드 공유결합에 의해 연결된다.
- <27> 상기 웨타이드는 글리코실화, 지질화(예를 들어 (10)에 의해 설명된 것처럼 PAM3Cys(18) 또는 도데카노일 클로라이드(dodecanoyl chloride)로 표시된 (9)에 의해 설명된 것처럼 팔미토일옥시 숙신이미드(palmitoyloxy succinimide)를 가진 화학적 지질화), 배합군 포함, 히스-태그(his-tag) 또는 단일 웨타이드와 같은 추가적인 아미노산 포함 또는 TLR 작용제에서 직접 결합((11)에 의해 설명된)에 의하여 화학적으로 변형될 수 있다.
- <28> 각 웨타이드는 특이 아미노산에 의해 특징되고 특이 핵산서열에 의해 부호화될 수 있다. 서열이 재조합형 또는 합성방법에 의하여 제조된 유사체(analogues) 및 변종을 포함하며 폴리웨타이드 서열은 재조합형의 폴리웨타이드 내에 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 삽입, 추가 및 제거에 의해 변형되고 본 발명에 기재된 어떤 생물학 분석으로 면역성이 있다는 것이 이해될 것이다.
- <29> 치환은 “보존적(conservative)”인 것이 바람직하다. 이들은 하기 테이블에 따라 정의된다. 두 번째 컬럼

에 동일한 구획과 세 번째 블럭에 같은 선상에 있는 아미노산은 서로에 대하여 바람직하게 치환될 수 있다. 세 번째 컬럼의 아미노산은 한-문자 코드(one-letter code)로 나타낸다.

표 1

<30>

지방성의	무극성	GAP
		ILV
	비전하성 극성	CSTM
		NQ
	전하성 극성	DE
		KR
방향족의	HFWY	

<31>

펩타이드 혼합물은 단백질 단편의 액체 혼합물이다.

<32>

본 발명에서 바람직한 펩타이드 혼합물은 ESAT6, Ag85A, Ag85B 또는 TB10.4와 같은 결핵균(*M. tuberculosis*), 또는 CT184, CT521, CT443, CT520, CT521 또는 CT375와 같은 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 또는 간염 바이러스, 또는 momp, omp, msp1, msp3, ama1 또는 glurp와 같은 열대열원충으로부터의 단백질에 기초한다. 또한 PCT/DK2006/000356의 TB에 대한 관련된 백신 구조로 이전에 설명된 바와 같이 용합분자에 기초한 펩타이드 혼합물 또는 단백질 가수분해 소화물일 수도 있다. 일반적으로 만성질병에 대한 백신으로 사용될 수 있는 CMI반응을 유도하는 단백질의 모든 펩타이드 혼합물은 백신으로서 증가된 예방적 또는 치료적 반응을 유도하는데 사용될 수 있다.

<33>

본 발명에서, 명세서에서 다르게 요구하지 않는 한, ‘포함한다’라는 단어 또는 ‘포함하다’ 또는 ‘포함하는’과 같은 변형어는 기재된 요소 또는 완전체 또는 요소들 또는 완전체들 그룹을 포함하나 어떤 다른 요소 또는 완전체 또는 요소들 또는 완전체들 그룹을 제외하는 것이 아닌 것을 의미하는 것으로 이해된다.

<34>

비록 T-세포 항원결정기의 최소 길이가 적어도 6 아미노산으로 보였다고 하더라도 그것은 상기 항원결정기가 아미노산의 보다 긴 연장을 구성하게 되는 표준이다. 따라서 그것은 본 발명의 폴리펩타이드 단편이 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 같이 적어도 7 아미노산 잔기의 길이를 갖는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명 방법의 주요 구현예에서, 그것은 폴리펩타이드 단편이 많아야 40, 35, 30, 25 및 20 아미노산 잔기와 같이 많아야 50 아미노산 잔기의 길이를 갖는 것이 바람직하다.

<35>

10 내지 20 아미노산 잔기 사이의 길이를 가지는 펩타이드는 MHC 클래스 II 항원결정기로서 가장 유효한 것으로 기대되고, 그 결과 본 발명 방법에서 사용된 폴리펩타이드 단편의 특히 바람직한 길이는 15, 14, 13, 12 및 11 아미노산 잔기와 같이 18이다. 7 내지 12 아미노산 잔기 사이의 길이를 가지는 펩타이드는 MHC 클래스 I 항원결정기로서 가장 유효한 것으로 기대되고 그 결과 본 발명 방법에서 사용된 폴리펩타이드 단편의 특히 바람직한 길이는 10, 9, 8 및 7 아미노산 잔기와 같이 11이다.

<36>

항원결정기

<37>

T-세포 항원결정기로는 MHC 클래스 I 또는 II에서 항원제시세포에 의해 제시된 후 그들의 T-세포 수용체를 통한 특이 T-세포에 의하여 인식된 아미노산 서열로 이해된다.

<38>

우성 항원결정기는 단백질의 부분일 때 높은 T-세포 반응을 유도하는 아미노산의 서열이고, 종종 항원에 대한 대다수 반응은 약간의 T우성 T-세포 항원결정기로 유도된다.

<39>

준우성 항원결정기는 항원결정기가 면역원성이고 단백질로부터 분리될 때 중요한 T-세포반응을 유도할 수 있다고 하더라도 단백질의 일부가 강한 T-세포 반응을 유도하지 않는 아미노산의 서열이다.

<40>

중복 폴리펩타이드 또는 단백질 단편의 혼합물에 의하여 전체 단백질에 걸친 6-20 아미노산 중복을 가지는 10 내지 30 머의 혼합물로 이해된다.

<41>

변형

<42>

본 발명의 폴리펩타이드의 일반적인 특징은 실시예에서 기재된 면역학적 반응을 유도하는 능력이다. 치환, 삽

입, 추가 또는 삭제에 의해 제조된 본 발명의 폴리펩타이드의 변형은 또한 본 발명에서 기재된 분석에 의하여 결정된 것처럼 면역원성일 수 있다는 것이 이해된다.

<43> 면역개체

<44> 면역개체는 감염이 회복되거나 억제된 사람 또는 동물로 정의된다.

<45> 면역반응

<46> 면역반응은 다음 방법의 하나에 의해 모니터될 수 있다:

<47> -시험관내 세포의 반응은 현재 또는 이전에 악성의 마이코박테리아(mycobacteria)로 감염되거나 관련된 웨타이드 혼합물로 면역된 동물 또는 사람으로부터 얻어진 림프구에서 인터페론-감마(IFN- γ)와 같은 관련된 사이토카인(cytokine) 방출의 유도 또는 분열증식이 유도에 의해 결정된다. 유도는 웰(well) 당 2×10^5 세포 내지 4×10^5 세포를 포함하는 웨타이드 혼합물 또는 혼탁액에 혼합물의 면역원성 일부의 추가에 의하여 수행된다. 세포는 혈액, 비장, 임파절, 간 또는 폐로부터 분리되고 폴리펩타이드 또는 면역성 부분의 추가는 20 mg 이하의 농도이며 자극은 2에서 5일(day)까지 수행되어 진다. 세포의 분열증식을 모니터하기 위하여 세포는 방사능표지된 티미딘(Thymidine)으로 적용되고 16-22시간 배양 후 분열증식을 검출하는 것은 액체섬광계측기(LSC)에 의해 측정된다. 양성반응은 배경에 두 표준편차를 합한 것 이상으로 반응하는 것으로 정의된다. IFN- γ 의 방출은 당업자에게 알려진 ELISA 방법에 의해 측정될 수 있다. 양성반응은 배경에 두 표준편차를 합한 것 이상으로 반응하는 것이다. IFN- γ 보다 기타 사이토카인(cytokines)은 IL-12, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF- β 과 같은 폴리펩타이드에 면역반응을 모니터할 때 관련될 수 있다. 면역반응을 검출하기 위한 다른 더 민감한 방법은 IFN- γ 분비하는 세포의 빈도를 결정하는 ELISpot 방법이다. 단계적인 안티-뮤린(murine) IFN- γ 항체(PharMingen)로 이미 코팅된 ELISpot 플레이트(MAHA, Millipore)에서 혈액, 비장 또는 폐 중에서 하나로부터 분리된 세포의 수(대체로 1내지 4×10^5 세포/well)는 ml당 20 μ g이하의 농도가 되는 웨타이드 혼합물의 존재 또는 면역원성 일부의 존재에서 24-32시간 동안 배양된다. 플레이트는 연속적으로 바이오틴레이티드 안티-IFN- γ 항체로 배양된 후 스트렙타비딘(streptavidin)-알칼리성의 포스타파아제로 배양된다. IFN- γ 분비 세포는 스팟을 발생하는 관련 기질 BCIP/NBT (Sigma)에 의해 확인된다. 이 스팟은 해부 현미경을 사용하여 열거될 수 있다. 또한 그것은 PCR 기술의 사용에 의해 관련된 사이토카인을 위해 부호화하는 mRNA의 존재를 결정하는 것이 가능하다. 일반적으로 하나 이상의 사이토카인은 예를 들어 PCR, ELISPOT 또는 ELISA를 이용하여 측정될 것이다. 특히 웨타이드 혼합물에 의해 유도된 이러한 어떤 사이토카인의 양에서 중요한 증가 또는 감소는 폴리펩타이드의 면역학적 활성의 평가에서 사용될 수 있는 것은 당업자에 의해 인식될 것이다.

<48> -시험관내 세포반응은 T-세포 라인이 살아있는 박테리아, 박테리아성 세포로부터의 추출물 또는 IL-2을 첨가하여 10 내지 20일 동안의 배양 여지 중 하나로 얻어졌던 면역 개체 또는 감염된 사람으로부터 유래된 T-세포 라인의 사용에 의해 결정될 수 있다. 유도는 웰(well)당 1×10^5 세포 내지 3×10^5 세포를 포함하는 T-세포 주에 혼탁액 ml 당 20 μ g 이하의 웨타이드 혼합물의 추가에 의해 수행되어지고, 배양은 2 내지 6일 동안 수행되어진다. IFN- γ 의 유도 또는 다른 관련된 사이토카인의 방출은 ELISA에 의해 검출된다. 또한 T-세포의 자극은 상기 기재된 바와 같이 방사성 표지된 티미딘(Thymidine)을 사용한 세포 분열증식이 모니터될 수 있다. 두 분석에서 양성반응은 배경에 두 표준편차를 더한 것보다 더 반응한다.

<49> ?-생체 내(in vivo)세포 반응은 악성 박테리아로 임상으로 또는 잠복성으로 감염된 각개에서 폴리펩타이드 또는 면역성 부분이 100 μ g이하의 피내주사 또는 국부적용 폐치 사용 후에 양이온 DTH 반응으로서, 주입 또는 적용하고 72-96 시간 후에 적어도 5mm의 직경을 가지는 양성반응 결정될 수 있다.

<50> -시험관 내(in vitro) 체액성 반응은 면역 또는 감염된 개체 내의 특이 항체반응에 의해 결정된다. 항체의 존재는 웨타이드 혼합물 또는 면역원성 부분이 니트로셀룰로오스 세포막이나 폴리스티렌 표면 중 하나로 흡수되는 ELISA 기술 또는 웨스턴 블랏에 의해 결정될 수 있다. 혈청은 1:10 내지 1:100으로 PBS 내에서 희석되었고, 흡수된 폴리펩타이드 혼합물이 추가되고, 1 내지 12시간 배양되었다. 표지된 2차 항체를 사용하여 특이 항체의 존재가 웨스턴 블랏 양성 반응이 배경과 두 표준편차를 더한 것 또는 선택적으로 선명한 반응 이상으로 반응하는 OD(예를 들어 ELISA)를 측정해서 결정될 수 있다.

<51> -다른 관련된 파라미터는 보강제 내의 웨타이드 혼합물로 백신접종 또는 DNA백신접종 후에 유도된 동물 모델에서 방어 측정이다. 적합한 동물 모델은 감염으로 공격되는 기니아 피그 또는 쥐와 같은 영장류를 포함한다. 유도된 방어의 판독은 백신접종을 하지 않은 동물과 비교하여 표적 장기내에 박테리아 적재량의 감소, 백신접

종을 하지 않은 동물과 비교하여 생존의 연장 및 백신접종을 하지 않은 동물과 비교하여 몸 무게의 감소일 수 있다.

<52> 제조방법

<53> 일반적으로, 상기 항원을 부호화한 항원 및 DNA서열은 다양한 과정의 어느 것이든 하나를 사용하여 제조될 수 있다.

<54> 웨타이드 혼합물은 웨타이드 단편이 약 100 아미노산 보다 적고 일반적으로는 50 아미노산 보다 적을 때 합성으로 생성될 수 있으며, 아미노산이 성장하는 아미노산 사슬에 연속적으로 추가되는 상업적으로 유용한 고체상(solid-phase)기술과 같은 당업계에서 잘 알려진 사용하여 생성될 수 있다.

<55> DNA 백신 접종을 위하여 본 발명에서 정의된 것과 같은 웨타이드 혼합물을 부호화한 플라스미드(Plasmid) DNA의 제작 및 제조에서 *E. coli* 과 같은 호스트종이 사용될 수 있다. 플라스미드 DNA는 목적의 플라스미드를 운반하는 호스트종의 배양으로부터 제조되고, 내독소 제거 단계를 포함하는, 예를 들어 퀴아젠 기가-플라스미드 컬럼 키트(퀴아젠, 산타클라리타, CA, 미국)를 사용하여 정제된다. DNA 백신접종을 위하여 사용된 플라스미드 DNA는 내독소가 없는 것이 바람직하다.

<56> 항원의프로테아제 다이제스트

<57> 중복 웨타이드의 세트는 예를 들면 *E. coli* 내에 재조합형 표시된 단백질로 발현될 수 있는 완전한 단백질의 가수분해에 의해 만들어 질 수 있고 금속 킬레이트 크로마토그래피와 같은 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제된다. 둘 이상의 단백질 가수분해제는 다른 단편 및 그로 인한 중복 웨타이드 혼합물을 생성하는 것으로 선택될 수 있다. 트립신, V-8 프로타아제, AspN 또는 키모트립신과 같은 단백질 가수분해 효소가 이용되거나 CNBr 또는 BNPS-스캐톨 같은 화학약품이 이용될 수 있다. 절단위치의 수 및 생성된 단편의 길이는 단백질의 아미노산 서열 및 특이 절단제, 예를 들어 이스파르트산 및 시스테인산 잔기의 N-끝쪽에서 단백질을 가수분해 하는 Asp-N에 의해 결정된다. 상기 V-8 프로타아제는 pH 7.8에서 암모늄 바이카보네이트 완충액에서 글루타민산의 카르복실기 측을 분해한다. 단백질 가수분해 효소에서 절단전에 비즈와 효소와의 결합이 가능하고(16), 이 결합은 비즈의 원심 분리에 의해 절단을 완료 후 효소에서 제거될 것이다. 선택적으로, 상기 프로테아제는 젤 여과법 또는 역상 HPLC와 같은 크로마토그래피 방법에 의해 소화 혼합물에서 제거될 수 있다. 단백질의 소화 후에, 소화물의 질량 분석기 분석은 단백질의 분해가 예상한 대로 일어난 것을 확인하기 위하여 수행된다. 최종적으로, 두 소화 혼합물은 중복 웨타이드의 혼합물을 형성하기 위하여 결합될 수 있다.

<58> 단백질 백신

<59> 재조합형 단백질로 백신접종은 이 단백질 내의 우성 웨타이드 항원결정기의 한정된 수에 가까이 T-세포 반응을 유도할 것이다. 반대로, 단백질의 전체 아미노산 서열에 걸친 중복 웨타이드의 혼합물로 백신접종을 하는 것은 우성과 준우성 웨타이드 항원결정기 모두에서 항원결정기의 증가된 수에 대하여 T-세포 반응을 생성할 것이다.

<60> 본 발명은 본 발명에 따른 웨타이드 혼합물을 포함하는 백신 조성물에 관련된다. 상기 백신 조성물의 최적의 수행을 보증하기 위하여 면역학적으로 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 매개체 또는 보강제를 포함하는 것이 바람직하다.

<61> 본 발명의 웨타이드 혼합물은 동물에 의해 인지된다는 점에서 예방적인 또는 치료적인 백신으로써 주어질 때 백신접종이 안된 동물과 비교하여 동물모델에서 표적 장기 내에 박테리아 적재량을 감소할 수 있고 생존 시간을 연장할 수 있고/있거나 감염체로 공격 후 무게 감소를 줄일 수 있는 효과적인 백신이다.

<62> 적당한 매개체는 희석제 및 혼탁제로 이루어진 그룹에서 선택된다. 보강제는 DDA, Quil A, 폴리 I:C, 수산화 알루미늄, 프라운드(Freund's)의 불완전한 보강제, IFN- γ , IL-2, IL-12, 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A; MPL), 트리홀로스 디마이코레이트(Treholose Dimycolate, TDM), TDB 및 뮤라밀 디펩티드(muramyl dipeptide; MDP)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

<63> 보강제는 항원에 대한 면역반응을 비특이적으로 향상시키는 물질로 정의된다. 보강제의 본질에 따라 그것은 세포성면역반응, 체액성 면역반응 또는 두 반응의 혼합을 증진시킬 수 있다. 면역반응의 상승이 비특이적이기 때문에 그것은 예를 들어 결핵균(*M. tuberculosis*)에 대하여 면역을 증진시키기 위한 결핵균으로부터의 항원 또는 특유한 종류의 종양에 대하여 면역을 증진시키기 위하여 종양으로부터 유래된 항원과 같은 동일한 보강제가 다른 타겟에 대하여 반응을 증진시키기 위하여 다른 항원과 함께 사용될 수 있는 것이 이 분야에서 잘

이해된다.

- <64> '리포좀'은 수성 핵을 포위하는 하나 이상의 지질 이중층을 구성하는 닫힌 소포 구조로 정의된다. 각 지질 이중층은 소수성 '꼬리'영역 및 친수성 '머리'영역이 있는 두 개의 지질 단층으로 구성된다. 이중층에서, 친수성 '머리'가 이중층 외부로 향하는 동안 지질단층의 소수성 '꼬리'는 이중층 내부로 향한다. 리포좀은 크기, 지질 구성, 표면 전하, 유동성 및 이중층 세포막의 수와 같은 다양한 물리화학적인 특성을 가질 수 있다. 지질 이중층의 수에 따라 리포좀은 단지질 이중층을 포함하는 단일박막소포(unilamellar vesicles; UV) 또는 물층에 의해 다음으로부터 각 분리된 각각 둘 이상의 동축형 이중층을 포함하는 다박막소포(multilamellar vesicles; MLV)로서 분류될 수 있다. 지질 이중층 세포막의 핵에서 잡힌 친유성 화합물과 반대로 수용성 화합물은 리포좀의 수성 상/핵 안에서 잡히게 된다.
- <65> 백신접종에 사용된 웨타이드 혼합물은 본 발명에 참고문헌으로 편입된 WO2006002642에서 기재된 것과 같이 미리 형성된 리포좀과 혼합될 수 있고, 또는 각 웨타이드는 동일한 방법에서 미리 형성된 리포좀과 혼합될 수 있으며, 리포좀내에 제조된 각 웨타이드는 면역화 전에 혼합된다.
- <66> 리포좀의 표준 제조는 유기 용매에서 지질을 용해시키는 것에 의하고 유기 용매는 시험관 안에 얇은 지질 필름을 남기는 건조함에 이르도록 증발된다. 건조 지질 필름은 적당한 양의 수성 상에서 그 때 수화되고, 혼합물은 지질의 상전이 온도 보다 초과하여 가열되어 '팽창' 된다. 다박막소포(MLV's)로 이루어져 생기는 리포좀은 시험관을 흔들어서 분산된다.
- <67> 리포좀에서 웨타이드 또는 웨타이드 혼합물의 상호작용을 위한 다른 원리가 존재한다. 한가지 방법은 미리 형성된 리포좀(19)을 가진 웨타이드의 배양에 의한 리포좀을 가진 웨타이드의 표면회합(정전기학 또는 소수성 상호작용에 의해)이다. 그것은 화학적 교차결합에 의해 리포좀의 표면에 웨타이드의 공유결합을 생성하는 것도 가능하다(예를 들어, 참고문헌 20에 설명됨). 더욱이, 상기 웨타이드는 다른 방법에 의해 리포좀 내에 캡슐화될 수 있다. 한 방법은 지질필름 안으로 직접 웨타이드를 추가하고 재수화하는 것이다. 다른 방법은 지질필름의 리포좀의 재수화를 위해 사용된 완충액에 웨타이드를 추가하는 것이다. 더욱이, 상기 웨타이드는 웨타이드가 동결건조에 의해 캡슐화 되고, 감압하 동결건조된 리포좀을 재수화하는 탈수-재수화 방법(21)으로 캡슐화될 수 있다. 선택적으로, 항원은 Pick (22) 및 미국 특히 Bally et al. No. 4,975,282에서 기재된 냉동과 해동 기술을 이용하여 캡슐화될 수 있다. 이 기술에서 매개체는 단백질 항원과 혼합되고 액체 질소에서 반복적으로 갑자기 동결하며 관련된 지질의 주요 상전이 온도 이상의 온도에서 데워진다. 매개체는 예를 들어 세척 또는 원심분리에 의해 잡히지 않은 항원을 제거하기 위하여 추가로 처리된다.
- <68> 마지막으로, 웨타이드 혼합물은 두 방법으로 리포좀에 의해 전달될 수 있다. 웨타이드는 리포좀과의 상호작용 전에 혼합되거나 상기 기재된 바와 같이 리포좀과의 각개 웨타이드의 상호작용 후에 혼합될 수 있다.
- <69> 또한 웨타이드는 지질 필름 또는 동결 건조된 형태로부터 리포좀의 재수화에 사용된 완충액에 웨타이드를 추가하여 리포좀 내에 캡슐화될 수 있다.
- <70> 폴리웨타이드는 글루코실화, 지질화(예를 들어, Mowat et al. 1991에서 기재된 PAM3Cys(18)로 표지된 팔미토일옥시 석신아미이드(palmitoyloxy succinimide)를 가지는 화학적 지질 또는 Lustig et al. 1976에 의해 기재된 도데카노일 클로라이드(dodecanoyl chloride)), 배합군을 포함하는 것 또는 TLR 작용제에 직접 접합(예를 들어, Seder 2006에서 설명된)에 의해 화학적 변형될 수 있다.
- <71> 활성 성분으로서 웨타이드 서열을 포함하는 백신의 제조는 본 발명에서 참고문헌으로 모두 편입되었고 미국 특히 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231 및 4,599,230에서 예시된 바와 같이 당업계에서 일반적으로 잘 이해된다.
- <72> 백신에 대한 보강제 효력을 달성하기 위한 다른 방법은 수산화 알루미늄 또는 인산(명반), 설탕의 합성 폴리머(카보폴; Carbopol), 가열처리에 의한 백신에서 단백질 응집, 알부민에서 웨신 처리된(Fab) 항원에서 재활성화에 의한 응집, C. 파퓸(parvum) 또는 내독소 또는 그람음성 박테리아의 지질다당질(lipopoly-saccharide) 성분과 같은 박테리아 세포를 가지는 혼합물, 맨나이드 모노-유산염(mannide mono-oleate; Aracel A)과 같은 생리학적으로 허용 가능한 오일 매개체 내의 에멀젼 또는 블록 치환체로서 사용된 퍼플루오르화카본(perfluorocarbon; Fluosol-DA)의 20% 용액을 가지는 에멀젼과 같은 제제의 사용을 포함한다. 다른 가능성은 상기 언급된 보강제 와의 결합에서 폴리 I:C와 같은 합성 IFN- γ 유도인자 또는 사이토카인과 같은 면역조절물질의 사용이 관련된다.
- <73> 보강제 효능을 달성하기 위한 다른 흥미로운 가능성은 (17)에서 기재된 기술을 적용하는 것이다(여기 참고문헌에 편입됨). 간단히, 본 발명의 항원과 같은 관련된 항원은 단핵세포/대식세포의 Fc γ 수용체에 대한 항체(또

는 항체 단편을 연결하는 항원)가 결합될 수 있다.

<74> 상기 백신은 투여 제형과의 융화성의 방법으로 치료상 효과적이고 면역원성인 양으로 투여된다. 상기 투여되어지는 양은 투여되어지는 대상 및 예를 들어 면역반응을 상승시키기 위한 개체의 면역 시스템의 수용량을 포함하는 방어가 요구되는 정도에 의존한다. 적당한 투여 범위는 약 1 μg 내지 300 μg 의 범위 그리고 특히 약 10 μg 내지 50 μg 의 범위와 같은 약 0.1 μg 내지 1000 μg 의 바람직한 범위로 백신접종 당 약 수백 마이크로그램 활성성분이다. 초기 투여 및 촉진제 주사에 대한 적당한 처방계획은 가변적이지만, 처음 투여에 이은 연속적인 접종 또는 다른 투여에 의해 예시된다. 적용방법은 폭넓게 다양할 수 있다. 백신의 투여에 대한 종래의 어떤 방법이 적용된다. 이들은 고체 생리학적으로 허용 가능한 염에서 경구 적용 또는 생리학적으로 허용 가능한 분산에서 비경구적 또는 그와 같은 것에 의하여 포함되어 있을 것으로 믿어진다. 백신의 투여량은 투여의 경로에 의존할 것이고, 백신접종된 사람의 나이 그리고 그보다는 덜하지만 백신접종된 사람의 몸집에 따를 것이다.

<75> 백신은 예를 들어 피하 내에 또는 근육내로 주입에 의해 전통적 비경구적으로 투여된다. 투여의 다른 방법에 대해 적합한 추가적인 제형은 좌약을 포함하고 어떤 경우에는 경구제형을 포함한다. 좌약에 있어, 종래의 결합제와 담체(예를 들어, 폴리 알칼렌글리콜(polyalkalene glycols) 또는 트리글리세리드(triglycerides))가 포함될 수 있다. 각 좌약은 0.5 내지 10% 범위, 바람직하게는 1-2%에서 활성성분을 포함하는 혼합물로부터 형성될 수 있다. 경구제형은 일반적으로 사용되는 첨가물, 예를 들어 약학적 등급의 만니톨, 락토오스, 녹말, 스테아린산마그네슘, 소듐사카린, 셀룰로오스, 마그네슘 카보네이트 및 이와 유사한 것을 포함한다. 이러한 조성물은 용제, 혼탁액, 정제약, 환약, 캡슐, 연속 방출제형 또는 분말의 형상을 갖고, 활성성분의 10-95%, 바람직하게는 25-70%를 바람직하게 포함한다.

<76> 많은 경우에 백신의 복합적 투여를 가지는 것이 요구될 것이다. 특히, 백신은 감염을 예방하기 위하여 투여될 수 있다. 감염을 예방하기 위하여 투여될 때, 감염의 결정적인 임상신호 또는 증후가 존재하기 전에 백신이 예방적으로 투여된다. 현재 백신(예를 들어 BCG)은 효과적이지만 단명하는 면역반응을 유도하는 것처럼 나타나고, 또한 예방 백신은 촉진제 백신으로 사용되기 위하여 디자인될 수도 있다. 이런 백신은 방어 기간을 연장할 목적으로 이전에 백신접종을 받은 개체에 대하여 투여된다.

<77> 개체가 이미 감염이 되었거나 감염이 되었다고 의심되는 경우에는 이전 백신접종은 1차 질병을 막기 위하여 충분한 면역성이 제공될 수 있지만 이전에 논의된 것처럼, 이 면역반응을 촉진하는 잠재적인 감염에 도움되지 못할 것이다. 이런 상황에서, 백신은 감염의 잠재적인 단계에 대한 효능을 위해 디자인된 치료 백신으로 특정한 이점이 있다.

<78> 중요하게 TB, 암, 간염 및 HIV와 같은 만성질병에서, 숙주와 병원균 사이에 긴 기간 평형은 약간의 면역-우성 항원결정기쪽으로 집중된 면역반응을 종종 초래된다. 투여된 단백질 내의 항원결정기의 범위에 대하여 넓은 안정된 반응을 유도하는 것은 우성 항원결정기의 한정된 수에 대한 반응만을 이끌어 내는 재조합 단백질로 면역하여 달성될 수 없다. 대조적으로, 본 발명은 중복 펩타이드의 혼합물로 백신접종을 하는 것이 투여된 단백질 내, 준우성 항원결정기를 포함하는, 항원결정기의 범위에 대한 T-세포 면역반응을 유도한다는 것을 가리킨다. 그러므로 재조합형 전체 길이 형태의 단백질로 백신접종 또는 만성질병 바로 그 자체에 의하여 유도되지 않는 방어적 항원결정기에 대하여 면역반응을 유도할 수 있기 때문에 본 발명 준우성 항원결정기에서 반응의 유도는 이러한 질병에 특유한 이점을 가진다. 종래의 예방 백신접종 또는 치료방법에서의 노출된 후에, 펩타이드 혼합물 백신기술의 적용은 이러한 만성질병에 대한 전체 크기 분자에서 기초한 종래 백신보다 더 높은 활성을 가지며 뛰어나다.

<79> 더욱이, 체액 면역성이 중요한 만성질병에 있어 동일한 단백질로 최대의 B-세포반응 및 최적의 광범위한 T-세포 반응을 유도하는 것이 가능하다. 이러한 상황에서 1차 면역화하는 주어진 단백질의 전체 서열에 걸친 중복 펩타이드의 혼합(보강제내의)으로 행해지고, 촉진은 보강제 내에 재조합 형태로 동일한 단백질을 포함하는 두 번째 백신으로 달성된다. 이와 같이 우성 및 준우성 항원결정기 모두에 대한 광범위한 T-세포 반응은 최대의 T-도움세포 활성 및 그로 인한 매우 강한 항체반응을 가능하게 한다. 반응 결과는 만성질병에 대한 특이한 용도를 가진 동일한 항원으로 광범위한 T-세포 및 최대의 항체반응이다.

실시예

<99> 실시예 1:

- <100> ESAT-6.
- <101> 우성 및 준우성 항원결정기를 포함하는 결핵균 발현된 항원 ESAT-6를 단계로 시험하기 위한 쥐는 2주 간격으로 3회 재조합형 단백질 ESAT-6로 백신접종되고, 세포는 마지막 백신접종 2주 후 혈액으로부터 얻어졌고, ELISA에 의한 분석된 것처럼 IFN-감마의 분비 결정된 후 표시된 ESAT-6 웨타이드 (도 1A)로 자극되었다. 결과는 P1 및 보다 적은 정도의 P2를 위하여 특이 T-세포를 생산하는 IFN-감마의 유도를 보였다. ESAT6 ("아미노산 1-15가 삭제된 △15-ESAT-6" (도 1B)라고 명명된 구조)로부터 면역우성 항원결정기 P1을 제거하는 것은 새로운 항원결정기, P2 및 특이 P3의 면역인지를 이끌어 내었다. 이것은 P1이 우성 항원결정기이고 P2 및 P3가 준우성(그러나 면역성) 항원결정기를 구성한다는 것을 설명했다.
- <102> 우리는 다음으로 준우성 항원결정기가 결핵균(*M. tb*)의 감염에 대하여 방어를 할 수 있었는지를 시험했다. 쥐는 식염수, BCG, ESAT6 또는 △15ESAT6를 가지는 DDA/TDB로 2주 간격으로 3회 피하로 백신접종 되었다. 마지막 백신접종 6주 후, 쥐는 악성의 결핵균(*M. tb*)으로 공격되었다. 공격 6주 후, 상기 쥐는 희생되었고 박테리아 존재량(CFU)이 폐에서 측정되었다.
- <103> 방어 실험은 △15-ESAT-6가 ESAT-6 보다 더 방어한다는 것(도 3)을 보여주며, 준우성 웨타이드 (항원결정기) P2 및 P3가 결핵균(*M. tb*) 감염에 대하여 방어를 매개하는 면역 반응을 유도할 수 있다는 것을 가리킨다.
- <104> 우리는 모든 중복 ESAT-6 웨타이드 혼합으로 백신접종 한 것이 재조합 단백질 ESAT-6로 백신접종된 쥐와 비교하여 P1-P13의 광범위한 인지를 이끌어낼 것인지를 시험했다. 쥐는 모든 웨타이드의 혼합물로 2주 간격으로 3회 백신접종 되었고, 면역반응은 각각 ESAT-6 웨타이드 P1-P13의 각각으로 혈액세포를 배양하여 연구되었다 (도 11). 결과는 재조합 단백질 ESAT-6로 백신접종하는 것과 대조적으로 ESAT-6 웨타이드 (P1-P13) 혼합물의 백신접종은 웨타이드의 광범위한 인지를 이끌어 낸다는 것을 보여주었다 (도 11).
- <105> 재조합 단백질 ESAT-6 백신접종으로 유도된 단백질에 비교된 것처럼 ESAT-6에 대한 광범위한 반응은 결핵균(*M. tuberculosis*) 감염에 대한 방어를 반영하였는지를 시험했다. 쥐는 ESAT-6 또는 ESAT-6-웨타이드 혼합물로 2주 간격으로 3회 백신접종되었다. 마지막 백신접종 6주 후, 상기 쥐는 악성 결핵균(*M. tb*)으로 에어로졸 공격을 받았다. 공격 10주 후, 상기 쥐는 희생되었고 박테리아 수는 폐에서 결정되었다.
- <106> 결과는 ESAT-6 웨타이드 혼합물로 백신접종된 쥐가 ESAT-6의 광범위한 인지를 나타낼 뿐만 아니라, 재조합 단백질 ESAT-6로 백신접종된 쥐와 비교하여, 결핵균(*M. tb*) 감염에 대하여 중요하게 더 방어적이라는 것도 보여주었다 (도 12). 그러므로, ESAT-6 웨타이드 혼합물로 백신접종하는 것은 재조합 단백질 ESAT-6으로의 백신 접종과 비교하여 결핵균(*M. tb*) 감염에 대하여 중요하게 더 높은 방어를 유도하는 ESAT-6 항원결정기의 광범위한 인지를 이끌어낸다.
- <107> 실시예 2:
- <108> TB10.4.
- <109> 우리는 *M. tb*에 의해 발현된 다른 단백질 TB10.4를 분석했다. 쥐는 재조합형 TB10.4으로 2주 간격으로 3회 백신접종 되었고, 세포는 혈액에 마지막 백신접종 2주 후 얻어졌고 표시된 TB10.4 웨타이드 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 자극되었다 (도 4). 그리고 ELISA에 의해 평가된 것처럼 IFN-감마 분비가 확인되었다. 결과는 TB10.4로 백신접종은 P3 특이 T-세포를 주로 유도한다는 것을 보여주었다 (도 5). 그러므로 P3는 우성 항원결정기가 구성된다.
- <110> 실시예 3:
- <111> 웨타이드 P1, P2, P4, P5, P6, 및 P9 (및 어떤 정도 P7 및 P8)에 반응하는 T-세포의 부족이 면역성이 없거나 준우성인 이러한 웨타이드 항원결정기를 때문인지 아닌지를 분석하기 위하여 우리는 각각 TB10.4 웨타이드 (P1-P9)로 다음 백신접종을 하였다. 백신접종 한 다음 정제된 림프구가 백신접종에 사용된 동일한 웨타이드를 시험관 내에서 자극하였고 IFN-γ 분비가 ELISA에 의해 결정되었다. 결과는 다른 준우성 (재조합 단백질 TB10.4로 백신접종을 할 때) 웨타이드 역시 강한 면역성인 것을 보여준다. 특히 웨타이드 1 또는 3, 또는 보다 적은 정도인 P7, P8, 또는 P9로 백신접종은 특이 T-세포 반응을 유도하였다(도 6). 더욱이, 상기 준우성 웨타이드, 특히 P1, P7, P8, P9는 결핵균(*M. tb*) 감염을 모두 방어하였다(도 7). 우성 웨타이드 항원결정기 P3 백신접종은 중요한 방어를 유도하였다.
- <112> 실시예 4:
- <113> 재조합형 단백질 TB10.4로 백신접종할 때 준우성 항원결정기의 존재를 결정하고 모든 중복 TB10.4 웨타이드의

혼합물로의 백신접종이 재조합 단백질 TB10.4으로 백신접종이 된 쥐와 비교하여 P1-P9의 광범위한 인지를 이끌어 낼 것인지를 시험했다. 쥐는 모든 웹타이드 혼합물로 2주 간격으로 3회 백신접종이 되었고, 면역반응은 각각 TB10.4 웹타이드 P1-P9의 각각으로 혈액세포를 배양하여 연구되었다 (도 8).

<114> 결과는 재조합 단백질 TB10.4로 백신접종하는 것과 대조하여 TB10.4 웹타이드 (P1-P9)의 혼합물로 백신접종은 웹타이드의 훨씬 더 광범위한 인지를 이끈다는 것을 보여주었다. 특히, P1, P3, 및 P8은 모두 강하게 인지되었다 (도 8).

<115> 실시예 5:

<116> 재조합 단백질 TB10.4로 백신접종에 의해 유도된 단백질과 비교된 것처럼 TB10.4에 대한 더 광범위한 반응이 결핵균 감염에 대한 방어를 반영하는지를 시험하기 위하여 쥐는 TB10.4 또는 TB10.4 웹타이드 혼합물로 2주 간격으로 3회 백신접종되었다. 마지막 백신접종 6주 후, 상기 쥐는 악성 결핵균(*M. tb*)으로 에어로졸 공격을 받았다. 공격 6주 후, 상기 쥐는 희생되었고, 상기 박테리아 수는 폐에서 결정되었다.

<117> 결과는 TB10.4-웹타이드 혼합물로 백신접종이 된 쥐는 TB10.4의 더 광범위한 인지를 나타낼 뿐만 아니라, 재조합 단백질 TB10.4로 백신접종된 쥐와 비교하여 *M. tb* 감염에 대하여 중요하게 더욱 방어됨을 보여주었다 (도 9). 그러므로, TB10.4 웹타이드 혼합물로 백신접종하는 것은 재조합 단백질 TB10.4으로의 백신접종과 비교하여 결핵균(*M. tb*) 감염에 대하여 중요하게 더 높은 방어를 유도하는 TB10.4 항원결정기의 광범위한 인지를 이끌어낸다.

<118> 실시예 6:

<119> ct521

<120> 쥐는 재조합형 CT521 또는 CT521 중복 웹타이드 혼합물로 2주 간격으로 3회 백신접종이 되었고, 마지막 백신접종 2주 후 혈액으로부터 얻어진 세포는 CT521 웹타이드 각각 0.5 μ g/ml로 자극되었다. ELISA에 의해 측정되는 것과 같이 IFN-감마 분비는 CT521 웹타이드 혼합물로 백신접종이 재조합 CT521 단백질로의 백신접종과 비교하여 CT521의 더 광범위한 인지를 이끌어 내는지를 검사하기 위하여 결정되었다.

<121> 참고문헌

1. Paul, W. 1999. *Fundamental Immunology*, fourth edition, Lippincott-Raven.
2. Sette, A., and J. Fikes. 2003. *Curr Opin Immunol* 15:461.
3. van der Most, R. G., K. Murali-Krishna, J. G. Lanier, E. J. Wherry, M. T. Puglielli, J. N. Blattman, A. Sette, and R. Ahmed. 2003. *Virology* 315:93.
4. Crowe, S. R., S. J. Turner, S. C. Miller, A. D. Roberts, R. A. Rappolo, P. C. Doherty, K. H. Ely, and D. L. Woodland. 2003. *J Exp Med* 198:399.
5. Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most, and R. Ahmed. 2003. *J Virol* 77:4911.
6. Kamath, A. B., J. Woodworth, X. Xiong, C. Taylor, Y. Weng, and S. M. Behar. 2004. *J Exp Med* 200:1479.
7. Olsen, A. W., P. R. Hansen, A. Holm, and P. Andersen. 2000. *Eur J Immunol* 30:1724.
8. McMichael, A. J., and R. E. Phillips. 1997. *Annu Rev Immunol* 15:271.
9. Mowat *et al* 1991, *Immunology* 72(3):317-22
10. Lustig *et al* 1976, *Cell Immunol* 24(1):164-7
11. Wille-Reece, U., C. Y. Wu, B. J. Flynn, R. M. Kedl, and R. A. Seder. 2005. *J. Immunol.* 174:7676.6
12. Thompson J., *et al* Nucleic Acids Res 1994 22:4673-4680
13. Ravn, P. *et al* 1999. *J. Infect. Dis.* 179:637-645

- <136> 14. Stryhn, A., *et al* 1996 Eur. J. Immunol. 26:1911-1918
- <137> 15. Harboe, M., *et al* 1998 Infect. Immun. 66:2; 717-723
- <138> 16. Krogh, TN, Berg, T, & Hojrup, P. (1999). Anal. Biochem. 274, 153-162
- <139> 17. Gosselin *et al.*, 1992. J. Immunol. 149: 3477-3481
- <140> 18. Babu *et al.* 1995. Vaccine 13:1669-76.
- <141> 19. Davidsen *et al* (2005). Biochim Biophys Acta. 1718: 22-31.
- <142> 20. Munoz *et al* (2004). Int J Pharm 269:177-84.
- <143> 21. Kirby & Gregoriodis. 1984. 2 : 979-984.
- <144> 22. Pick U. 1981. Arch. Biochem. Biophys. 212: 186-194.

도면의 간단한 설명

<80> 도 1은 A. ESAT-6 중복 웹타이드의 개관. B. \triangle 15-ESAT-6의 아미노산 서열.

<81> 도 2는 비장세포(splenocytes)에서 ESAT6 및 \triangle 15ESAT6의 면역원성

<82> F1 (Balb/cx57BL/6) 쥐 그룹은 DDA/TDB내 식염수, ESAT6 또는 \triangle 15ESAT6로 2주 간격으로 3회 피하로 백신접종 하였다. 마지막 백신접종 3주 후, 비장세포는 1 μ g/ml ESAT6, \triangle 15ESAT6 또는 ESAT6 서열(도 1에 기재된 도면에 표시된 P1-P13)을 포함하는 13개 중복 웹타이드에서 하나로 자극 후 IFN- γ 분비를 위하여 ELISA로 분석되었다.

<83> 도 3은 ESAT6 및 \triangle 15ESAT6의 방어 효능

<84> F1 (Balb/cx57BL/6) 쥐 그룹은 식염수, BCG 또는 ESAT6 또는 \triangle 15ESAT6을 가지는 DDA/TDB로 2주 간격으로 3회 피하로 백신접종 하였다. 마지막 백신접종 6주 후, 쥐는 악성 결핵균(M.tb)로 공격되었다. 공격 6주 후, 상기 쥐는 희생되었고 박테리아 존재량(CFU)은 폐에서 측정되었다.

<85> 도 4는 TB10.4 중복웹타이드, P1-P9

<86> 도 5는 각개 웹타이드 P1-P9로 시험관 내 자극 후 재조합형 TB10으로 백신접종

<87> DDA/TDB 내의 DDA/TDB- TB10.4로 3회 백신접종 된 쥐로부터의 세포의 시험관 내 IFN- γ 반응. 세포는 마지막 백신접종 2주 후 혈액으로부터 얻어졌고 표시된 웹타이드 0.5 μ g/ml로 자극되었다.

<88> 도 6은 각개 웹타이드로 백신접종 후 TB10-4 웹타이드 P1-P9의 인지

<89> DDA/TDB 내의 각개 TB10.4 웹타이드로 3회 백신접종된 쥐로부터의 세포의 시험관 내 IFN- γ 반응. 세포는 마지막 백신접종 2주 후 혈액으로부터 얻어졌고 백신접종에 사용된 동일한 웹타이드 0.5 μ g/ml로 자극되었고, IFN- γ 의 분비는 ELISA에 의해 결정되었다.

<90> 도 7은 TB10-4 웹타이드 P1-P9의 방어능

<91> 마지막 백신접종 6주 후 악성의 결핵균(M.tb)으로 에어로졸 경로로 공격된 백신 접종된 쥐 (CFU 방어에서 \log_{10} 으로 빌현된)내의 박테리아 존재량. 공격 6주 후, 상기 쥐는 희생되었고 박테리아 존재량(CFU)은 폐에서 측정되었다 (백신접종하지 않은 쥐와 비교하여 * P<0.05, ANOVA 및 Tukey's 실험).

<92> 도 8은 TB10-4 웹타이드 P1-P9의 인지

<93> DDA/TDB TB10.4 웹타이드 혼합물로 3회 백신접종된 쥐로부터의 세포의 시험관 내 IFN- γ 반응. 세포는 마지막 백신접종 2주 후 혈액으로부터 얻어졌고 표시된 대로 웹타이드 0.5 μ g/ml 또는 TB10.4 단백질로 자극되었다.

<94> 도 9는 결핵균(M.tb)으로 감염된 TB10.4 또는 TB10.4 웹타이드 백신접종된 쥐에서의 박테리아 존재량

<95> 첫 번째 백신접종 10주 후 악성의 결핵균(M.tb)으로 에어로졸 경로로 공격된 백신접종되지 않은 대조구와 비교된 백신접종된 쥐 (CFU에서 \log_{10} 으로 빌현된)내의 박테리아 존재량. 공격 6주 후, 상기 쥐는 희생되었고 박테리아 존재량(CFU)은 폐에서 측정되었다 (* P<0.05, ANOVA 및 Tukey's 실험).

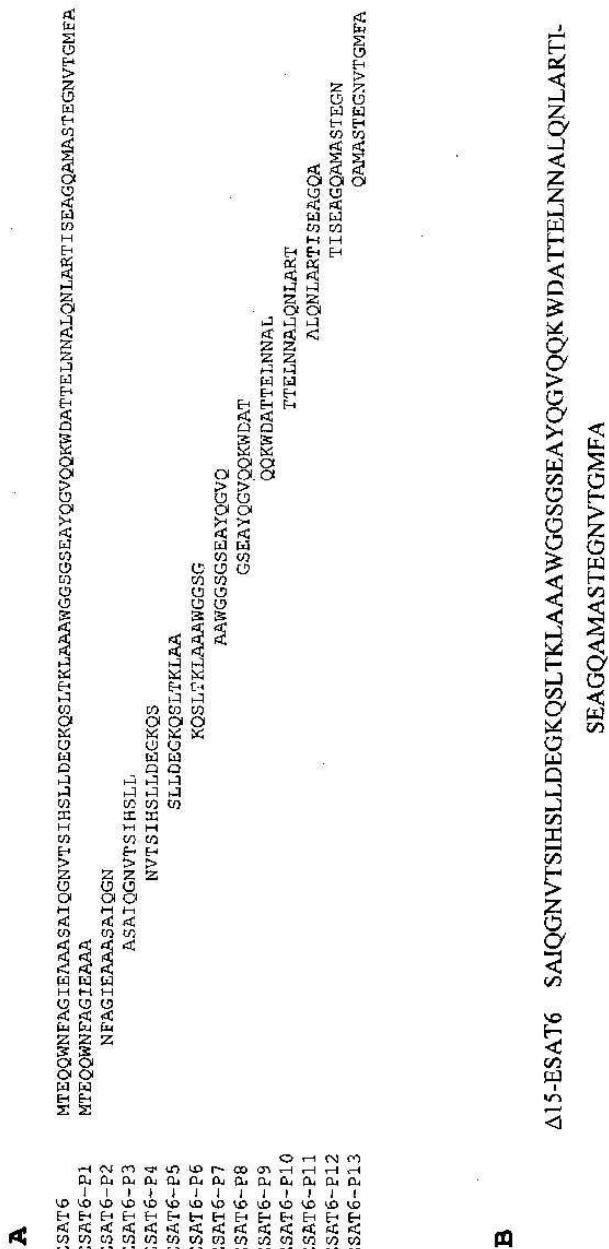
<96> 도 10은 CT521 중복펩타이드의 개요.

<97> 도 11에서 쥐는 모든 ESAT-6 펩타이드 (P1-P13)의 혼합물로 2주 간격으로 3회 백신접종 되었고, IFN-감마분비는 측정된 면역반응은 각개 ESAT-6 펩타이드 P1-P13의 각각을 가진 혈액세포를 배양하여 연구하였다.

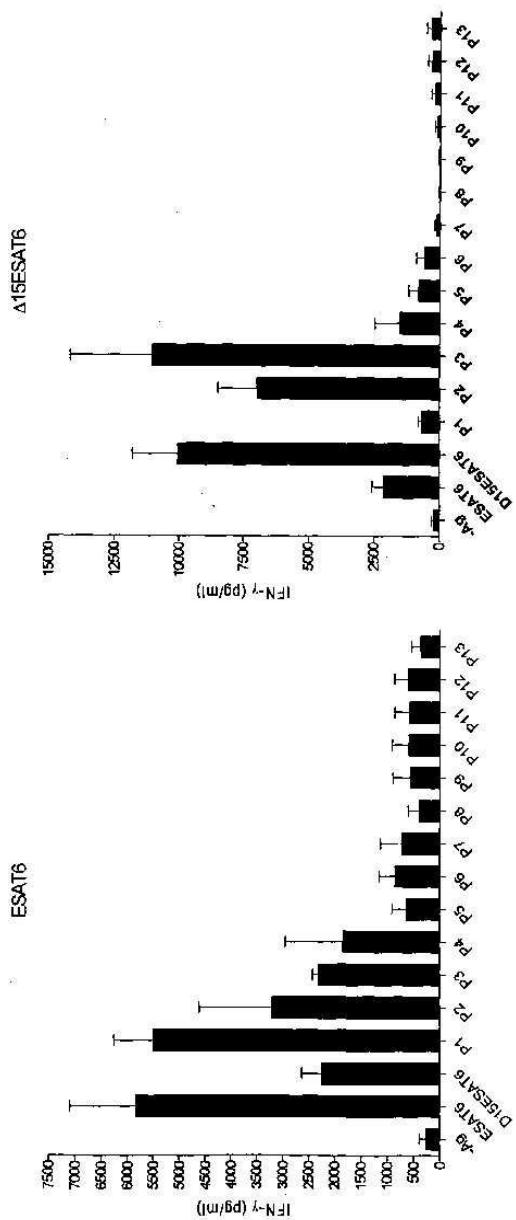
<98> 도 12에서 쥐는 ESAT-6 또는 ESAT-6-펩타이드 혼합물 (P1-P13)로 2주 간격으로 3회 백신접종 되었다. 마지막 백신접종 6주 후, 상기 쥐는 악성의 결핵균(M. tb)으로 에어로졸 공격을 받았다. 공격 10주 후, 상기 쥐는 회생되었고 박테리아 수는 폐에서 결정되었다.

도면

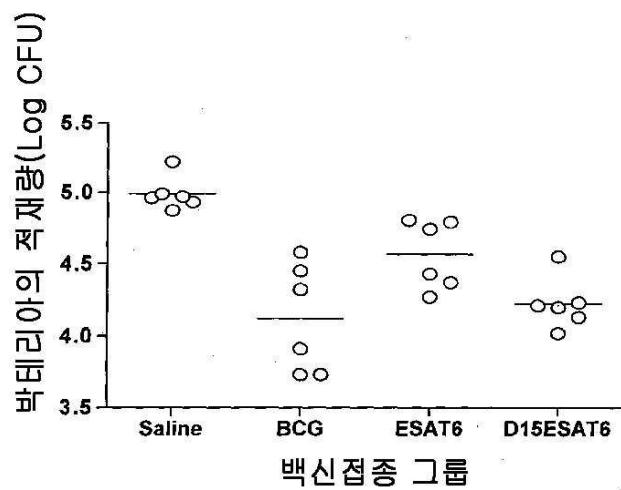
도면1



도면2



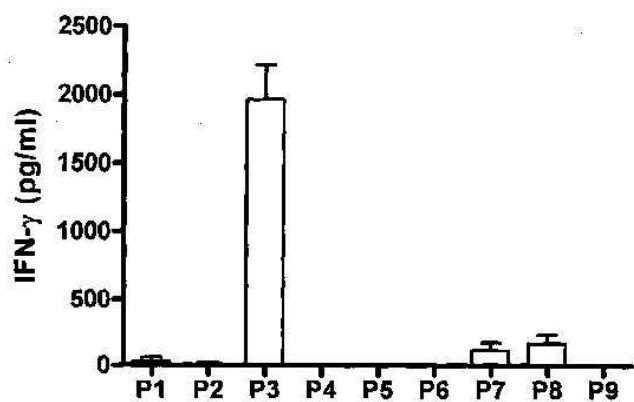
도면3



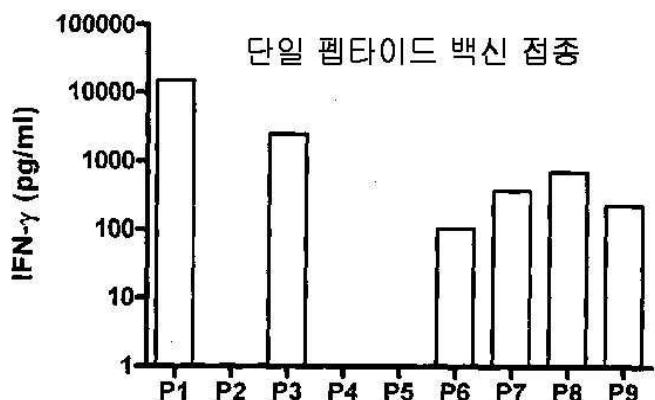
도면4

TB10.4	MSQIMNYPAMIGHAGDNAGYAGTLOSSLGAEIAVEQALOSAWOGDTGITYQAWQAQWQAMEDLVRAYHAMSSHEANTMAMMARDTAEEAKWGG
TB10.4-P1	MSQIMNYPAMIGHAGDN
TB10.4-P2	MLGHAGDNAGYAGTLOSSL
TB10.4-P3	YAGTLOSSLGAEIAVEQAA
TB10.4-P4	EIAVEQALOSAWOGDTG
TB10.4-P5	SAWOGDTGITYQAWQAQW
TB10.4-P6	YQAWQAQWQAMEDLVRA
TB10.4-P7	AMEDLVRAYHAMSSTHEA
TB10.4-P8	AMSSTHEANTMAMMARDT
TB10.4-P9	MAMMARDTAEEAKWGG

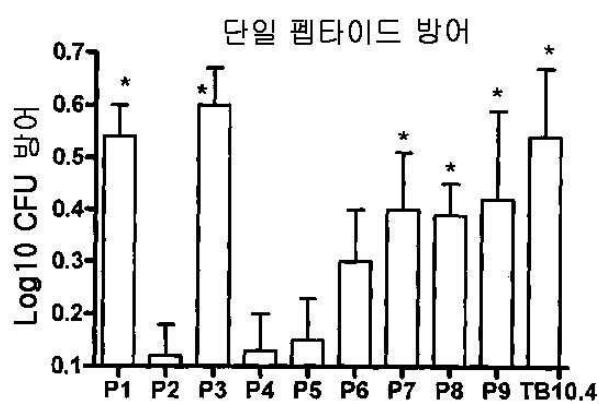
도면5



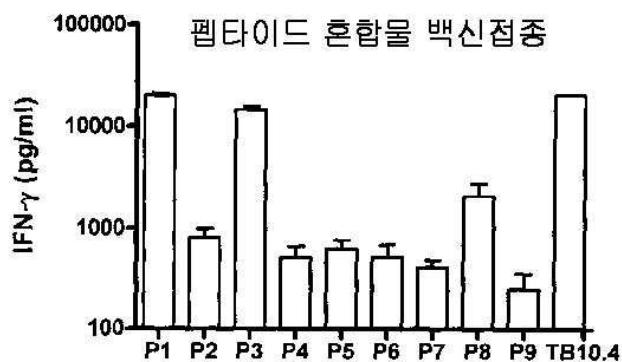
도면6



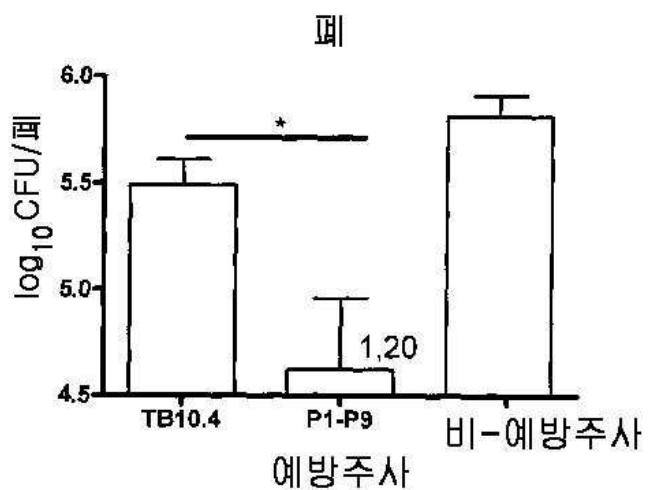
도면7



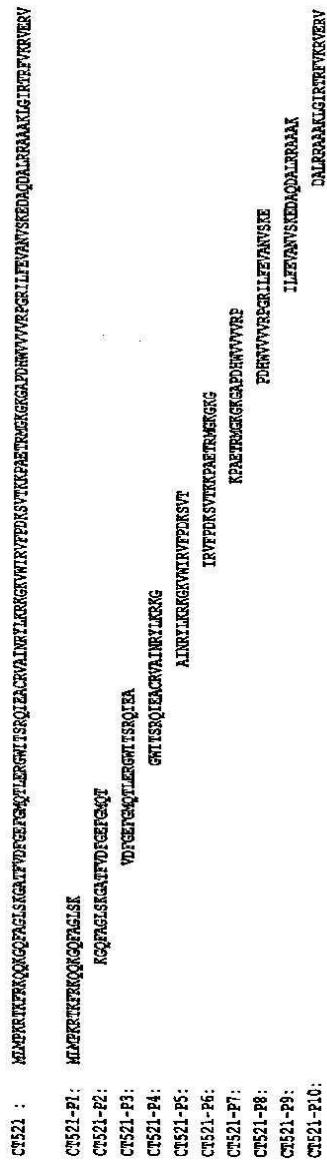
도면8



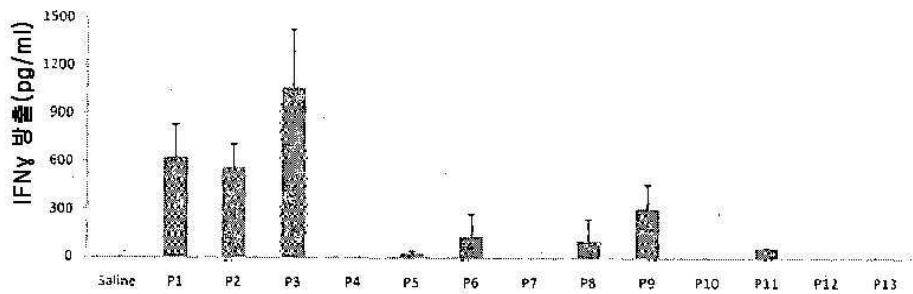
도면9



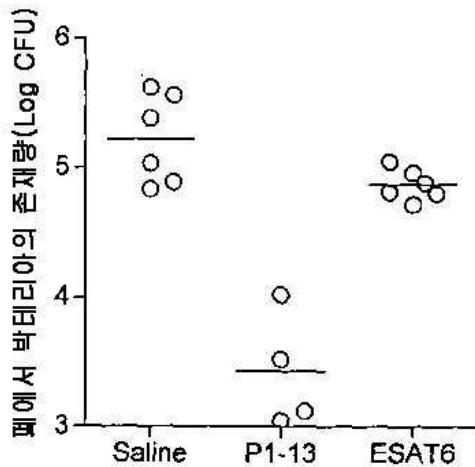
도면10



도면11



도면12



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Statens serum institut
- <120> Expanding the T cell repertoire to include subdominant epitopes
by vaccination with antigens delivered as protein fragments or
peptide cocktails
- <130> 44272PC01
- <150> PCT/DK2007/000312
- <151> 2007-06-26
- <160> 36
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 94
- <212> PRT
- <213> *Mycobacterium tuberculosis*
- <220>
- <223> ESAT6
- <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 Gln 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 Thr Glu Leu			
50	55	60	

Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln			
65	70	75	80

Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala			
85	90		

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> ESAT6-P1

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> ESAT6-P2

<400> 3

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

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> ESAT6-P3

<400> 4

Ala	Ser	Ala	Ile	Gln	Gly	Asn	Val	Thr	Ser	Ile	His	Ser	Leu	Leu
1				5				10					15	

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> ESAT6-P4

<400> 5

Asn	Val	Thr	Ser	Ile	His	Ser	Leu	Leu	Asp	Glu	Gly	Lys	Gln	Ser
1				5				10				15		

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> ESAT6-P5

<400> 6

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> ESAT6-P6

<400> 7

Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> ESAT6-P7

<400> 8

Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> ESAT6-P8

<400> 9

Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> ESAT6-P9

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> ESAT6-P10

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> ESAT6-P11

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> ESAT6-P12

<400> 13

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

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> ESAT6-P13

<400> 14

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

<210> 15

<211> 79

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> delta15-ESAT6 (ESAT6 in which the amino acids 1-15 have been deleted)

<400> 15

Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu
1 5 10 15

Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly
20 25 30

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

35

40

45

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
 50 55 60

Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 65 70 75

<210> 16
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> TB10.4

<400> 16

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

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

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

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

Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr
 65 70 75 80

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

<210> 17
 <211> 18

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<223> TB10.4-P1

<400> 17

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

Asp Met

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<223> TB10.4-P2

<400> 18

Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln
1 5 10 15

Ser Leu

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<223> TB10.4-P3

<400> 19

Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Ala

<210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> TB10.4-P4

<400> 20

Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp
 1 5 10 15

Thr Gly

<210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> TB10.4-P5

<400> 21

Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala
 1 5 10 15

Gln Trp

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> TB10.4-P6

<400> 22

Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> TB10.4-P7

<400> 23

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

Glu Ala

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<223> TB10.4-P8

<400> 24

Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Thr

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <223> TB10.4-P9

<400> 25

Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Chlamydia trachomatis*

<220>
 <223> CT521

<400> 26

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

Phe Ala Gly Leu Ser Lys Gly Ala Thr Phe Val Asp Phe Gly Glu Phe
 20 25 30

Gly Met Gln Thr Leu Glu Arg Gly Trp Ile Thr Ser Arg Gln Ile Glu
 35 40 45

Ala Cys Arg Val Ala Ile Asn Arg Tyr Leu Lys Arg Lys Gly Lys Val
 50 55 60

Trp Ile Arg Val Phe Pro Asp Lys Ser Val Thr Lys Lys Pro Ala Glu
 65 70 75 80

Thr Arg Met Gly Lys Gly Ala Pro Asp His Trp Val Val Val
 85 90 95

Val Arg Pro Gly Arg Ile Leu Phe Glu Val Ala Asn Val Ser Lys Glu
 100 105 110

Asp Ala Gln Asp Ala Leu Arg Arg Ala Ala Lys Leu Gly Ile Arg
 115 120 125

Thr Arg Phe Val Lys Arg Val Glu Arg Val
 130 135

<210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<220>
 <223> CT521-P1

<400> 27

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

Phe Ala Gly Leu Ser Lys
 20

<210> 28
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<220>

<223> CT521-P2

<400> 28

Lys	Gly	Gln	Phe	Ala	Gly	Leu	Ser	Lys	Gly	Ala	Thr	Phe	Val	Asp	Phe
1				5				10					15		

Gly	Glu	Phe	Gly	Met	Gln	Thr
20						

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<220>

<223> CT521-P3

<400> 29

Val	Asp	Phe	Gly	Glu	Phe	Gly	Met	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Gly	Trp	Ile
1				5				10					15		

Thr	Ser	Arg	Gln	Ile	Glu	Ala
20						

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<220>

<223> CT521-P4

<400> 30

Gly	Trp	Ile	Thr	Ser	Arg	Gln	Ile	Glu	Ala	Cys	Arg	Val	Ala	Ile	Asn
1				5				10					15		

Arg Tyr Leu Lys Arg Lys Gly

<210> 31
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<220>
 <223> CT521-P5

<400> 31

Ala Ile Asn Arg Tyr Leu Lys Arg Lys Gly Lys Val Trp Ile Arg Val
 1 5 10 15

Phe Pro Asp Lys Ser Val Thr
 20

<210> 32
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<220>
 <223> CT521-P6

<400> 32

Ile Arg Val Phe Pro Asp Lys Ser Val Thr Lys Lys Pro Ala Glu Thr
 1 5 10 15

Arg Met Gly Lys Gly Lys Gly
 20

<210> 33
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<220>

<223> CT521-P7

<400> 33

Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Arg	Met	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Ala	Pro	Asp	His
1															
						5								10	
															15

Trp	Val	Val	Val	Val	Arg	Pro
						20

<210> 34

<211> 23

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<220>

<223> CT521-P8

<400> 34

Pro	Asp	His	Trp	Val	Val	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Arg	Ile	Leu	Phe	Glu
1															
															15

Val	Ala	Asn	Val	Ser	Lys	Glu
						20

<210> 35

<211> 23

<212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis

<220>

<223> CT521-P9

<400> 35

Ile	Leu	Phe	Glu	Val	Ala	Asn	Val	Ser	Lys	Glu	Asp	Ala	Gln	Asp	Ala
1															
															15

Leu Arg Arg Ala Ala Ala Lys

<210> 36
<211> 23
<212> PRT
<213> Chlamydia trachomatis

<220>
<223> CT521-P10

<400> 36

Asp Ala Leu Arg Arg Ala Ala Ala Lys Leu Gly Ile Arg Thr Arg Phe
1 5 10 15

Val Lys Arg Val Glu Arg Val
20