



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104107425 B

(45)授权公告日 2018.07.17

(21)申请号 201410141208.5

(22)申请日 2010.04.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104107425 A

(43)申请公布日 2014.10.22

(30)优先权数据

PA200900539 2009.04.24 DK

(62)分案原申请数据

201080017717.7 2010.04.23

(73)专利权人 国家血清研究所

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 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 39/04(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

(56)对比文件

WO 2004/006952 A2,2004.01.22,

Marcela Henao-Tamayo,et al.Post-

exposure vaccination against

Mycobacterium tuberculosis.

《Tuberculosis》.2009,第89卷(第2期),142-148页.

审查员 刘东吉

权利要求书1页 说明书17页

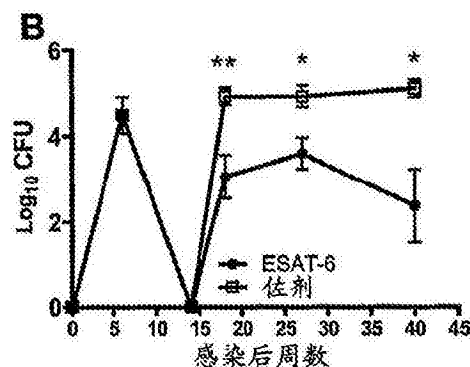
序列表51页 附图4页

(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,所述疫苗施用于无活跃结核病体征的潜伏感染个体,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. 如权利要求1-3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. 如权利要求1-3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. 权利要求1-10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潜伏结核病的疫苗中的用途。

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任一项中定义的抗原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任一项中定义的抗原。

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,因为有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)、海藻糖二山萆酸酯(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,这对于毒性是关键的。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氨基琥珀酰亚胺或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		HFVY

[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,即多肽占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 $\times$ 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 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$

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 μ 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 μ 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素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。适合的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(Skjot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±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Log10保护;(B) 或与仅ESAT6相比杂合抗原H1和H56的Log10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±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

在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在最后一次免疫后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Ag85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] P3ASAIQGNVTIHSLL (SEQ ID NO.21)

[0150] P4NVTIHSLLDEGKQS (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] P9QKWDATATELNNAL (SEQ ID NO.27)

[0156] P10TATELNNALQNLART (SEQ ID NO.28)

[0157] P11ALQNLARTISEAGQA (SEQ ID NO.29)

[0158] P12TISEAGQAMASTEGRN (SEQ ID NO.30)

[0159] P13QAMASTEGRNVTGMFA (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(IFN- γ +TNF- α +IL-2+CD4T细胞)方面。因此,与未接种

疫苗组相比,我们观察到IFN- γ /TNF- α CD4T细胞数目减少,共表达IFN- γ /TNF- α /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(Log10CFU对照中值-Log10CFU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 Microbiology1677-93

[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1998Infect.Immun.66:2;717-723

[0178] Hougardy等2007,PLoS ONE.Oct3;2(10):e926

- [0179] Kilgus J等,J Immunol.1991Jan1;146(1):307-15
- [0180] Leyten EM.等Microbes Infect.20068(8):2052-60.
- [0181] Lin MY和Ottenhoff TH,Biol.Chem.2008,389(5):497-511
- [0182] Lowrie,D.B.等1999,Nature400:269-71
- [0183] Lustig等1976,Cell Immunol24(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,Immunology72(3):317-22
- [0187] Mustafa,AS等2000,Clin.Infect.Dis.30(suppl.3)S201-S205
- [0188] Nagai等1991,Infect.Immun59:1;372-382
- [0189] Olsen AW等,Eur J Immunol.2000Jun;30(6):1724-32
- [0190] Pym AS等Nat Med2003,9,533-9;
- [0191] Pearson,WR.等1988.Proc Natl Acad Sci U S A,85,2444-2448.
- [0192] Raghavan,S.等2008,Nature454,717-721
- [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Immunology2006,118,195-201
- [0196] Rosenkrands,I.,等1998,Infect,Immun66:6;2728-2735
- [0197] Ruhwald M.等2008PLoS 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.Rew.Immunol.2008;8(4):247-58
- [0200] Sinigaglia F等Nature1988Dec22-29;336(6201):778-80
- [0201] Skjot,RLV.,等2000,Infect,Immun68:1;214-220
- [0202] Smith J.等2008,Infect Immun76,5478-87
- [0203] Stanley,SA等2003Proc Natl Acad.Sci USA100:12420-5
- [0204] Stryhn.A.,等1996Eur.J.Immunol.26:1911-1918
- [0205] Turner,OC等2000Infect Immun.68:6:3674-9.
- [0206] Talaat AM等2007,J of Bact189,4265-74
- [0207] Thompson J.,等Nucleic Acids Res199422:4673-4680
- [0208] Ulmer J.B等1993,Curr.Opin.Invest.Drugs2(9):983-989
- [0209] van Pinxteren LA等2000.Eur.J.Immunol.30:3689-98.

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

[0001]

Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
20 25 30

Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
35 40 45

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu
50 55 60

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

Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
85 90 95

<210> 2

<211> 100
<212> PRT
<213> 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

[0002]

Gln Lys Gln Glu Leu Asp Gln 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

	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		
[0003]	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			

	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
[0004]	Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe	
	275	280 285
	Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln	
	290	295 300
	Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln	
	305	310 315 320
	Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met	
		325 330 335
	Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser	
	340	345 350
	Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr	
	355	360 365

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

Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
385 390

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

<213> 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

[0005] Asp Leu Trp Gly Ala Asp Gly Ala Glu Gly Trp Thr Ala Asp Pro Ile
20 25 30

Ile Gly Val Gly Ser Ala Ala Thr Pro Asp Thr Gly Pro Asp Leu Asp
35 40 45

Asn Ala His Gly Gln Ala Glu Thr Asp Thr Glu Gln Glu Ile Ala Leu
50 55 60

Phe Thr Val Thr Asn Pro Pro Arg Thr Val Ser Val Ser Thr Leu Met
65 70 75 80

Asp Gly Arg Ile Asp His Val Glu Leu Ser Ala Arg Val Ala Trp Met
85 90 95

Ser Glu Ser Gln Leu Ala Ser Glu Ile Leu Val Ile Ala Asp Leu Ala
100 105 110

Arg Gln Lys Ala Gln Ser Ala Gln Tyr Ala Phe Ile Leu Asp Arg Met
115 120 125

Ser Gln Gln Val Asp Ala Asp Glu His Arg Val Ala Leu Leu Arg Lys
130 135 140

Thr Val Gly Glu Thr Trp Gly Leu Pro Ser Pro Glu Glu Ala Ala Ala
145 150 155 160

Ala Glu Ala Glu Val Phe Ala Thr Arg Tyr Ser Asp Asp Cys Pro Ala
165 170 175

Pro Asp Asp Glu Ser Asp Pro Trp
180

[0006]

<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

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

[0007]

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

Ala Gln Gln Lys Val Leu Asp Arg Ile Asp Glu Leu Arg Arg Ala Glu
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

[0008] 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

	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
[0009]	Thr Glu Ala Asn Asp Ser Pro Ala Gly Glu Ala Cys Ala Arg Ala Ile	
	195	200 205
	Ala Trp Tyr Leu Ala Met Ala Arg Arg Ser Gln Gly Asn Glu Ser Ala	
	210	215 220
	Ala Val Ala Leu Leu Glu Trp Leu Gln Thr Thr His Pro Glu Pro Lys	
	225	230 235 240
	Val Ala Ala Ala Leu Lys Asp Pro Ser Tyr Arg Leu Lys Thr Thr Thr	
	245	250 255
	Ala Glu Gln Ile Ala Ser Arg Ala Asp Pro Trp Asp Pro Gly Ser Val	
	260	265 270
	Val Thr Asp Asn Ser Gly Arg Glu Arg Leu Leu Ala Glu Ala Gln Ala	
	275	280 285

Glu Leu Asp Arg Gln Ile Gly Leu Thr Arg Val Lys Asn Gln Ile Glu
290 295 300

Arg Tyr Arg Ala Ala Thr Leu Met Ala Arg Val Arg Ala Ala Lys Gly
305 310 315 320

Met Lys Val Ala Gln Pro Ser Lys His Met Ile Phe Thr Gly Pro Pro
325 330 335

Gly Thr Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg Val Val Ala Asn Ile Leu Ala
340 345 350

Gly Leu Gly Val Ile Ala Glu Pro Lys Leu Val Glu Thr Ser Arg Lys
355 360 365

[0010] 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

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

[0011] 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

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

[0012] Thr Val Lys Ser Ser Glu Leu Ser Lys Leu Pro Met Gly Gln Thr Val
115 120 125

Gly Ile Pro Gly Ala Pro Tyr Ala Thr Pro Val Ser Ala Gly Ser Thr
130 135 140

Ser Ile Trp Thr Leu Cys Asp Thr Val Ala Arg Ala Asp Ser Thr Ser
145 150 155 160

Pro Val Val Gln Thr Ala Val Ile Ala Met Pro Leu Glu Ile Asp Ala
165 170 175

Ser Ile Asp Pro Leu Gln Ser His Glu Ala Val Leu Val Ser Tyr Gln
180 185 190

Gly Glu Thr Trp Ile Val Thr Thr Lys Gly Arg His Ala Ile Asp Leu
195 200 205

	Thr	Asp	Arg	Ala	Leu	Thr	Ser	Ser	Met	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Arg
	210						215					220				
	Pro	Thr	Pro	Ile	Ser	Glu	Gly	Met	Phe	Asn	Ala	Leu	Pro	Asp	Met	Gly
	225					230				235					240	
	Pro	Trp	Gln	Leu	Pro	Pro	Ile	Pro	Ala	Ala	Gly	Ala	Pro	Asn	Ser	Leu
					245					250					255	
	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Leu	Val	Ile	Gly	Ser	Val	Phe	Gln	Ile	His	Thr
				260					265					270		
	Asp	Lys	Gly	Pro	Gln	Tyr	Tyr	Val	Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Ile	Ala	Gln
		275						280					285			
[0013]	Val	Asn	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Thr	Gln	Ala	His	Gly
	290						295					300				
	Leu	Val	Ala	Pro	Pro	Ala	Met	Val	Pro	Ser	Leu	Val	Val	Arg	Ile	Ala
	305					310					315				320	
	Glu	Arg	Val	Tyr	Pro	Ser	Pro	Leu	Pro	Asp	Glu	Pro	Leu	Lys	Ile	Val
					325					330				335		
	Ser	Arg	Pro	Gln	Asp	Pro	Ala	Leu	Cys	Trp	Ser	Trp	Gln	Arg	Ser	Ala
				340					345					350		
	Gly	Asp	Gln	Ser	Pro	Gln	Ser	Thr	Val	Leu	Ser	Gly	Arg	His	Leu	Pro
		355					360						365			
	Ile	Ser	Pro	Ser	Ala	Met	Asn	Met	Gly	Ile	Lys	Gln	Ile	His	Gly	Thr
	370						375					380				

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

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

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

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

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

[0014]

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

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

[0015]

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

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
[0016]			
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			

	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	
[0017]			
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			

	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	
[0018]			
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		

<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

[0019]

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

	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		
[0020]	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			

	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	
[0021]	Val	Pro	Asp	Thr	His	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Ile	Asn	Arg	Asn	Ser
				420					425					430		
	Ala	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Ala	Leu	Ala	Val	Asn	Leu	Lys	Lys
			435					440					445			
	Arg	Leu	Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Ala	Gln	Leu	Arg	Ser	Arg	Ser
		450					455					460				
	Trp	Trp	Ser	Gly	Phe	Asp	Val	Val	Leu	Leu	Val	Asp	Asp	Trp	His	Met
	465					470					475				480	
	Ile	Val	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Met	Pro	Pro	Met	Ala	Pro	Leu	Ala	Pro
					485					490					495	
	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Asp	Ile	Gly	Leu	His	Ile	Ile	Val	Thr	Cys
				500						505					510	

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

Ala Phe Gly Ser Gly Ala Pro Thr Met Phe Leu Ser Gly Glu Lys Gln
530 535 540

Glu Phe Pro Ser Ser Glu Phe Lys Val Lys Arg Arg Pro Pro Gly Gln
545 550 555 560

Ala Phe Leu Val Ser Pro Asp Gly Lys Glu Val Ile Gln Ala Pro Tyr
565 570 575

Ile Glu Pro Pro Glu Glu Val Phe Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gly
580 585 590

[0022] <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

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

Asp Val Ala Arg Thr Tyr Ser Gln Ile Asp Asp Gly Ala Ala Gly Val
85 90 95

Phe Ala Glu

<210> 12

<211> 368

<212> PRT

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

<400> 12

[0023] Met Leu Trp His Ala Met Pro Pro Glu Leu Asn Thr Ala Arg Leu Met
1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Pro Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ala Gly Trp Gln
20 25 30

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

Leu Asn Ser Leu Gly Glu Ala Trp Thr Gly Gly Gly Ser Asp Lys Ala
50 55 60

Leu Ala Ala Ala Thr Pro Met Val Val Trp Leu Gln Thr Ala Ser Thr
65 70 75 80

Gln Ala Lys Thr Arg Ala Met Gln Ala Thr Ala Gln Ala Ala Ala Tyr
85 90 95

	Thr	Gln	Ala	Met	Ala	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Glu	Ile	Ala	Ala	Asn	
				100					105					110			
	His	Ile	Thr	Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Ala	Thr	Asn	Phe	Phe	Gly	Ile	Asn	
				115					120					125			
	Thr	Ile	Pro	Ile	Ala	Leu	Thr	Glu	Met	Asp	Tyr	Phe	Ile	Arg	Met	Trp	
				130					135					140			
	Asn	Gln	Ala	Ala	Leu	Ala	Met	Glu	Val	Tyr	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Val	
	145					150					155					160	
	Asn	Thr	Leu	Phe	Glu	Lys	Leu	Glu	Pro	Met	Ala	Ser	Ile	Leu	Asp	Pro	
					165					170						175	
[0024]	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	

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

[0025]

<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

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

[0026]

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

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

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

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

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

Arg Ala Arg Arg Gly His Arg Tyr Arg Thr Asp Thr Glu Arg Asn Val

225	230	235	240
Gly Lys Val Ala Thr Gly Pro Ser Ile Gln Ala Arg Leu Arg Ala Glu			
245	250	255	
Glu Ala Ser Gly Ala Gln Leu Ala Pro Gly Thr Glu Pro Ser Pro Ala			
260	265	270	
Pro Leu Gly Gln Pro Arg Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Thr Arg Pro Ala			
275	280	285	
Pro Thr Glu Pro Pro Pro Ser Pro Ser Pro Gln Arg Asn Ser Gly Arg			
290	295	300	
Arg Ala Glu Arg Arg Val His Pro Asp Leu Ala Ala Gln His Ala Ala			
305	310	315	320
[0027]			
Ala Gln Pro Asp Ser Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly Gly Arg Arg Arg			
325	330	335	
Lys Arg Ala Ala Pro Asp Leu Asp Ala Thr Gln Lys Ser Leu Arg Pro			
340	345	350	
Ala Ala Lys Gly Pro Lys Val Lys Lys Val Lys Pro Gln Lys Pro Lys			
355	360	365	
Ala Thr Lys Pro Pro Lys Val Val Ser Gln Arg Gly Trp Arg His Trp			
370	375	380	
Val His Ala Leu Thr Arg Ile Asn Leu Gly Leu Ser Pro Asp Glu Lys			
385	390	395	400
Tyr Glu Leu Asp Leu His Ala Arg Val Arg Arg Asn Pro Arg Gly Ser			

	405	410	415
Tyr Gln Ile Ala Val Val Gly Leu Lys Gly Gly Ala Gly Lys Thr Thr			
420	425	430	
Leu Thr Ala Ala Leu Gly Ser Thr Leu Ala Gln Val Arg Ala Asp Arg			
435	440	445	
Ile Leu Ala Leu Asp Ala Asp Pro Gly Ala Gly Asn Leu Ala Asp Arg			
450	455	460	
Val Gly Arg Gln Ser Gly Ala Thr Ile Ala Asp Val Leu Ala Glu Lys			
465	470	475	480
Glu Leu Ser His Tyr Asn Asp Ile Arg Ala His Thr Ser Val Asn Ala			
485	490	495	
[0028]			
Val Asn Leu Glu Val Leu Pro Ala Pro Glu Tyr Ser Ser Ala Gln Arg			
500	505	510	
Ala Leu Ser Asp Ala Asp Trp His Phe Ile Ala Asp Pro Ala Ser Arg			
515	520	525	
Phe Tyr Asn Leu Val Leu Ala Asp Cys Gly Ala Gly Phe Phe Asp Pro			
530	535	540	
Leu Thr Arg Gly Val Leu Ser Thr Val Ser Gly Val Val Val Val Ala			
545	550	555	560
Ser Val Ser Ile Asp Gly Ala Gln Gln Ala Ser Val Ala Leu Asp Trp			
565	570	575	
Leu Arg Asn Asn Gly Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Arg Ala Cys Val Val			

580	585	590
Ile Asn His Ile Met Pro Gly Glu Pro Asn Val Ala Val Lys Asp Leu		
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	

[0029]

<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	

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

[0030] 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

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

[0032] 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

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

[0033] Gln Leu Gly Glu Thr Ala Ala Glu Leu Ala Pro Arg Val Val Ala Thr
130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Ser Thr Thr Thr Thr Leu
275 280

<210> 16

<211> 729

<212> PRT

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

[0034]

<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

	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
[0035]	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

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

[0036] 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

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

[0037] 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

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

[0038]

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

	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	

[0039]

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	

	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			
[0040]	Asn	Phe	Met	Asp	Leu	Lys	Glu	Ala	Ala	Arg	Lys	Leu	Glu	Thr	Gly	Asp	
	130					135						140					
	Gln	Gly	Ala	Ser	Leu	Ala	His	Phe	Ala	Asp	Gly	Trp	Asn	Thr	Phe	Asn	
	145					150					155				160		
	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Asp	Val	Lys	Arg	Phe	Arg	Gly	Phe	Asp	Asn	Trp	
					165					170					175		
	Glu	Gly	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Cys	Glu	Ala	Ser	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	
				180					185					190			
	Gln	Trp	Ile	Leu	His	Met	Ala	Lys	Leu	Ser	Ala	Ala	Met	Ala	Lys	Gln	
				195				200						205			
	Ala	Gln	Tyr	Val	Ala	Gln	Leu	His	Val	Trp	Ala	Arg	Arg	Glu	His	Pro	
	210						215						220				

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

Ser Ala Arg Asp Gln Ile Leu Pro Val Tyr Ala Glu Tyr Gln Gln Arg
245 250 255

Ser Glu Lys Val Leu Thr Glu Tyr Asn Asn Lys Ala Ala Leu Glu Pro
260 265 270

Val Asn Pro Pro Lys Pro Pro Pro Ala Ile Lys Ile Asp Pro Pro Pro
275 280 285

Pro Pro Gln Glu Gln Gly Leu Ile Pro Gly Phe Leu Met Pro Pro Ser
290 295 300

[0041] Asp Gly Ser Gly Val Thr Pro Gly Thr Gly Met Pro Ala Ala Pro Met
305 310 315 320

Val Pro Pro Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Leu Pro Ala Asp Thr Ala
325 330 335

Ala Gln Leu Thr Ser Ala Gly Arg Glu Ala Ala Ala Leu Ser Gly Asp
340 345 350

Val Ala Val Lys Ala Ala Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val
355 360 365

Pro Ser Ala Pro Leu Gly Ser Ala Ile Gly Gly Ala Glu Ser Val Arg
370 375 380

Pro Ala Gly Ala Gly Asp Ile Ala Gly Leu Gly Gln Gly Arg Ala Gly
385 390 395 400

Gly Gly Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Met Gly Met Pro Met Gly Ala
 405 410 415

Ala His Gln Gly Gln Gly Gly Ala Lys Ser Lys Gly Ser Gln Gln Glu
 420 425 430

Asp Glu Ala Leu Tyr Thr Glu Asp Arg Ala Trp Thr Glu Ala Val Ile
 435 440 445

Gly Asn Arg Arg Arg Gln Asp Ser Lys Glu Ser Lys
 450 455 460

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

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

[0042]

<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)

<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)

[0043]

<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)

<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)

[0044]

<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)

<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

[0045] <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

	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	
[0046]	Phe	Thr	Pro	Thr	Val	Ile	Val	Asp	Gly	Gln	Ala	His	Thr	Asp	Asp	Met	
			115						120						125		
	Leu	Asp	Thr	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Val	His	Cys	Pro	Asp	
		130						135					140				
	Leu	Glu	Ala	Asp	Ile	Val	Ser	Ala	Gly	Tyr	Arg	Val	Gly	Asn	Thr	Ala	
	145					150					155					160	
	Ala	Pro	Asp	Val	Val	Ser	Leu	Tyr	Gln	Gln	Val	Ile	Gly	Thr	Asp	Pro	
					165					170						175	
	Ala	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Thr	Trp	Ile	Val	Leu	Arg	Ala	Asp	Pro	Glu	
				180						185						190	
	Arg	Thr	Arg	Lys	Ser	Ala	Gln	Arg	Arg	Asp	Glu	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	
				195					200							205	

	Ala Arg Tyr Leu Val Ala Ser Ala Thr Arg Ile Ala Asp Arg Leu Ala	
	210	215 220
	Ser His Gly Val Asp Ala Val Cys Gly Arg Ser Phe Asp Asp Tyr Asp	
	225	230 235 240
	His Ala Thr Asp Ile Gly Phe Val Arg Glu Lys Trp Ser Met Ile Lys	
	245	250 255
	Gly Arg Asp Ala Tyr Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Pro Asp	
	260	265 270
	Val Trp Trp Ser Ala Arg Ala Asp His Thr Ile Thr Arg Val Arg Val	
	275	280 285
[0047]	Ala Pro Gly Met Ala Pro Gln Ser Thr Val Leu Leu Thr Thr Ala Asp	
	290	295 300
	Lys Pro Lys Thr Pro Arg Gly Phe Ala Arg Leu Phe Gly Gly Gln Arg	
	305	310 315 320
	Pro Ala Leu Gln Gly Gln His Leu Val Ala Asn Arg His Cys Gln Leu	
	325	330 335
	Pro Ile Gly Ser Ala Gly Val Leu Val Gly Glu Thr Val Asn Arg Cys	
	340	345 350
	Pro Val Tyr Met Pro Phe Asp Asp Val Asp Ile Ala Leu Asn Leu Gly	
	355	360 365
	Asp Ala Gln Thr Phe Thr Gln Phe Val Val Arg Ala Ala Ala Ala Gly	
	370	375 380

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

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

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

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

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

[0048]

<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

65	70	75	80
Gly Ala Gly Val Thr Val Ala Val Ile Asp Thr Gly Val Asp Ala Ser			
85	90	95	
Pro Arg Val Pro Ala Glu Pro Gly Gly Asp Phe Val Asp Gln Ala Gly			
100	105	110	
Asn Gly Leu Ser Asp Cys Asp Ala His Gly Thr Leu Thr Ala Ser Ile			
115	120	125	
Ile Ala Gly Arg Pro Ala Pro Thr Asp Gly Phe Val Gly Val Ala Pro			
130	135	140	
Asp Ala Arg Leu Leu Ser Leu Arg Gln Thr Ser Glu Ala Phe Glu Pro			
145	150	155	160
[0049]			
Val Gly Ser Gln Ala Asn Pro Asn Asp Pro Asn Ala Thr Pro Ala Ala			
165	170	175	
Gly Ser Ile Arg Ser Leu Ala Arg Ala Val Val His Ala Ala Asn Leu			
180	185	190	
Gly Val Gly Val Ile Asn Ile Ser Glu Ala Ala Cys Tyr Lys Val Ser			
195	200	205	
Arg Pro Ile Asp Glu Thr Ser Leu Gly Ala Ser Ile Asp Tyr Ala Val			
210	215	220	
Asn Val Lys Gly Val Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Thr Gly Gly			
225	230	235	240
Asp Cys Val Gln Asn Pro Ala Pro Asp Pro Ser Thr Pro Gly Asp Pro			

	245	250	255
Arg Gly Trp Asn Asn Val Gln Thr Val Val Thr Pro Ala Trp Tyr Ala			
260	265	270	
Pro Leu Val Leu Ser Val Gly Gly Ile Gly Gln Thr Gly Met Pro Ser			
275	280	285	
Ser Phe Ser Met His Gly Pro Trp Val Asp Val Ala Ala Pro Ala Glu			
290	295	300	
Asn Ile Val Ala Leu Gly Asp Thr Gly Glu Pro Val Asn Ala Leu Gln			
305	310	315	320
Gly Arg Glu Gly Pro Val Pro Ile Ala Gly Thr Ser Phe Ala Ala Ala			
325	330	335	
[0050]			
Tyr Val Ser Gly Leu Ala Ala Leu Leu Arg Gln Arg Phe Pro Asp Leu			
340	345	350	
Thr Pro Ala Gln Ile Ile His Arg Ile Thr Ala Thr Ala Arg His Pro			
355	360	365	
Gly Gly Gly Val Asp Asp Leu Val Gly Ala Gly Val Ile Asp Ala Val			
370	375	380	
Ala Ala Leu Thr Trp Asp Ile Pro Pro Gly Pro Ala Ser Ala Pro Tyr			
385	390	395	400
Asn Val Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Val Glu Pro Gly Pro Asp Arg			
405	410	415	
Arg Pro Ile Thr Ala Val Ala Leu Val Ala Val Gly Leu Thr Leu Ala			

	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		
[0051]	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		

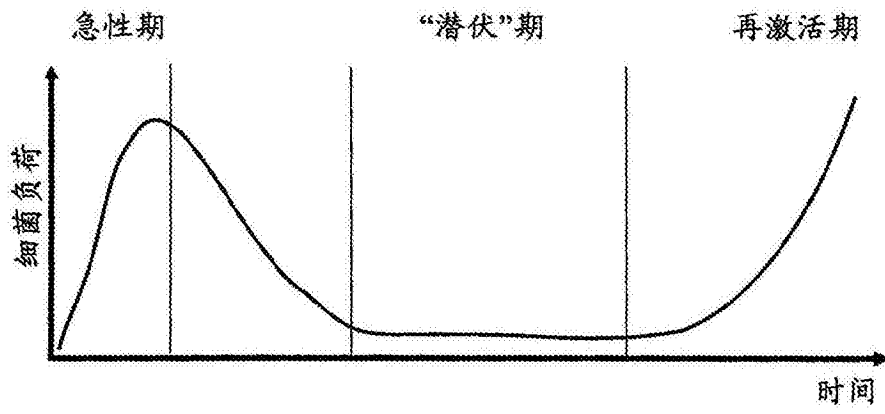


图1

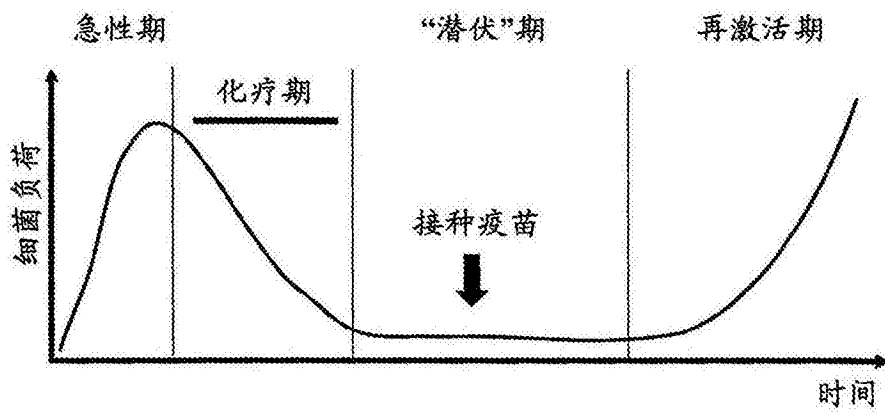


图2

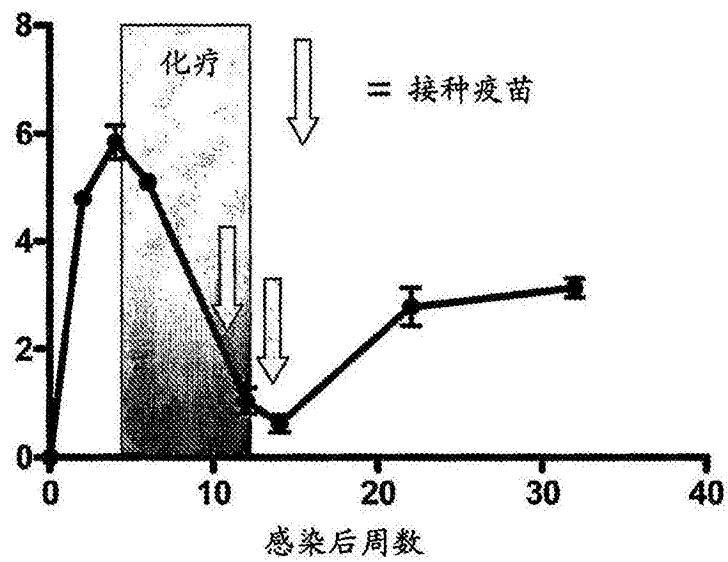


图3

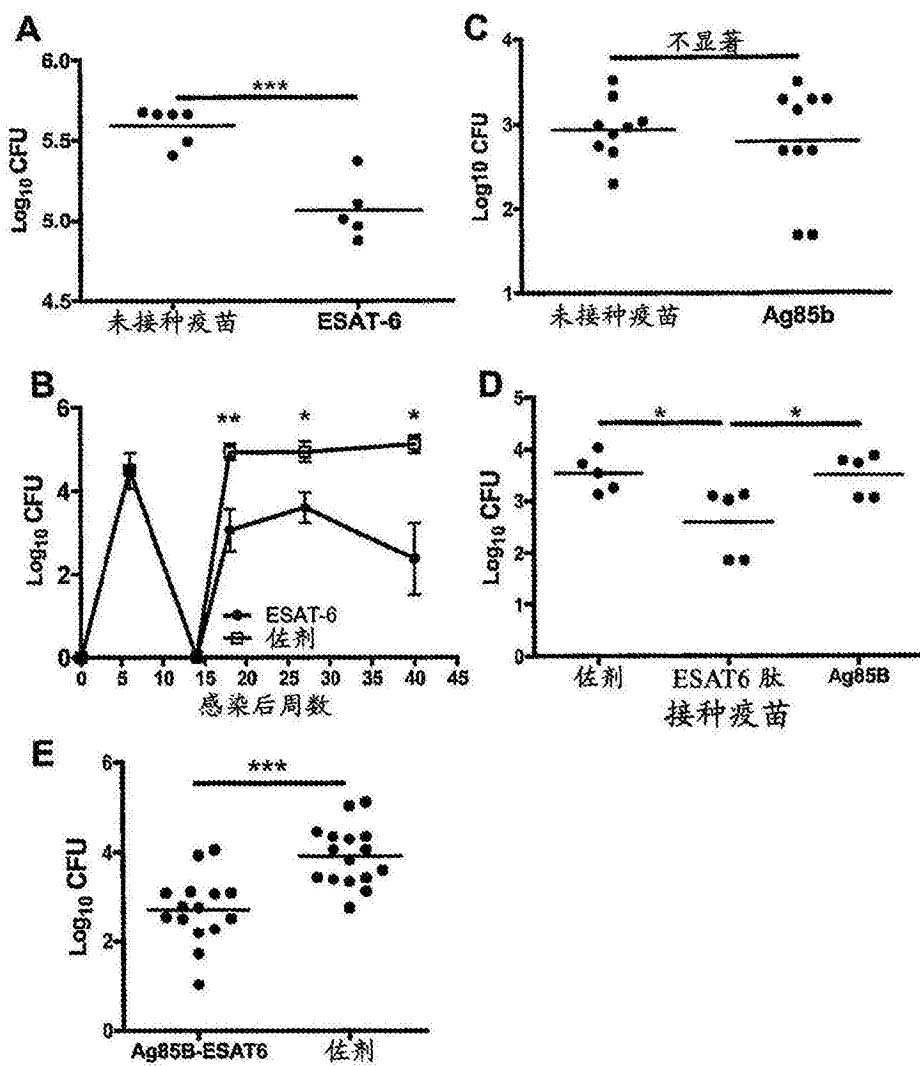


图4

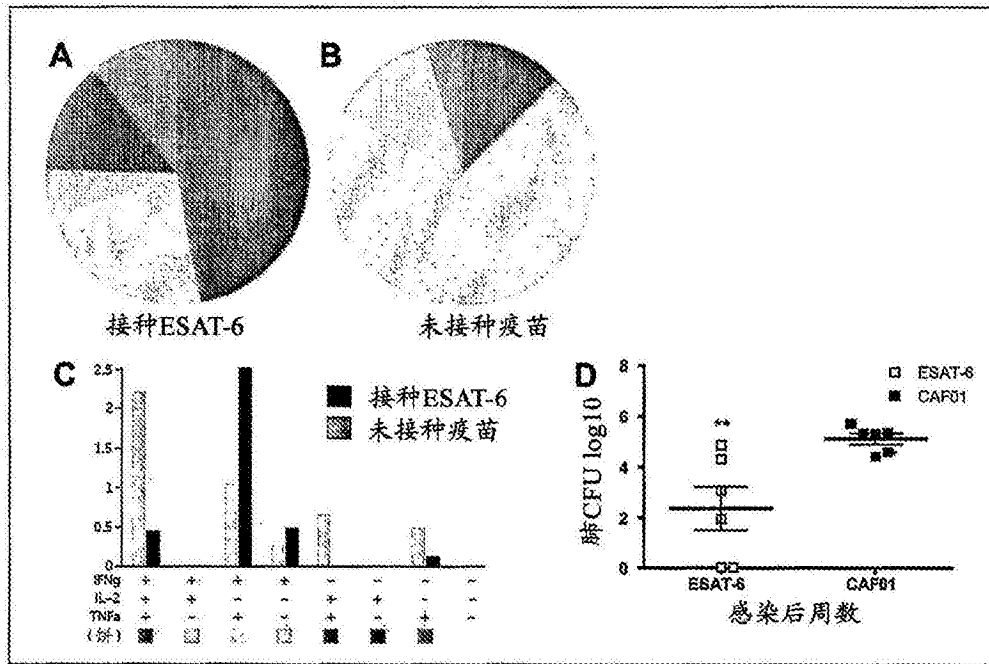


图5

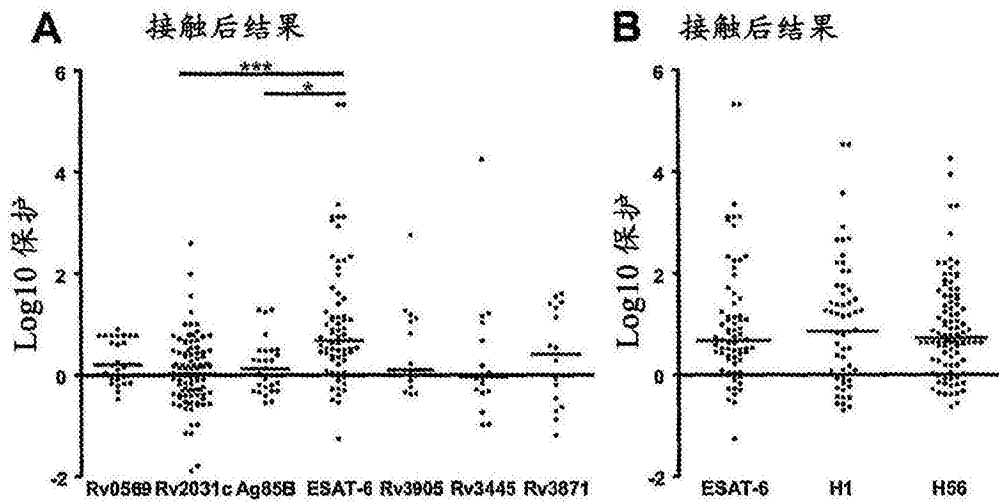


图6

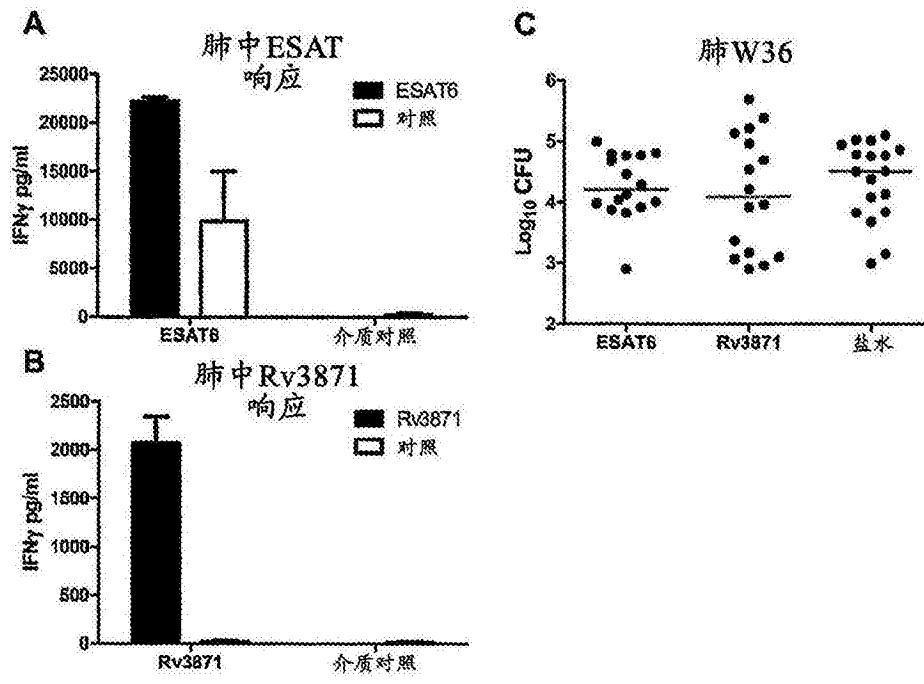


图7