



(21) 申請案號：102124693 (22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 10 日

(51) Int. Cl. : C07K14/35 (2006.01) A61K39/04 (2006.01)
C12N15/70 (2006.01) C12R1/32 (2006.01)

(30) 優先權：2012/07/10 歐洲專利局 12305825.7
2012/12/07 歐洲專利局 12306539.3
2013/06/03 歐洲專利局 13305737.2

(71) 申請人：法商傳斯堅公司 (法國) TRANSGENE S.A. (FR)
法國

(72) 發明人：土賓 艾曼紐 TUPIN, EMMANUEL (FR)；米可 羅曼 MICOL, ROMAIN (FR)；
寇佩特 查爾斯 A COUPET, CHARLES ANTOINE (FR)；英賈柏斯 吉納維芙
INCHAUPSE, GENEVIEVE (FR)；果安維克 瑪琍 GOUANVIC, MARIE (FR)；錫
維斯翠 納薩里 SILVESTRE, NATHALIE (FR)；瑪章德 珍 派普堤斯特
MARCHAND, JEAN-BAPTISTE (FR)；班尼 塞斯里 BENY, CECILE (FR)

(74) 代理人：憚軼群；陳文郎

(56) 參考文獻：

CN 101939419A

WO 2012/057904A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：15 共 267 頁

(54) 名稱

分枝桿菌抗原疫苗

MYCOBACTERIAL ANTIGEN VACCINE

(57) 摘要

本發明一般相關於免疫性組合物，其包含分枝桿菌菌株之至少五種抗原及其融合體，以及編碼此類經組合抗原與融合體之核酸分子。本發明亦有關核酸分子、載體、宿主細胞，以及包含或編碼該分枝桿菌抗原組合物與融合多胜肽之組成物，以及其重組性製造方法。本發明亦有關使用該分枝桿菌抗原組合物、融合多胜肽、載體、宿主細胞、組成物之方法，特別用以誘發或刺激免疫反應，以對抗分枝桿菌感染或分枝桿菌感染導致或相關之任何疾病。本發明亦有關針對此類分枝桿菌抗原與融合多胜肽之抗體，用於診斷分枝桿菌感染，及偵測方法，以及一試劑套組，其包含該分枝桿菌抗原組合物、融合多胜肽、載體、宿主細胞、組成物或抗體。

The present invention relates generally to immunogenic combinations comprising at least five antigens of a Mycobacterium species as well as fusion thereof and nucleic acid molecules encoding such combined antigens and fusion. The present invention also relates to nucleic acid molecules, vectors, host cells and compositions comprising or encoding said combinations of mycobacterial antigens and fusion polypeptides as well as to methods for recombinantly producing them. The present invention also relates to methods of using said combinations of mycobacterial antigens, fusion polypeptides, vectors, host cells, compositions particularly for inducing or stimulating an immune response against a Mycobacterium infection or any disease caused by or associated with a Mycobacterium infection. The present invention also concerns

antibodies directed to such mycobacterial antigens and fusion polypeptides that can be used in the diagnosis of a Mycobacterium infection and method of detection as well as kits of reagent comprising said combinations of mycobacterial antigens, fusion polypeptides, vectors, host cells, compositions or antibodies.

指定代表圖：

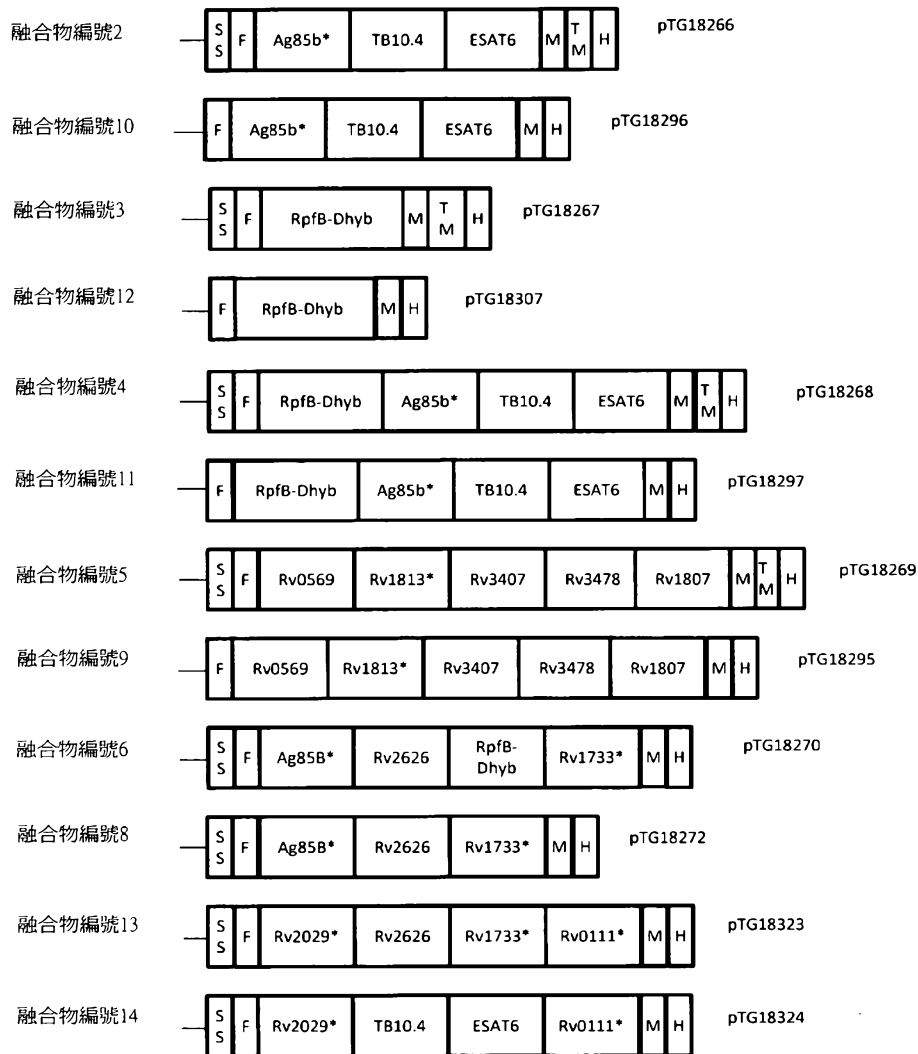


圖1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

分枝桿菌抗原疫苗

MYCOBACTERIAL ANTIGEN VACCINE

【技術領域】

發明領域

[0001]本發明一般而言係有關新穎之免疫性組合物，其包含分枝桿菌菌株之至少五種抗原及其融合體，以及編碼此類經組合抗原與融合體之核酸分子，其中該抗原源自分枝桿菌菌株，特別是結核分枝桿菌群，如結核分枝桿菌(*M. tuberculosis*; *Mtb*)。本發明亦有關載體、宿主細胞，以及包含或編碼該分枝桿菌抗原組合物與融合多胜肽之組成物，以及其表達與製造方法。本發明亦有關使用該分枝桿菌抗原組合物、融合多胜肽、載體、宿主細胞、組成物之方法，特別用以誘發或刺激免疫反應，目的為提供保護反應並對抗分枝桿菌感染或分枝桿菌感染導致或相關之任何疾病。本發明亦有關針對本發明使用之分枝桿菌抗原與融合多胜肽之抗體，其可用於診斷分枝桿菌感染，以及一診斷套組，其包含該分枝桿菌抗原組合物、融合多胜肽、載體、宿主細胞與組成物。

【先前技術】

發明背景

[0002]據估計，全世界有三分之一人口感染結核分枝桿

菌(Mtb)(亦即，超過二十億人)，且每年有九百至一千萬個新案例與兩百萬人死亡，因此，結核病(TB)為全球性與世界性的健康問題。結核分枝桿菌(Mtb)，TB之病原體，具有4 411 529鹼基對(bp)之環形基因組，於1998年完全被定序(Cole et al., 1998, Nature 393: 537-44)。Mtb編碼約4000個基因；然而，Mtb生命週期之功能與角色，以及這些基因大多數之病理情形尚未闡明。長期之推測認為，於不同的與順序性感染期時，即活躍期與隨後之潛伏狀態，以及於條件匯集時，即復甦期導致之新活躍期，個別之基因被表現。近來的證據動搖了這個古典教條，該領域目前認知到，有某些“漏洞”存在，亦即，基因之表現以間期獨立性方式發生，雖然閾值各異。此外，Mtb之潛伏性亦有爭議：細菌是否大多為休眠狀態、非複製，或其是否持續複製，且有時甚至脫離經感染細胞進入鄰近呼吸道，因而誘發經常性免疫反應？(Ehlers et al., 2009, Infection 37: 87-95)。

[0003]一般而言，人對人傳播之發生，係藉由肺結核(活動性病)患者產生之霧化液滴。這些感染者中(估計為30%之經暴露個體)，僅5-10%於暴露後2年內發展為活動性TB病症(稱為原發性TB)。然而，多數經感染個體發展為潛伏感染(LTBI)，其可維持數十年而無臨床疾病徵兆或症狀。LTBI代表一恆定狀態，其中經感染者可控制該感染但無法完全消滅細菌。再激活作用(過往感染後之活動性TB)可能發生於晚期，尤其是老年人或免疫功能低下之個體，如HIV感染與TNF抑制劑治療者。一生中TB再激活風險估計為

10%，而免疫力受損者之風險則增為每年10%。

[0004] 一些證據顯示，細胞免疫系統之刺激作用，對於TB病症之控制扮演一角色(Rook et al. 2007, *J Infect Dis* 196:191-8)。CD4 T淋巴細胞對於控制病原與預防疾病進展(約90%之Mtb感染者)之核心角色已完善建立。例如，HIV/AIDS病患之CD4+ T細胞數目低，較易發展為TB病症，而抗病毒治療可增加CD4+ T細胞數目，並降低發展為TB病症。然而，CD4 T細胞並非獨立作業，且經由CD8 T細胞與其他T細胞亞群協助。在此方面，腫瘤壞死因子 α (TNF α)阻斷劑與基因多型性如干擾素 γ (IFN γ)與其他受體缺失之經驗，證實了特異性細胞介素與細胞介素網絡對於疾病控制之重要性，其涉及人體TB控制之細胞免疫性質(Cooper et al., 2009, *Annu Rev Immunol* 27: 393-422)。

[0005] 考慮到疫苗(卡介苗(BCG))與抗生素之存在並廣泛被使用，每年由Mtb造成的百萬死亡人數則相當值得深思。然而，BCG可有效預防新生兒與幼兒之病症，卻無法保護成人，且無法防止經潛伏感染者之Mtb再激活。另一方面，以多種抗生素結核物治療活動性TB似乎有效，但是需要病患相當有順從性，以每日投予不同藥物長達數月。此外，雖然抗生素於適當服用時，可非常有效對抗野生型Mtb菌株，但是抗藥性Mtb菌株(例如，“多重抗藥性”(MDR)、“廣泛抗藥性”(XDR)與“完全抗藥性”(TDR)菌株)之出現速度驚人，大多因為不當遵守此冗長與昂貴之藥物療法。因此，在此令人擔憂之背景下，開發有效TB疫苗列

為優先，且在過去十年中，有兩種主要研究正進行著：更換BCG與BCG 追加劑。有十幾種候選疫苗目前進入臨床試驗(欲參閱，請見Ottenhoff and Kaufmann, 2012, PLoS 8(5): e1002607)。此外，本技術領域近來亦考慮使用新的疫苗配方以協助治療Mtb感染，即所謂“治療性疫苗”，被用作新的獨立治療或用於輔助標準療法，特別是用於治療抗藥性菌株。

[0006]BCG更換疫苗之目的為增進BCG功效與安全性，且主要以活減毒細菌為主，例如經基因修飾之BCG，或Mtb菌株經設計，以表達BCG所沒有之新抗原，或過度表達BCG可表達但數量可能不足之Mtb抗原，或仍為刪除致病基因與其調節基因。有多種重組型BCG構築體進入臨床試驗，以檢測其取代BCG之能力。最先進之VPM1002目前位於第二期試驗，其為尿素酶缺陷型rBCG，可表達經硫醇基活化且源自李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)之膽固醇結合型李斯特菌溶血素(hly)，且對於免疫功能低下動物之安全性優於BCG，並提供小鼠優越之保護效果，以對抗Mtb (Grode et al., 2005, J Clin Invest 115: 2472-9)。兩個額外的rBCG近來亦進入臨床評估，分別為rBCG30，其表達Ag85B，以及AERAS422，其表達Ag85A、Ag85B與Rv3407，連同產氣溶血素(perfringolysin)。

[0007]BCG 追加劑之目的為誘發細胞性，及/或體液性免疫反應，一般而言有賴於重組型疫苗，經設計以提供TB抗原，不論是以與有效之Th1-活化型佐劑混合之蛋白質組

成物，或是透過病毒性表達載體(欲參閱，請見Thaissa et al., 2010, *Yale J. of Biol. and Medicine* 83: 209-15；Andersen, 2007, *Nature* 5: 484與Kaufman, 2012, *Trend in Immunology* 241: 1-7)。在4000個潛在之TB抗原中，其中有些於前臨床模式中證實具免疫性。

[0008]一最先進之蛋白質候選物為雜交物 1 (H1)蛋白質，其由Ag85B融合至ESAT-6所組成(Langermans et al., 2005, *Vaccine* 23: 2740-50；Dietrich et al., 2007, *J. Immunol.* 178: 3721-30)。當與IC31佐劑投藥時，人體內可觀察到強的CD4+ Th1 IFN γ 媒介反應(Van Dissel et al., 2010, *Vaccine* 28: 3571-81)。最近，此疫苗發現可提高先前經由BCG或潛伏性感染所誘發之免疫反應(Van Dissel, 2011, *Vaccine* 29: 2100-9)。另一融合蛋白質Hyvac 4 (H4)，其由Ag85B融合至TB10.4所組成(Aagaard et al., *PLoS One* 4: 1-8)，目前為並行發展計劃。GSK之M72融合蛋白質，其以Rv1196插入絲胺酸蛋白酶Rv0125中央位置製成，當與不同合成佐劑投藥時，安全性與免疫性方面有較佳之臨床效果(Von Eschen et al., 2009, *Hum Vaccine* 5: 475-82)。亦可列舉所謂的ID融合蛋白質(WO2008/124647)，例如ID83，其由Rv1813、Rv3620與Rv2608製成(Baldwin et al., 2009, *Vaccine* 27: 3063-71)，以及ID93，包括以Rv3619融合至三種ID83抗原(Bertholet et al., 2010, *Sci Transl Med* 2(53): 53ra74)。

[0009]以臨床試驗檢測之病毒載體型TB疫苗，包括經修飾之疫苗病毒安卡拉(MVA)，其表達Ag85A抗原

(MVA85A/Aeras-485 ; WO2006/72787) , 以及複製缺失型腺病毒(Ad) 35 , 其表達Ag85A、Ag85B與TB10.4抗原(Crucell Ad35/Aeras-402 ; WO2006/053871) 。 MVA85A已證實於原始(naïve)及經BCG致敏之個體皆有免疫性 , 其可誘發高度CD4+ T細胞反應(Mc Shane et al., 2004, Nat Med 10: 1240-4 ; Scriba et al., 2010, Eur J Immunol 40: 279-90) , 而Aeras-402似乎有利於CD8 T細胞與IFN γ 反應(Radosevic et al., 2007, Infect Immunol 75: 4105-15 ; Magalhaes et al., 2008, PLoS One 3, e3790 ; Abel et al., 2010 Am J Respir Crit Care Med 181: 1407-17) 。

[0010]最近的研究聚焦於多期性組成物(請見例如 , WO2008/124647與WO2011/144951) 。 一些這類候選疫苗已於前臨床與臨床研究中取得結果 , 證實可對於Mtb誘發強健之細胞媒介型免疫反應(Thaissa et al., 2010, Yale J. of Biol. and Medicine 83: 209-15 ; Delogu et al., 2009, J Infect Developing Countries 3: 5-15) 。 舉例而言 , H56融合蛋白質組合潛伏性Mtb Rv2660 , 其連同活的Ag85B與ESAT-6抗原 , 顯示其潛在令人信服之BCG追加劑活性 , 雖然其尚未進入臨床試驗(Aagaard et al, 2011, Nature Med 17: 189-94 ; Lin et al., 2012, J Clin Invest 122: 303-14) 。 然而 , 這些研究點出了影響T細胞反應與保護功效之各種因子 , 如抗原劑量(例如 , Aagaard et al., PLoS One 4: 1-8)與投藥途徑(Goonetilleke et al., 2003, J. Immunol. 171: 1602-9) 。

[0011]結核病難以控制 , 原因各不相同 : 資源有限地區

患者之保健標準規定順從性差、由於HIV共同感染而TB疫情加重、BCG疫苗接種表現差而無法保護成人。鑑於TB之全球威脅性增加，以及Mtb感染之先天複雜性與抗分枝桿菌之免疫反應，仍有需要經改進之疫苗策略，以診斷、預防與治療結核病，尤其是流行地區。

[0012]本發明滿足這類問題與其他需求，係藉由提供Mtb抗原之免疫性組合物，並針對自然感染過程之所有間期量身訂做。

[0013]此技術問題係由本發明申請專利範圍中定義之實施例所提供之方法解決。

[0014]本發明其他與進一步之觀點、性質與優點，將因本發明較佳實施例呈現之下列說明而更臻清楚。這些實施例提出之目的為揭示本發明。

【發明內容】

發明概要

[0015]本發明一般有關於免疫性組合物，其包含至少5種不同抗原或編碼該至少5種抗原之核酸分子，其中該抗原皆獨立地取自分枝桿菌菌株，特別是取自結核病群之分枝桿菌菌株，如結核分枝桿菌(Mtb)。建立數據探勘評分系統，並依據免疫性與保護特性進行一組Mtb抗原之分類。在序列比對、生化與生物資訊預測研究之後，選出14種Mtb抗原，並組合成抗原/載體組合物與融合多胜肽。

[0016]在本發明之一觀點中，本發明之抗原組合物為多期性，其中該至少5種分枝桿菌抗原係源自分枝桿菌感染自

然病程之二或三間期，即活躍、復甦與潛伏期復甦期。分枝桿菌抗原之使用/表達，可為混合物形式或如本文描述之一或多個融合多胜肽。

[0017]本發明亦有關於特定分枝桿菌抗原之融合多胜肽、編碼/表達此類融合多胜肽之核酸分子與載體，及包含或編碼該融合多胜肽之組成物，以及製備該融合物、載體與組成物之方法。本發明亦有關於針對此類分枝桿菌抗原與融合多胜肽之抗體。其進一步有關使用此類免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、組成物或抗體，目的在於診斷、預防或治療分枝桿菌感染，或改善分枝桿菌感染之相關病情。

[0018]本發明之進一步觀點包括，針對有需求之個體，提供治療、預防或抑制分枝桿菌感染，或改善分枝桿菌感染相關病情之方法，其包含提供或投予此類免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體或組成物。

[0019]本發明之又進一步觀點係有關於，針對有需求個體，誘發免疫反應之方法，其包含提供或投予此類免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體或組成物，目的在於誘發或刺激該個體之免疫反應，以預防或治療分枝桿菌感染。

[0020]本發明之又一觀點係提供一物件套組，其包含複數個容器與指示，以提供或投予個體此類免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體或組成物。

[0021]本發明之又更一觀點係提供用於診斷分枝桿菌

感染(例如，結核病)之抗體試驗之試劑套組，其包含此類免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體或組成物。

[0022] 本發明提供之抗原組合物，相較於個別之抗原，具有改進與意想不到之免疫特性(例如，免疫反應之程度、品質及/或規模)。

[0023] 本發明特別適用於免疫療法，可單獨處理或作為BCG追加劑，用於分枝桿菌感染領域之預防或治療，例如，預防Mtb感染，及/或預防原發性TB，及/或預防潛伏性感染個體之再激活。其亦可用於結合標準(例如，抗生素治療)或現正發展之任何其他新式療法(例如，小型之直接或間接抑制劑分子；抗體或免疫治療藥物等)。本發明亦適用於獸醫領域，舉例而言，降低或消除動物之分枝桿菌感染，及/或活動性病症之風險，尤其是牛與山羊之養殖。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

[0024] 本發明一般有關於免疫性組合物，其包含至少5種分枝桿菌菌株抗原或編碼該至少5種抗原之核酸分子。

定義

[0025] 如本文各處所用，術語“一”意指“至少一”、“至少一第一”、“一或多個”或“複數個”指稱之化合物或步驟，除非文中另有規定。

[0026] 如本文所用，術語“及/或”意指包括“及”、“或”與“由該術語連接之所有或任何其他要素之組合”。

[0027] 如本文所用，術語“約”或“大約”意指10%以內，

較佳為8%以內，且更佳為5%以內之給定數值或範圍。

[0028]術語“胺基酸”、“殘基”與“胺基酸殘基”為同義詞，並包含天然胺基酸及胺基酸類似物(例如，非天然、合成與經修飾胺基酸，包括D或L光學異構體)。

[0029]術語“多胜肽”意指胺基酸殘基之聚合物，其包含至少九或多個胺基酸，經由共價胜肽鍵鍵結。多胜肽可為直鏈、支鏈或環狀，並可包含天然存在者及/或胺基酸類似物。其可經化學上修飾，如經醮化、經脂化、經乙醮化、經裂解、經雙硫鍵交聯及/或經磷酸化，或包含額外之胺基酸如標籤(his、myc、Flag等)或標的胜肽(訊息胜肽、穿膜結構域等)。應理解的是，術語“多胜肽”包含蛋白質(通常指包含50或更多個胺基酸殘基之多胜肽)、寡胜肽，以及胜肽(通常指包含小於50個胺基酸殘基之多胜肽)。每一多胜肽可因此具有特定胺基酸之特徵，並由特定核酸序列所編碼。

[0030]如本文所用，當用於定義產物、組成物與方法時，術語“包含”(與其任何之時態)、“具有”(與其任何之時態)、“包括”(與其任何之時態)或“含有”(與其任何之時態)為開放式，且不排除額外、未列舉之要素或方法步驟。因此，若一多胜肽“包含”一胺基酸序列，則胺基酸序列可為多胜肽最終胺基酸序列之一部分。此多胜肽可具有數百個額外之胺基酸殘基(例如，本文所述之標籤與標的胜肽)。“基本組成爲”意指排除任何重要意義之其他元件或步驟。因此，若一組成物之基本組成爲提及之成分，則不排除微量雜質與醫藥上可接受載體。一多胜肽“基本上由一胺基酸

序列組成”，意指此胺基酸序列最終僅存在一些額外之胺基酸殘基。“由...組成”意指成分或步驟排除微量要素。舉例而言，一多胜肽“由一胺基酸序列組成”，意指此多胜肽除了提及之胺基酸序列以外不含任何胺基酸。

[0031]術語“等同度”意指兩個多胜肽或核酸序列之間，胺基酸對胺基酸或核苷酸對核苷酸之對應關係。兩序列間等同度之百分比，為序列中相同位置數之一函數，並考慮空白處之數目，其必須被導入，使配對與各空白處長度最佳化。多種電腦程式與數學演算法為本領域中可得，以計算胺基酸序列間等同度之百分比，舉例而言，Blast程式取自NCBI，或位於Atlas of Protein Sequence and Structure之ALIGN (Dayhoffed, 1981, Suppl., 3: 482-9)。計算核苷酸序列間等同度之程式亦可取自專門之數據庫(例如，Genbank、Wisconsin Sequence Analysis Package、BESTFIT、FASTA與GAP程式)。為了便於說明，“至少80%等同度”意指80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0032]如本文所用，“可操作地連接”意指欲連接之元件經排列，使其順利達成目的。舉例而言，若一促進子可操作地連接至一核酸分子，則促進子自起始位置轉錄至終止子，導致核酸分子內之編碼序列於認可之宿主細胞內表現。

[0033]如本文所用，術語“分枝桿菌”、“分枝桿菌菌種”

與“分枝桿菌之”係可互為使用，其表示放線菌 (*Actinobacteria*) 屬之任何成員皆屬於分枝桿菌科 (*Mycobacteriaceae*) 家族。此類術語包含實驗室菌種及臨床分離物。

[0034]“分枝桿菌感染”意指個體暴露於分枝桿菌菌種，接著細菌於個體或個體組織內形成聚落。聚落形成會導致嚴重疾病(例如，結核病、麻風病、布路里潰瘍等，其取決於分枝桿菌)，或不產生不良徵兆(無症狀或潛伏性感染)。

[0035]如本文所用，術語“組合物”意指各種成分(例如，分枝桿菌抗原及/或編碼核酸分子)之任何可能排列。此一排列包括分枝桿菌抗原之混合物(例如，個別之抗原及/或抗原融合物之混合物)，或核酸分子之混合物(例如，由一或多個載體所攜帶)，以及多肽與核酸分子之混合物。本發明所含之組合物具有等莫耳濃度之各成分及濃度極為不同之組合物。應理解的是，各分枝桿菌成分之最佳化濃度，可由本領域之技術人員測定。

[0036]術語“免疫性”意指於個體身上誘發或刺激一可測量之T及/或B細胞媒介之免疫反應的能力，其中符合條件之成分即為具免疫性。舉例而言，若本發明之抗原組合物具免疫性，意指其可誘發或刺激個體之免疫反應，其可為先天性及/或特定性(亦即，針對至少一分枝桿菌抗原/表位，由該免疫性組合物所包含或表達)、體液性及/或細胞性(例如，抗體及/或細胞介素之產生，及/或細胞毒性T細胞、

B、T淋巴細胞、抗原表現細胞、輔助性T細胞、樹突狀細胞、NK細胞等之活化)，且通常造成經投藥個體之保護性反應。許多直接或間接之生物試驗為本領域可得，以評估一成分於體內(動物或人類)，或體外(例如，於生物樣本)之免疫性質，如本文所述。

[0037]如本文所用，術語“分枝桿菌抗原”意指存在於或取自於分枝桿菌菌株或其片段(例如，表位)多胜肽，其可結合於抗體或T細胞受體。典型而言，此類抗原含有一或多個B及/或T表位，特別是CTL或T_H表位或兩者，其涉及特定抗體或T細胞受體對於主要組織相容複合體(MHC)之辨識。在本發明全文中，此術語包含原始分枝桿菌之多胜肽及其片段與修飾體(亦即，變體)，如以下所述。

[0038]“表位”為一最小之胜肽模體(通常為8-25個胺基酸殘基)，可形成一位置經由抗體、T細胞受體或HLA分子辨識。該殘基可相連(線型表位)或不相連(構形表位，其所包括之殘基彼此未立即相鄰)。

[0039]術語“治療”(與其任何之形式)，如本文所用，包含預防(例如，防止個體有分枝桿菌感染之風險)及/或治療(例如，個體經診斷為感染分枝桿菌)。治療需於外部或內部投予個體活性試劑(例如，本文所述之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體及/或組成物)，最終結合傳統治療方法，尤其是針對目前活動性分枝桿菌病症(例如，TB)之治療。

[0040]術語“個體”一般意指受益於針對分枝桿菌菌種

所誘導或刺激之免疫反應之脊椎動物，特別是，選自於由家禽動物、農場動物、運動動物與靈長類動物所組成之族群，之哺乳類動物。較佳為，個體為人類，其經診斷出或具有分枝桿菌感染風險，尤其是*Mtb*，因此，易於或具有風險性，患有分枝桿菌感染(例如，活動性或潛伏性結核病)造成或相關之疾病與病症。

[0041]“保護性反應”有其一貫之意義，亦即，相較於非治療個體之反應，治療可提供效益於經治療個體；例如，誘發或刺激免疫反應、保護其免於受分枝桿菌感染，或增加活動性病症之抗性，或預防潛伏性分枝桿菌感染之再激活，或甚至活動性病症發病後之治療。

[0042]如本文所用，術語“經分離”意指一成分(例如，多胜肽、核酸分子、載體等)由其天然環境中移出(亦即，由與其天然相關之至少一其他成分中分離出)。

[0043]術語“取自”或“源自”係用於辨別一成分(例如，多胜肽、核酸分子)之原始來源，但不意謂著侷限該成分之製造方法，其可為，舉例而言，藉由化學合成或重組工具。

分枝桿菌菌種

[0044]如先前所定義，由本發明免疫性組合物包含/編碼之分枝桿菌抗原可單獨地取自目前經辨識分枝桿菌(*M.*)菌種之任何成員。用於本發明之多種分枝桿菌已於本領域中提出。示範性分枝桿菌菌種包括牛草分枝桿菌(*M. phlei*)、恥垢分枝桿菌(*M. smegmatis*)、非洲分枝桿菌(*M. africanum*)、卡氏分枝桿菌(*M. canetti*)、偶發分枝桿菌(*M.*

fortuitum)、海洋分枝桿菌(*M. marinum*)、潰瘍分枝桿菌(*M. ulcerans*)、結核分枝桿菌(*Mtb*)、副結核分枝桿菌(*M. paratuberculosis*)、牛分枝桿菌(*M. bovis*)、田鼠分枝桿菌(*M. microti*)、西氏分枝桿菌(*M. celatum*)、鳥分枝桿菌(*M. avium*)、癩瘋分枝桿菌(*M. leprae*)、鼠癩瘋結核分枝桿菌(*M. lepraemurium*)、胞內分枝桿菌(*M. intracellulare*)、癩癧分枝桿菌(*M. scrofulaceum*)、蟾蜍分枝桿菌(*M. xenopi*)、日內瓦分枝桿菌(*M. genavense*)、堪薩氏分枝桿菌(*M. kansasii*)、猿分枝桿菌(*M. simiae*)、蘇爾加分枝桿菌(*M. szulgai*)、嗜血分枝桿菌(*M. haemophilum*)、*M. asiaticum*、海魚分枝桿菌(*M. malmoense*)、母牛分枝桿菌(*M. vaccae*)、山羊分枝桿菌(*M. caprae*)、海豹分枝桿菌(*M. pinnipedii*)與施氏分枝桿菌(*M. shimoidei*)，但不限於此。

[0045]在一較佳之實施例中，本發明所使用之分枝桿菌抗原取自結核病群之分枝桿菌菌種，其包括傳統上被認為會造成結核病之菌種，以及於免疫功能低下個體(例如，HIV感染病患)造成結核病與肺病之分枝桿菌環境與機會菌種。本文所用之結核病群示範性菌種包括但不侷限於，結核分枝桿菌(*Mtb*)、牛分枝桿菌、牛分枝桿菌BCG、非洲分枝桿菌、卡氏分枝桿菌、山羊分枝桿菌與田鼠分枝桿菌。較佳之實施例為針對*Mtb*，包括*Mtb*實驗室菌株，如H37Rv與H37Ra，與臨床分離物如KZN4207、T85、CDC1551(於美國分離)、F11(於南非分離)、C、K85(於荷蘭分離)、CPHL-A，以及MDR或XDR分離物，如TN5904、Haarlem、

KZN1435、Beijing與KZN605。分枝桿菌抗原來源之其他較佳菌種為牛分枝桿菌、牛分枝桿菌BCG與山羊分枝桿菌，尤其是獸醫途徑。然而，由於分枝桿菌菌種之間，其胺基酸與核苷酸層級之同源性比例高，可預期會出現交叉反應。舉例而言，*Mtb*與牛分枝桿菌之Rv1733抗原為100%相同，而非洲分枝桿菌Rv1733的210個胺基酸中有209個與*Mtb*相同。因此，*Mtb*抗原組合物可用於*Mtb*感染(人類用)，及牛分枝桿菌與山羊分枝桿菌(獸醫用)感染之個體。

[0046]適用之分枝桿菌抗原胺基酸序列與其編碼核苷酸序列，可取自特定數據庫與文獻。舉例而言，*Mtb*序列可取自Cole等人之文獻(1998, *Nature* 393: 537)或網站，如由Wellcome Trust Sanger Institute、Institut Pasteur與其他(例如，TB數據庫(@tbdb.org)與tuberculist(@tuberculist.epfl.ch))所維護之網站。然而，本發明並不侷限於此類示範性分枝桿菌菌種。的確，核苷酸與胺基酸序列可依不同分離物與菌株而異，而此自然遺傳變異涵蓋於本發明範疇之中，以及非自然之修飾物如以下所述。

免疫性組合物

[0047]如本文所使用，“至少5”為一包含於5至50範圍內之數字(亦即，5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35等)，理想為5至33，較佳為7至20，且更佳為8至18，特佳為10至15(例如，12、13或14)。較佳為，本發明之組合物包含約10至15種*Mtb*

抗原或相對應之核酸分子。

[0048] 在本發明內文中，“至少5種分枝桿菌抗原”為彼此互異(例如，可使用多重拷貝之相同分枝桿菌抗原，但是組合物包含/編碼至少5種不同分枝桿菌抗原)。

[0049] 或者，或此外，至少5種分枝桿菌抗原之每一者，可為原始分枝桿菌抗原(例如，全長之抗原)或其修飾物(片段或變體)。

[0050] “原始”分枝桿菌抗原可發現、分離、取自於自然界之分枝桿菌來源。此來源包括收集自經感染個體或暴露於分枝桿菌者之生物樣本(例如，血液、血漿、血清、唾液、痰、組織切片、生物檢體標本等)、經培養細胞及重組型材料，其取自存保機構(例如，ATCC或TB機構)、圖書館，或描述於文獻(例如，分枝桿菌分離物、分枝桿菌基因組、基因組片段、基因組RNA或cDNA，及本領域中包括此要素之任何質體與載體)。

[0051] 經修飾之分枝桿菌抗原(例如，變體)典型上有一或多個位置不同於本文所具體揭示或原始之多胜肽。任何修飾作用皆可考慮，包括取代、插入、加入及/或刪除一或多個胺基酸殘基、非天然之排列與此類可能之任何組合物。胺基酸取代反應可為保留性或非保留性。當考慮到數個修飾時，可考量連續性殘基，及/或非連續性殘基。以多種本技術領域之習知方法進行修飾，如定點突變法(例如，使用Amersham, Les Ullis, France的Sculptor™體外突變系統)、PCR突變法、DNA洗牌法與經由合成技術(例如，產生

合成之核酸分子，其編碼所希望之多胜肽變體)。

[0052]無論其來源(原始或經修飾)，較佳之情況為，本發明免疫性組合物包含或編碼之各分枝桿菌抗原，保留相對應原始抗原之一或多個免疫性部位，包括B及/或T細胞表位。辨別此相關之免疫性部位之方法為本領域中所習知。舉例而言，T細胞表位可藉由生物試驗(例如，以合成之重疊性寡胜肽庫進行IFN γ 試驗)，或可取得之預測程式進行辨識。

[0053]在一實施例中，本發明之免疫性組合物包含或編碼至少2種不同感染期，選自於由活躍、復甦與潛伏期(例如，活躍期與復甦期、活躍期與潛伏期、復甦期與潛伏期)所組成族群之分枝桿菌抗原。較佳之組合物為包含或編碼“多期性”之分枝桿菌抗原，且特別是*MTB*抗原，取自三個感染期，其中至少一抗原取自活躍感染期、至少一抗原取自復甦感染期，與至少一抗原取自潛伏感染期。

[0054]“活躍期抗原”典型上為分枝桿菌於體內活躍生長與複製時，所主要表達之蛋白質。本發明所用之多種活躍期分枝桿菌抗原係描述於文獻(例如，Bertholet et al., 2008, *J. Immunol.* 181: 7948-57; Bertholet et al., 2010, *Sci Transl Med* 2: 53ra74)。特別適用之活躍期抗原為選自於由ESAT-6 (Rv3875)、CFP-10 (Rv3874)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85A (Rv3804)、Ag85B (Rv1886)、Rv3619、Rv3620，與PPE家族蛋白質Rv3478與Rv2608，及其任何組成物所組成之族群。較佳之免疫性組合物係包含或編碼有至少ESAT-6

(Rv3875)、Ag85B (Rv1886)與TB10.4 (Rv0288)。

[0055]“潛伏期抗原”主要表達於分枝桿菌感染之休眠(或潛伏)期間，為一種低代謝活性之可逆狀態，其中分枝桿菌可持續長時間。本發明所用之多種潛伏期分枝桿菌抗原係描述於文獻。示範性之*Mtb*潛伏期抗原為由DosR調節子所編碼者，其媒介細菌對於缺氧與抗原缺乏之反應，並於營養物耗盡時加強調節 (Voskuil et al., 2003, J. Exp Med 198: 705-13 ; Leyten et al., 2006, Microbes Inf. 8: 2052-60 ; Roupie et al., 2007, Infection and Immunity 75: 941-9 ; Black et al., 2009, Clin Vaccine Immunol 16: 1203-12 ; Schuck et al., 2009, PLoS One 4: e5590 ; Vipond et al., 2006, Vaccine 24: 6340-50 ; Vipond et al., 2007, Tuberculosis 86: 218-24 ; Bertholet et al., 2008, J. Immunol. 181: 7948-57 ; Bertholet et al., 2010, Sci Transl Med 2: 53ra74, Mollenkopf et al., 2004, Infect Immun 72: 6471-9 ; WO03/000721 ; WO03/004520 ; WO03/035681 ; WO2004/006952 與 WO2006/104389)。特別適用之潛伏期抗原為選自於由 Rv0081、Rv0111、Rv0198、Rv0569、Rv1733c、Rv1735、Rv1737、Rv1806、Rv1807、Rv1813、Rv2005c、Rv2029c、Rv2032、Rv2626、Rv2627、Rv2628、Rv2660c、Rv3407、Rv3812與Rv3478，及其任何組合物所組成之族群；且更佳為選自於由Rv0111、Rv1733、Rv2029與Rv2626，或選自於由Rv0569、Rv1807、Rv1813、Rv3407與Rv3478，或選自於由Rv0111、Rv1733、Rv2029、Rv2626、Rv0569、Rv1807、

Rv1813、Rv3407與Rv3478所組成之族群。

[0056]“復甦期抗原”意指休眠狀態與活躍生長與複製(分枝桿菌感染活躍狀態)間之過渡時期，主要表達或參與之任何抗原。本發明所用之復甦期抗原係描述於文獻(例如，Mukamolova et al., 2002, *Mol Microbiol* 46: 623-35；Yeremeev et al., 2003, *Infection and Immunity* 71: 4789-94；Mukamolova et al., 2006, *Mol Microbiol* 59: 84-98；Tufariello et al., 2006, *Infect Immun* 74: 2985-95；Biketov et al., 2007, *MMC Infect Dis* 7: 146；Kana et al., 2008, *Mol Microbiol* 67: 672-84；Kana et al., 2009, *FEMS Immunol Med Microbiol* 58: 39-50；Russel-Goldman et al., 2008, *Infect Immun* 76: 4269-81；Gupta et al., 2010, *Microbiol* 156: 2714-22與Commandeur et al., 2011, *Clin Vaccine Immunol*. 18: 676-83)。特別適用之復甦期抗原為選自於由RpfA、RpfB、RpfC、RpfD與RpfE，及其任何組成物所組成之族群。較佳之免疫性組成物係至少包含或編碼RpfB與RpfD(例如，其免疫性片段)。

[0057]在一較佳之實施例中，本發明免疫性組合物包含或編碼至少5種分枝桿菌抗原，其選自於由ESAT-6(Rv3875)、CFP-10(Rv3874)、TB10.4(Rv0288)、Ag85A(Rv3804)、Ag85B(Rv1886)、Rv3619、Rv3620、RpfA、RpfB、RpfC、RpfD、RpfE、Rv0081、Rv0111、Rv0198、Rv0569、Rv1733c、Rv1735、Rv1737、Rv1806、Rv1807、Rv1813、Rv2005c、Rv2029c、Rv2032、

Rv2626、Rv2627、Rv2628、Rv2660c、Rv3407 Rv3478與Rv3812所組成之族群；較佳為選自於由ESAT-6 (Rv3875)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85B (Rv1886)、RpfB、RpfD、Rv0111、Rv0569、Rv1733c、Rv1807、Rv1813、Rv2029c、Rv2626、Rv3407與Rv3478所組成之族群；且更佳為選自於包含如SEQ ID NO: 1-14所示之胺基酸序列或其任何變體或片段之多胜肽族群。

[0058] 爲了便於說明，SEQ ID NO: 1代表Rv0111之胺基酸序列；SEQ ID NO: 2爲TB10.4之胺基酸序列；SEQ ID NO: 3爲Rv0569之胺基酸序列；SEQ ID NO: 4爲RpfB之胺基酸序列；SEQ ID NO: 5爲Rv1733之胺基酸序列；SEQ ID NO: 6爲Rv1807之胺基酸序列；SEQ ID NO: 7爲Rv1813之胺基酸序列；SEQ ID NO: 8爲Ag85B之胺基酸序列；SEQ ID NO: 9爲Rv2029之胺基酸序列；SEQ ID NO: 10爲Rv2626之胺基酸序列；SEQ ID NO: 11爲RV2839c之胺基酸序列；SEQ ID NO: 12爲Rv3407之胺基酸序列；SEQ ID NO: 13爲Rv3478之胺基酸序列與SEQ ID NO: 14爲ESAT-6之胺基酸序列。

[0059] 本發明內文中可預想，各經修飾分枝桿菌抗原包含一或多個原始型相關之修飾物，尤其是有益於所得多胜肽之合成、加工、穩定及/或溶解，及/或其免疫原性之一或多個修飾物。適用修飾物之代表範例包括，但不侷限於，(a)刪除內部高度疏水性區段、(b)刪除N端訊息胜肽(視需要置換異種樣本)、(c)刪除未折疊區段，其可能負面干擾穩定

性、免疫性與重組型表達，及/或(d)刪除或突變催化結構域，以消除生物活性。

[0060]特別適用之免疫性組成物所包含或編碼之分枝桿菌抗原，為選自於包含SEQ ID NO: 15-24所示胺基酸序列之多胜肽族群。更特別地，SEQ ID NO: 15代表Rv0111抗原(Rv0111*)相對於原始型之修飾，其刪除N端疏水性部位(由第一個殘基至約位置393)。SEQ ID NO: 16代表RpfB抗原相對於原始型之修飾，其刪除訊息胜肽(由第一個殘基至約殘基位置29，並刪除催化結構域，因此保留RpfB約位置30至位置283)。SEQ ID NO: 17代表Rv1733抗原(Rv1733*)相對於原始型之修飾，其刪除N端經預測TM結構域(由第一個殘基至約位置61)。SEQ ID NO: 18代表Rv1807抗原(Rv1807*)相對於原始型之修飾，其刪除未折疊之C端部位(約最後60個殘基)。SEQ ID NO: 19代表Rv1813抗原(Rv1813*)相對於原始型之修飾，其刪除N端訊息胜肽(由第一個殘基至約位置34)。SEQ ID NO: 20代表Ag85B (Ag85B*)相對於原始型之修飾，其刪除N端訊息胜肽(由第一個殘基至約位置39)。SEQ ID NO: 21代表Rv2029抗原(Rv2029*)相對於原始型之修飾，其刪除C端部位(約最後25個殘基)，並突變位置265以消除Rv2029酵素活性(例如，D265N；Cabrera et al., 2010, Arch Biochem Biophys 502: 23-30)。SEQ ID NO: 22代表RpfD抗原相對於原始型之修飾，以保留催化結構域(亦稱為LD，即溶菌酶結構域)，其伴隨三個突變位置，以消除相關之酵素活性(例如，E292K、T315A與

Q347A)與刪除最後7個殘基。SEQ ID NO: 23代表Rv3407抗原(Rv3407*)相對於原始型之修飾，其刪除未折疊之C端部位(約最後33個殘基)。SEQ ID NO: 24代表Rv3478抗原(Rv3478*)相對於原始型之修飾，其刪除未折疊之C端部位(約最後40個殘基)。

[0061]在一較佳之實施例中，本發明免疫性組合物所包含或編碼之至少5種分枝桿菌抗原，其胺基酸序列，以全長之多胜肽或其片段(例如，50個連續胺基酸殘基或更多，如60、75、80或90個胺基酸殘基之片段)而言，具有至少80%之等同度(例如，80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之等同度)，尤其是，該至少5種*Mtb*抗原為選自於包含胺基酸序列至少80%同源或等同於任何之SEQ ID NO: 1-24 (有或無起始Met)之多胜肽族群。

[0062]在一更佳之實施例中，本發明免疫性組合物所包含或表達之至少Rv0111，具有一特別偏好Rv0111*，如SEQ ID NO: 15所示。

[0063]在一尤佳之實施例中，本發明免疫性組合物包含或表達至少Rv0111、Rv2626、RpfB、RpfD、TB10.4與Ag85B，其中較佳為Rv0111*如SEQ ID NO: 15所示、Rv2626如SEQ ID NO: 10所示、RpfB如SEQ ID NO: 16所示、RpfD如SEQ ID NO: 22所示、TB10.4如SEQ ID NO: 2所示，且Ag85B如SEQ ID NO: 20所示。

[0064]如前面所述，本發明免疫性組合物包含其組成

分枝桿菌抗原，及/或編碼核酸分子之任何排列。因此，本發明免疫性組合物所包含或編碼之分枝桿菌抗原形式，可為個別之多胜肽(例如，經重組產生之*MTB*抗原混合物)，或一或多個融合多胜肽(共價連接至少兩種分枝桿菌抗原)，或個別抗原與融合物二者皆有。

[0065]同時，核酸分子組合物包含個別之核酸分子，或共價連接之核酸分子(例如，融合物之編碼核酸)，或個別與經融合核酸分子二者皆有，其由一或多個載體所攜帶。鑑於分枝桿菌抗原之數目(5至50)，較佳之組合物包含一或多個編碼抗原融合物之載體，如以下所述。載體組合物可使用相同類型載體(例如，兩個MVA)，或不同類型載體(例如，一個質體DNA與一個MVA)，以表達本文所述之各種分枝桿菌抗原或融合物。

融合多胜肽

[0066]依據另一觀點，本發明亦提供經分離之融合多胜肽，其包含本發明免疫性組合物所包含或編碼之二或多個分枝桿菌抗原，以及含有此類融合多胜肽之組成物。

[0067]如本文所用，術語“融合物”或“融合多胜肽”，意指二或多個多胜肽之單一多胜肽鏈共價連接，並以基因方式進行，亦即，編碼該多胜肽之核酸分子以同一讀框形式融合。藉由“同一讀框融合”之意義為，經融合之編碼序列於表達後產生單一多胜肽，且各融合多胜肽之間不具有轉譯終止子。融合可為直接(亦即，其間不具任何額外之胺基酸殘基)，或間接(例如，經由融合多胜肽間之連接子)，且

可於多胜肽之N或C端或內部進行。連接子之存在有助於校正折疊，及/或融合多胜肽之功能。本發明並未侷限所用連接子序列之形式、大小或數目。爲了便於說明，典型上連接子之長度爲3至30個胺基酸，並由重複之胺基酸殘基，如甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺酸、丙胺酸及/或脯胺酸，組成。

[0068]如同前述，本發明融合多胜肽構成之分枝桿菌抗原可爲如前述之原始，及/或經修飾(變體)，及/或其片段。以融合多胜肽形式使用之此類分枝桿菌抗原組合物，相較於以個別抗原(或表達載體)混合物使用之相同抗原組合物，可提供增進之免疫原性。

[0069]較佳爲，本發明之融合多胜肽包含至少兩種(例如，2、3、4、5、6等)如本文所述之分枝桿菌抗原，且較佳爲至少2種多胜肽選自於包含至少80%(例如，98或100%)等同於SEQ ID NO: 1-24任一者之胺基酸序列之多胜肽族群。

[0070]在一實施例中，本發明之融合多胜肽包含相同感染期之分枝桿菌抗原。潛伏期*Mtb*抗原之示範性融合物包含Rv2029、Rv2626、Rv1733與Rv0111；活躍期*Mtb*抗原之示範性融合物包含Ag85B、TB10.4與ESAT6；以及復甦期*Mtb*抗原之示範性融合物包含RpfB與RpfD 抗原。

[0071]在另一實施例中，本發明之融合多胜肽包含2種不同感染期，或甚至活躍、復甦與潛伏期之分枝桿菌抗原。此類型之示範性融合物包括，但不侷限於，潛伏期與

活躍期*Mtb*抗原融合物，其包含Rv2029、TB10.4、ESAT-6與Rv011；復甦期與活躍期*Mtb*抗原融合物，其包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6；以及潛伏期、復甦期與活躍期*Mtb*抗原融合物，其包含Ag85B、Rv2626、RpfB、-RpfD與Rv1733。

[0072]在一較佳之實施例中，本發明融合多胜肽係選自於由下列組成之族群：

- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原Rv0111 較佳為Rv0111，如SEQ ID NO: 15所示)；
- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原Rv2029、Rv2626、Rv1733與Rv0111；
- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807；
- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原Ag85B、TB10.4與ESAT6；
- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原RpfB與RpfD (例如，如所謂的RPFB-Dhyb所示，其為LD刪除之RpfB抗原與RpfD之LD結構域之融合物，並以突變消除酵素活性))；
- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原RpfB、RpfD (例如，RPFB-Dhyb)、Ag85B、TB10.4與ESAT6；
- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD (例如，RPFB-Dhyb)與Rv1733；
- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原Rv2029、TB10.4、

ESAT6與Rv0111；以及

- 一融合多胜肽，其包含*Mtb*抗原Ag85B、Rv2626與Rv1733。

[0073]在本發明內文中，於示範性融合多胜肽辨別出之分枝桿菌抗原，可由N至C端之任何順序，毋須遵照描述之順序。因此，含有*Mtb*抗原Ag85B、Rv2626與Rv1733之融合物，除了已提出的Ag85B-Rv2626-Rv1733融合物以外，可包含Ag85B-Rv1733-Rv2626；Rv1733-Rv2626-Ag85B；Rv1733-Ag85B-Rv2626；Rv2626-Ag85B-Rv1733；Rv2626-Rv1733-Ag85B與Ag85B-TB10.4-Rv2626-Ag85B等融合體。

[0074]除了分枝桿菌抗原以外，本發明免疫性組合物及/或融合多胜肽，可任擇地包含其他成分，其衍生自分枝桿菌菌種(例如，額外之分枝桿菌抗原)或異種(亦即，源自不同於分枝桿菌之來源)。此類額外之成分可能為免疫性或非。額外成分之代表，包括，但不侷限於，標籤胜肽、標的胜肽、寡聚化結構域、免疫活化劑胜肽/多胜肽，與編碼此類要素之核酸分子等。

[0075]在一實施例中，由本發明免疫性組合物或融合多胜肽呈現或編碼之任何分枝桿菌抗原，可操作地連接標的胜肽，如訊息及/或穿膜胜肽。此類標的胜肽為本領域中所習知(請見，舉例而言，WO99/03885)。簡言之，訊息胜肽(SS)一般出現於膜呈現或分泌多胜肽之N端，並可啓動其穿越內質網(ER)。其本質上包含15或多個疏水性胺基酸，

且隨後由特定位於ER之內胜肽酶移除，以產生成熟之多胜肽。穿膜胜肽(TM)常為本質上具高度疏水性，並可使多胜肽錨泊於細胞膜上。在本發明內文中，穿膜及/或訊息胜肽之選擇相當多。其可取自任何之膜錨泊，及/或分泌多胜肽(例如，細胞或病毒多胜肽)，如免疫球蛋白、組織胞漿素原活化劑(tPA)、胰島素、狂犬病糖蛋白、HIV病毒套膜糖蛋白，或麻疹病毒F蛋白，或可為經合成。訊息胜肽之較佳插入位置為N端之轉譯起始密碼子下游，而穿膜胜肽則為C端，舉例而言，緊鄰終止密碼子上游。

[0076] 或者，或此外，本發明免疫性組合物或融合蛋白質所呈現或編碼之任何分枝桿菌抗原，可操作性地與標籤胜肽連接，以協助其分離與偵測，或協助辨識可表達此抗原或融合物之宿主細胞。本發明內文中可使用多種標籤胜肽，包括PK標籤、FLAG標籤(SEQ ID NO: 25)、MYC標籤(SEQ ID NO: 26)、聚組胺酸標籤(常為一段5至10個組胺酸殘基；例如，SEQ ID NO: 27)，但不侷限於此。標籤胜肽可藉由免疫偵測試驗診斷，其使用抗標籤之抗體，如附屬之範例中所述。標籤胜肽可單獨地位於分枝桿菌抗原或融合物之N端(標籤-多胜肽)或位於C端(多胜肽-標籤)或內部，或使用數個標籤時，位於任何之這些位置。

[0077] 或者，或此外，本發明免疫性組合物或融合蛋白質所呈現或編碼之任何分枝桿菌抗原，可操作地連接至一或多個免疫活化劑胜肽/多胜肽上，以增強免疫特性。舉例而言，鈣網蛋白(calreticulin)(Cheng et al., 2001, J. Clin.

Invest. 108: 669)、*Mtb*熱休克蛋白70 (HSP70) (Chen et al., 2000, Cancer Res. 60: 1035)、泛素(Rodriguez et al., 1997, J. Virol. 71: 8497), 以及T輔助表位, 如Pan-Dr胜肽(Sidney et al., 1994, Immunity 1: 751)、pstS1 GCG表位(Vordermeier et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22: 2631)、破傷風類毒素胜肽 P2TT (Panina-Bordignon et al., 1989, Eur. J. Immunol. 19: 2237)、P30TT (Demotz et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23: 425)、血凝素表位(Rothbard et al., 1989, Int. Immunol. 1: 479), 與C4bp寡聚合化結構域(Spencer et al., 2012, PLoS One 7:e33555)。

[0078] 依據分枝桿菌抗原之不同, 當與不具此胜肽之經表達組合物或融合物比較時, 此類胜肽之呈現有益於強化所得組合物或融合多胜肽之表達及/或免疫原性。表達之增強情形可由傳統技術測定, 如西方墨點法。免疫原性之增強情形可利用傳統試驗測定, 如ELISpot試驗。

[0079] 在一較佳之實施例中, 本發明融合多胜肽可操作地連接至標的及/或標籤胜肽上。舉例而言, 融合物編號2、3、4與5, 如附屬範例中所示, 係可操作地連接至緊鄰起始子Met後之N端訊息胜肽與Flag標籤, 及緊鄰STOP密碼子前之C端myc標籤、穿膜胜肽與His標籤, 而融合物編號9、10、11與12則可操作地連接至緊鄰起始子Met後之N端Flag標籤, 及緊鄰STOP密碼子前之C端myc標籤, 與隨後之His標籤。另一方面, 融合物編號6、8、13與14係可操作地連接至緊鄰起始子Met後之N端Flag標籤, 及緊鄰STOP密碼子

前之C端myc標籤與His標籤。

[0080]融合多胜肽之較佳範例為選自於多胜肽族群，其包含，或其基本組成爲，或其組成爲胺基酸序列，其中呈現與SEQ ID NO: 28-39所示之任一胺基酸序列，具有至少80%等同度、較有利爲至少85%等同度、較希望爲至少90%等同度、較佳爲至少95%等同度與更佳爲98%等同度及甚而更佳爲100%等同度。更具體地，SEQ ID NO: 28與29包含融合多胜肽，其包含Ag85B、TB10.4與ESAT6，且個別地具有或不具標的胜肽(如附屬範例中所示之融合物編號2與10)。SEQ ID NO: 30與31包含所謂的RPFb-Dhyb融合多胜肽，其包含RpfB與RpfD，且個別地具有或不具標的胜肽(如附屬範例中所示之融合物編號3與12)。SEQ ID NO: 32與33包含融合多胜肽，其包含RPFb-Dhyb、Ag85B、TB10.4與ESAT6，且個別地具有或不具標的胜肽(如附屬範例中所示之融合物編號4與11)。SEQ ID NO: 34與35包含融合多胜肽，其包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807，且個別地具有或不具標的胜肽(如附屬範例中所示之融合物編號5與9)。SEQ ID NO: 36包含融合多胜肽，其包含Ag85B、Rv2626、RPFb-Dhyb與Rv1733，且具有訊息胜肽(如附屬範例中所示之融合物編號6)。SEQ ID NO: 37包含融合多胜肽，其包含Ag85B、Rv2626與Rv1733，且具有訊息胜肽(如附屬範例中所示之融合物編號8)。SEQ ID NO: 38包含融合多胜肽，其包含Rv2029、Rv2626、Rv1733與Rv0111，且具有訊息胜肽(如附屬範例中所示之融合物編號13)。SEQ ID

NO: 39包含融合多胜肽，其包含Rv2029、TB10.4、ESAT-6與Rv0111，且具有訊息胜肽(如附屬範例中所示之融合物編號14)。

[0081]融合多胜肽之更佳範例為選自於多胜肽族群，其包含，或其基本組成爲，或其組成爲一胺基酸序列，其與下列胺基酸序列之任一者具有至少80%等同度、較有利爲至少85%等同度、較希望爲至少90%等同度、較佳爲至少95%等同度與更佳爲98%等同度及甚而更佳爲100%等同度：

- SEQ ID NO: 28所示之胺基酸序列，由約位置32至約位置506 (融合物Ag85B*-TB10.4-ESAT-6，如附屬範例之融合物編號2或10所示)；
- SEQ ID NO: 29所示之胺基酸序列，由約位置10至約位置484 (融合物Ag85B*-TB10.4-ESAT-6，如附屬範例之融合物編號2或10所示)；
- SEQ ID NO: 30所示之胺基酸序列，由約位置32至約位置380 (融合物RPFb-Dhyb，如附屬範例之融合物編號3或12所示)；
- SEQ ID NO: 31所示之胺基酸序列，由約位置10至約位置358 (融合物RPFb-Dhyb，如附屬範例之融合物編號3或12所示)；
- SEQ ID NO: 32所示之胺基酸序列，由約位置32至約位置855 (融合物RPFb-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT-6，如附屬範例之融合物編號4或11所示)；

- SEQ ID NO: 33所示之胺基酸序列，由約位置10至約位置833（融合物RPFb-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT-6，如附屬範例之融合物編號4或11所示）；
- SEQ ID NO: 34所示之胺基酸序列，由約位置32至約位置1115（融合物Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807，如附屬範例之融合物編號5或9所示）；
- SEQ ID NO: 35由約位置10至約位置1093（融合物Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807，如附屬範例之融合物編號5或9所示）；
- SEQ ID NO: 36所示之胺基酸序列，由約位置32至約位置956（融合物Ag85B*-Rv2626-RPFb-Dhyb-Rv1733*，如附屬範例之融合物編號6所示）；
- SEQ ID NO: 37所示之胺基酸序列，由約位置32至約位置607（融合物Ag85B*-Rv2626-Rv1733*，如附屬範例之融合物編號8所示）；
- SEQ ID NO: 38所示之胺基酸序列，由約位置37至約位置932（融合物Rv2029-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*，如附屬範例之融合物編號13所示）；以及
- SEQ ID NO: 39所示之胺基酸序列，由約位置37至約位置831（融合物Rv2029*-TB10.4-ESAT-6-Rv0111*）。

[0082]當然，此類胺基酸序列可配備起始子 Met。

[0083]在一較佳之實施例中，本發明之融合多胜肽可更包含適當之標的胜肽，如訊息及/或穿膜胜肽，以允許其

呈現於細胞膜。更佳之融合多胜肽係選自於多胜肽族群，其包含，或其基本組成爲，或其組成爲胺基酸序列，其與下列胺基酸序列之任一者具有至少80%等同度、較有利爲至少85%等同度、較所欲爲至少90%等同度、較佳爲至少95%等同度，以及更佳爲98%等同度及甚而更佳爲100%等同度：

- SEQ ID NO: 28所示之胺基酸序列，由位置1 (起始子Met) 至約位置23，與由約位置32至約位置506，與由約位置517至約位置583 (融合物SS-Ag85B*-TB10.4-ESAT-6-TM，如附屬範例之融合物編號2所示)；
- SEQ ID NO: 30所示之胺基酸序列，由位置1 (起始子Met)至約位置23，與由約位置32至約位置380，與由約位置391至約位置457 (融合物SS-RPFB-Dhyb-TM，如附屬範例之融合物編號3所示)；
- SEQ ID NO: 32所示之胺基酸序列，由位置1 (起始子Met)至約位置23，與由約位置32至約位置855，與由約位置866至約位置932 (融合物SS- RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT-6-TM，如附屬範例之融合物編號4所示)；
- SEQ ID NO: 34所示之胺基酸序列，由位置1 (起始子Met)至約位置23，與由約位置32至約位置1115，與由約位置1126至約位置1192 (融合物SS-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TM，如附屬範例之融合物編號5所示)；

- SEQ ID NO: 36所示之胺基酸序列，由位置1 (起始子Met)至約位置23，與由約位置32至約位置956 (融合物SS-Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733*，如附屬範例之融合物編號6所示)；
- SEQ ID NO: 37所示之胺基酸序列，由位置1 (起始子Met)至約位置23，與由約位置32至約位置607 (融合物SS-Ag85B*-Rv2626-Rv1733*，如附屬範例之融合物編號8所示)；
- SEQ ID NO: 38所示之胺基酸序列，由位置1 (起始子Met)至約位置28，與由約位置37至約位置932 (融合物SS-Rv2029-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*，如附屬範例之融合物編號13所示)；以及
- SEQ ID NO: 39所示之胺基酸序列，由位置1 (起始子Met)至約位置28，與由約位置37至約位置831 (融合物SS-Rv2029*-TB10.4-ESAT-6-Rv0111*，如附屬範例之融合物編號14所示)。

[0084] 典型而言，本發明免疫性組合物與融合多胜肽所含之編碼有此類抗原之分枝桿菌抗原與核酸分子，可使用標準技術分離或製備。其可純化自，例如，細菌培養液，或於宿主細胞內以任何本領域可得之表達系統重組製造，或投予如本文所述之適當表達載體以供給個體。

核酸分子與核酸組合物

[0085] 本發明亦提供經分離之核酸分子，其可編碼本發明免疫性組合物與融合多胜肽所含之至少5種分枝桿菌抗

原，以及包含此類核酸分子之組合物。

[0086] 在本發明內文中，術語“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”與“核苷酸序列”可互換使用，並限定為任何長度之聚去氧核糖核苷酸(DNA) (例如，cDNA、基因組DNA、質體、載體、病毒基因組、經分離DNA、探針、引子及其任何混合物)，或聚核糖核苷酸(RNA)(例如，mRNA、反義股RNA)，或經混合之聚核糖-聚去氧核糖核苷酸等聚合物。其包含單或雙股、直鏈或環狀、天然或合成之核酸。

[0087] 如前面所定義，本發明之核酸分子可為原始核酸(例如，分離自基因組或基因組片段或分枝桿菌)或人為修飾，包括取代、刪除、加成及/或插入一或多個核苷酸。本發明所含之任何修飾，目的為增進選殖、表達、穩定性(例如，引入適當之限制切位、退化及/或最佳化核苷酸序列，以最佳化一給定宿主細胞之轉譯作用，及/或阻斷潛在之負面因素，其可去穩定核酸分子或其轉錄本)。當考量多種修飾時，可關注連續及/或不連續之核苷酸殘基。本發明考量之修飾包括沈默修飾(silent modifications)，其不改變編碼分枝桿菌抗原與融合多胜肽之胺基酸序列，以及轉譯成經編碼分枝桿菌多胜肽之修飾。較佳為，相對於未經修飾者，修飾後不會降低經編碼分枝桿菌抗原與融合多胜肽之免疫能力。

[0088] 在一實施例中，本發明核酸分子之核苷酸序列全長或其部分可經退化，以降低本發明內文中或宿主細胞內核酸分子間之序列同源性。進行具高度核苷酸序列等同

度之核酸序列部位退化確實是明智的，而本領域之技術人員可由序列比對辨別此類部位，以退化同源性部位之核酸分子，並避免生產過程中之穩定性問題。

[0089]或者，或此外，本發明核酸分子可經最佳化，以高程度表達於特定宿主細胞或個體，例如，鳥禽(例如，雞胚胎纖維母細胞、疣鼻棲鴨(*Cairina moschata*)細胞株，揭示於WO2010/130756與WO2012/001075)、哺乳類動物、酵母菌(例如，啤酒釀母菌、裂殖性酵母菌或嗜甲醇酵母菌(*Pichia pastoris*))或細菌(例如，大腸桿菌、BCG或李斯特菌(*Listeria*))。其已被確實觀察到，以一個以上密碼子編碼一給定胺基酸時，生物體之密碼子使用情形為高度非隨機，且不同宿主間之密碼子使用明顯不同。由於本發明使用之核苷酸序列大多源自細菌，其可能含有不適當之密碼子使用情形，以達到有效表達於宿主細胞，如高等真核細胞。典型而言，密碼子最佳化之進行，係將一或多個“原始”(分歧桿菌)密碼子，其對應於感興趣宿主細胞中不常使用之密碼子，置換為宿主常用之編碼相同胺基酸之一或多個密碼子。毋須置換所有不常使用之原始密碼子，因為僅部分置換即可達成增加表達之效果。此外，由嚴謹配對至最佳化密碼子之使用，可保留一些偏差，以容許引入限制酶位置於所得之核酸分子。

[0090]進一步而言，密碼子使用之最佳化，係表達於宿主細胞或個體時，核苷酸序列經由額外之修飾加以改進。舉例而言，本發明核酸分子可經修飾，以防止稀有、非最

佳化密碼子積聚於集中區段，及/或抑制或修改“負面”序列元件，其預期將負面影響表達量。此類負面序列元件包括具有非常高(>80%)或非常低(<30%) GC含量之區段；AT豐富或GC豐富之序列延伸範圍；不穩定直接或反向重複序列；RNA二級結構；及/或內部隱藏性調節元件，如內部TATA盒、chi位點、核糖體進入位點，及/或剪接供體/受體位點，但不侷限於此。

[0091]本發明包含編碼任何分枝桿菌抗原之核酸分子，其選自於如前述SEQ ID NO: 1-24之任一者之多胜肽族群。

[0092]特別感興趣的是，編碼融合多胜肽之核酸分子，其包含之胺基酸序列，與SEQ ID NO: 28-39所示之任何胺基酸序列，或其任何變體與片段(例如，編碼前述SEQ ID NO: 28-39之示範性部位之片段)，具有至少80%之等同度(例如，80%、85%、90%、95%、98%、100%)。

[0093]本發明之特別較佳實施例為針對核酸分子，其包含，或其基本組成爲，或其組成爲核苷酸序列，其與SEQ ID NO: 40-51任一者，或其任何變體與片段之核苷酸序列(例如，編碼前述SEQ ID NO: 28-39之示範性部位)，具有至少80%等同度(亦即，核酸分子於嚴謹條件下雜交於所述之核酸分子)，較有利爲至少85%等同度，較佳爲至少90%等同度，更佳爲至少95%等同度，以及更佳爲100%等同度。

[0094]本發明核酸分子之產生，可經由本領域中可得之序列數據，與本文提供之序列訊息而得。舉例而言，其可

由本領域習知之常規技術分離，例如，藉由PCR分離，及/或以傳統分子生物學方法，選殖自特定物種之分枝桿菌基因組或其基因組片段、cDNA與基因組庫，或習知之任何包含該核酸之先前技術載體。或者，本發明核酸分子亦可由自動化流程之化學合成產生（例如，由重疊之經合成寡核苷酸組合而成）。

[0095]本發明之另一實施例涉及本發明核酸分子之片段，例如，經限制性核酸內切酶與PCR產生之片段。此類片段可作為編碼相關免疫性部位之探針、引子或片段。

載體

[0096]本發明亦有關包含一或多個本發明核酸分子之載體，以及包含此類載體之組成物。

[0097]術語“載體”，如本文所述，意指一載劑，較佳為核酸分子或病毒顆粒，其含有所需之元件，可於宿主細胞或個體內輸送、增殖，及/或表達任何本文所述核酸分子。此術語包含維持用載體(選殖載體)，或於各種宿主細胞或個體內表達之載體(表達載體)、染色體外載體(例如，多拷貝型質體)，或嵌入型載體(例如，經設計以嵌入宿主細胞基因組，並於宿主細胞複製時產生額外之核酸分子拷貝子)，及穿梭載體(例如，作用於原核及/或真核宿主)與轉移載體(例如，於病毒基因組內轉移核酸分子)。針對本發明之目的，載體可為天然存在之基因來源、合成或人工，或天然與人工之基因元件組合物。

[0098]在本發明之內文中，術語“載體”必須廣泛理解為

包括質體與病毒載體。"質體載體"，如本文所述，意指可複製之DNA構築體。質體載體通常含有篩選用標記基因，使攜帶質體載體之宿主細胞於相對應之篩選藥物存在下進行篩選。許多正向與負向可篩選標記基因為本領域所習知。舉例而言，抗生素抗性基因可作為正向可篩選標記基因，其可使宿主細胞於相對應之抗生素存在下進行篩選。

[0099]術語"病毒載體"，如本文所述，意指包括至少一元件之病毒基因組，且包裝成病毒顆粒之核酸載體，或意指病毒顆粒。術語"病毒"、"病毒體"、"病毒顆粒"與"病毒載體顆粒"可互換使用，以代表病毒顆粒，其於核酸載體依據合適之條件轉導至適當之細胞或細胞株時形成，以產生病毒顆粒。在本發明內文中，術語"病毒載體"必須廣泛理解為包括核酸載體(例如，DNA病毒載體)，及其產生之病毒顆粒。術語"感染性"意指病毒載體感染與進入宿主細胞或個體之能力。病毒載體可為複製勝任型或篩選型(例如，經設計以較佳地或選擇性地於特定宿主細胞內複製)，或可為基因關閉型，以產生複製缺陷或複製損害。

[0100]在本發明內文中，適用之載體包括，但不侷限於，噬菌體、質體或黏質體載體，以表達於原核宿主細胞如細菌(例如，大腸桿菌、BCG或李斯特菌)；載體以表達於酵母菌(例如，啤酒釀母菌、裂殖性酵母菌或嗜甲醇酵母菌)；桿狀病毒載體以表現於昆蟲細胞系統(例如，Sf 9細胞)；病毒與質體載體以表達於植物細胞系統(例如，Ti 質體、花椰菜鑲嵌病毒CaMV；煙草鑲嵌病毒TMV)；以及質

體與病毒載體以表達於高等真核細胞或個體。典型而言，此類載體為商業上可購(例如，購自 Invitrogen、Stratagene、Amersham Biosciences、Promega等)，或取自存保機構如 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.)，或為許多出版物之主題，其中描述其序列、組成與製造方法，使本領域人員得以應用。

[0101]適用之質體載體代表範例包括，但不侷限於，pREP4、pCEP4 (Invitrogen)、pCI (Promega)、pVAX (Invitrogen)與pGWiz (Gene Therapy System Inc)。

[0102]適用之病毒載體之代表範例，係產生自多種不同病毒(例如，反轉錄病毒、腺病毒，腺病毒相關之病毒(AAV)、痘病毒、疱疹病毒、麻疹病毒、泡沫病毒、甲病毒、水皰性口炎病毒等)。如前面所述，術語"病毒載體"包含載體DNA、基因組DNA及其產生之病毒顆粒，尤其是感染性病毒顆粒。

[0103]在一實施例中，本發明使用之病毒載體為複製缺陷型或複製損害型，意指其無法於經投予之正常細胞(如正常人體細胞)或個體內部複製出任何顯著量(複製功能之缺陷型或損害可藉由傳統工具評估，如經由測量DNA合成，及/或非允許細胞之病毒力價)。此類複製缺陷型或損害型載體典型上需要增殖、允許細胞株，其可停止或補充該喪失/缺陷之功能。

[0104]用於本發明內文之病毒載體範例包括腺病毒載體，其具有許多良好記載之優點，可用於接種疫苗、免疫

治療、基因轉移，或用於重組型生產(欲參閱，請見“Adenoviral vectors for gene therapy”，2002, Ed D. Curiel and J. Douglas, Academic Press)。本發明之腺病毒載體可衍生自多種人類或動物來源(例如，犬、羊、猴之腺病毒等)。可使用任何血清型，尤其偏好人類腺病毒，且特別偏好亞屬C，如Ad2、Ad5、Ad6與亞屬B如Ad11、Ad34與Ad35。使用動物Ad亦可能有利，尤其偏好黑猩猩Ad，如黑猩猩Ad3與Ad63。所述之腺病毒可購自ATCC或為許多出版物之主題，其中描述其序列、組成與製造方法，使本領域人員得以應用(請見，舉例而言，US 6,136,594；US 6,133,028；WO00/50573；WO00/70071；WO2004/083418；WO2004/097016與WO2005/071093)。

[0105]較佳之複製缺陷型腺病毒載體為E1缺陷型，其中E1刪除範圍由約位置459至3328，或約位置459至3510(參照揭示於GeneBank登錄號M 73260 Ad5序列)。刪除額外之腺病毒基因組部位，以進一步改進選殖能力(全部或部分之非必須E3區段(例如，刪除範圍由約位置27867至30743)，或其他必須E2及/或E4區段，如揭示於WO94/28152與Lusky et al., 1998, J. Virol 72: 2022)。

[0106]本發明核酸分子可單獨地插入腺病毒基因組之任何位置，特別偏好插入以置換E1及/或E3區段。相對於有問題區段之天然轉錄方向，其以正向股或反向股方向置放。

[0107]特別適用於本發明內文之其他病毒載體範例，包括痘病毒載體，如禽痘載體(例如，FP9)、金絲雀痘載體(例

如，ALVAC)與牛痘病毒載體，後者為較佳。適用之牛痘病毒包括哥本哈根品系、惠氏品系、NYVAC (US 5,494,807)，與經變更之安卡拉(MVA)品系(Antoine et al., 1998, Virol. 244: 365 ; WO02/42480)，但不侷限於此。構築與生產重組型痘病毒之一般條件為本領域所習知(請見，舉例而言，WO2010/130753 ; WO03/008533 ; US 6,998,252 ; US 5,972,597與US 6,440,422)。本發明之核酸分子，較佳為插入痘病毒基因組內之非必需位點。胸苷激酶基因特別適於哥本哈根牛痘載體之插入，而 MVA 載體則刪除II或III以進行插入(WO97/02355)。

[0108]適用於本發明內文之其他病毒載體為麻疹病毒，其可取自副黏液病毒科(paramyxoviridae)家族，特別偏好麻疹病毒。多種減毒菌株為本領域可得(Brandler et al, 2008, CIMID, 31: 271 ; Singh et al., 1999, J. virol. 73(6): 4823)，例如埃德蒙斯頓A與B品系(Griffin et al., 2001, Field's in Virology, 1401-1441)、施瓦茨品系(Schwarz A, 1962, Am J Dis Child, 103: 216)、S-191或C-47品系(Zhang et al., 2009, J Med Virol. 81 (8): 1477)，但不限於此。於P與M基因間，或於H與L基因間之插入為特別適用。

[0109]用於本發明之適用載體亦包括細菌細胞，其可為野生型或突變體(例如，無毒體)。此類細菌細胞之較佳習知範例，包括無毒分枝桿菌(例如，牛分枝桿菌BCG)、乳酸菌(例如，乳酸球菌)、李斯特菌(例如，單核球增多性李斯特菌)，與其他微生物如沙門氏菌和假單胞菌，但不侷限於

此。較佳之實施例為將BCG載體導入基因組，該載體已併入編碼有如前述一或多種分枝桿菌抗原或融合多胜肽之核酸分子，此方式可使BCG載體表達此類元件。

[0110]本發明亦包含以載體(例如，質體DNA)複合至脂質或聚合物，以形成顆粒結構如微質體、脂質複合物或奈米顆粒。

[0111]依據本發明，本發明載體所含之核酸分子為適合表達於宿主細胞或個體之形式，意指前述之各核酸分子可操作地連接至適當之調節序列。如本文所用，術語“調節元件”或“調節序列”意指允許、促成或調控核酸分子於給定宿主細胞或個體內表達之任何元件，包括核酸或其衍生物(亦即，mRNA)之複製、重複、轉錄、剪接、轉譯、穩定及/或傳輸。

[0112]本領域技術人員應理解到，調節序列之選擇取決於某些因素，如載體本身、宿主細胞或個體、所希望表達之程度等。促進子尤其重要。在本發明內文中，其組成可導引核酸分子表達於許多種類之宿主細胞，或特異於某些宿主細胞(例如，肺特異性調節序列)，或經調節以反應於特定情況或外來因子(例如，溫度、營養添加物、激素等)，或依據病毒週期之間期(例如，晚或早)。亦可使用某些促進子，其於生產階段因特定情況或外來因子而受抑制，以使載體產量最佳化，並避免經表達多胜肽之潛在毒性。

[0113]適於哺乳類細胞之組成性表達之促進子，包括巨細胞病毒(CMV)立即早期促進子(US 5,168,062)、RSV促進

子、腺病毒主要晚期促進子、磷酸甘油激酶(PGK)促進子、單純疱疹病毒(HSV)-1之胸苷激酶(TK)促進子與T7聚合酶促進子，但不侷限於此。促進子如trp、lac、噬菌體促進子、tRNA促進子與醣解酵素促進子，可用於原核宿主。適用之酵母菌促進子包括金屬硫蛋白、3-磷酸甘油酸激酶，或其他醣解酵素，如烯醇酶或甘油醛-3-磷酸脫氫酶、負責麥芽糖與半乳糖利用之酵素，之促進子區段。牛痘病毒促進子可特別用於痘病毒載體之表達。代表範例包括牛痘7.5K、H5R、11K7.5 (Erbs et al., 2008, *Cancer Gene Ther.* 15: 18)、TK、p28、p11與K1L促進子，以及合成之促進子，如描述於Chakrabarti et al. (1997, *Biotechniques* 23: 1094-7；Hammond et al., 1997, *J. Virol Methods* 66: 135-8；以及Kumar and Boyle, 1990, *Virology* 179: 151-8)，及早期/晚期嵌合促進子，但不侷限於此。適於麻疹媒介表達之促進子包括可導引麻疹轉錄單元表達之任何促進子(Brandler and Tangy, 2008, *CIMID* 31: 271)，但不侷限於此。

[0114]本領域技術人員可理解的是，控制本發明核酸分子表達之調節元件可進一步包含額外之元件，用於轉錄之正確啟動、調節及/或終止(例如，polyA轉錄終止序列)、mRNA傳輸(例如，細胞核運送訊息序列)、加工(例如，剪切訊息)，以及穩定(例如，內含子及非編碼5'與3'序列)、轉譯(例如，起始子Met、三方領導序列、IRES核糖體結合位置、Shine-Dalgarno序列等)進入宿主細胞或個體，及純化步驟(例如，如本文所述之標籤)。

[0115] 在一實施例中，本發明免疫性組合物及/或融合多胜肽所呈現或編碼之分枝桿菌抗原之編碼核酸分子，係由單一載體攜帶。

[0116] 在另一實施例中，本發明免疫性組合物及/或融合多胜肽所呈現或編碼之分枝桿菌抗原之編碼核酸分子，係由二或多個載體攜帶。各載體可編碼上述之一或多個分枝桿菌抗原或一或多個融合多胜肽。基本上，二或多個載體可同時或依序授予個體。

[0117] 本發明之特定較佳實施例為針對單一載體(或病毒顆粒)，其選自於由下列組成之族群：

- i. 一載體，編碼有一融合多胜肽，其包含Rv2029、Rv2626、Rv1733與Rv0111，以及一融合多胜肽，其包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6 (示範性載體可分別編碼融合物13與4及融合體13與11)；
- ii. 一載體，編碼有一融合多胜肽，其包含Rv2029、Rv2626、Rv1733與Rv0111、一融合多胜肽，其包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6，以及一融合多胜肽，其包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807 (示範性載體可分別編碼融合物13、4與5及融合體13、11與9)；
- iii. 一載體，編碼有一融合多胜肽，其包含Rv2029、Rv2626、Rv1733與Rv0111、一融合多胜肽，其包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6，以及

- 一融合多胜肽，其包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807（示範性載體可分別編碼融合物13、4與9及融合體13、11與5）；
- iv. 一載體，編碼有一融合多胜肽，其包含Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD與Rv1733，以及一融合多胜肽，其包含Rv2029、TB10.4、ESAT-6與Rv0111 A（示範性載體可編碼融合物6與14）；
- v. 一載體，編碼有一融合多胜肽，其包含Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD與Rv1733、一融合多胜肽，其包含Rv2029、TB10.4、ESAT-6與Rv0111，以及一融合多胜肽，其包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807（示範性載體可分別編碼融合物6、14與5及融合體6、14與9）；
- vi. 一載體，編碼有一融合多胜肽，其包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6，以及一融合多胜肽，其包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807（示範性載體可分別編碼融合物9與11及融合體5與4）。

[0118]更佳為，上述之載體為MVA載體。

[0119]若有需要，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽或載體可進一步包含額外之經篩選分枝桿菌抗原之拷貝子，或額外之不同分枝桿菌菌株，如牛分枝桿菌或山羊分枝桿菌，之抗原、及/或額外之其他來源之多胜肽(亦即，異種性多胜肽)，目的為改進針對分枝桿菌感染造成或相關之

任何疾病或情況之治療或保護能力。適用之額外多胜肽包括免疫調節劑，如細胞介素與源自潛在共同感染物種(例如，HIV、HBV等)之任何其他抗原，但不侷限於此。

[0120] 依據一較佳實施例，本發明載體之形式為感染性病毒顆粒。典型而言，此類病毒顆粒之產生方法，包含下列步驟：(i)導引本發明之病毒載體至適用細胞株，(ii)於適當條件下培養該細胞株，以允許該感染性病毒顆粒之產生，(iii)由該細胞株培養液回收產生之病毒顆粒，以及(iv)任擇地純化該回收之病毒顆粒。

[0121] 當病毒載體為複製缺陷型或複製損害型時，該病毒顆粒常於允許細胞株內生產，或經由使用輔助病毒，其於運輸時補充該遺失/損害之功能。舉例而言，用於補充E1刪除型腺病毒載體之適用細胞株，包括293細胞(Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36: 59-72)及HER-96與PER-C6細胞(例如，Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9: 1909-17；WO97/00326)，或此類細胞株之任何衍生物。禽類細胞特別適於繁殖痘病毒載體，包括原代雞胚纖維母細胞(CEF)，其製備自受精卵之雞胚胎，以及鴨細胞株(例如，揭示於WO03/076601、WO2009/004016、WO2010/130756與US2011-008872)，但不侷限於此。

[0122] 感染性病毒顆粒可回收自培養基上清液及/或溶解後之細胞。其可進一步以標準技術純化(層析、超高速離心技術等)。

[0123] 本發明亦包含載體或病毒顆粒，其經修改以容許

優先標的至特定宿主細胞。標的用載體之典型特徵為，其表面存在一配體，可辨識與結合至細胞與表面暴露元件，如細胞特異性標記物(例如，經分枝桿菌感染之細胞)、組織特異性標記物(例如，肺特異性標記物)等。適用之配體範例，包括針對分枝桿菌抗原結構域之抗體或其片段。標的作用之進行，係藉由基因方式將配體插入病毒表面之多胜肽(例如，腺病毒之纖維、五殼體、pIX或牛痘 p14基因產物)。

宿主細胞與生產方法

[0124]在另一觀點中，本發明亦有關宿主細胞，其包含本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子或載體(例如，病毒顆粒)，以及包含此類宿主細胞之組成物。

[0125]如本文所用，術語“宿主細胞”應當廣泛理解為有關組織、器官或經分離細胞內之特定構造，而無任何侷限。此類細胞可為獨特型態之細胞或不同類型細胞之族群，如經培養之細胞株、原代細胞與增殖性細胞。在本發明內文中，術語“宿主細胞”包括原核細胞、低等真核細胞如酵母菌，以及其他真核細胞如昆蟲細胞、植物與哺乳類(例如，人類或非人類)細胞，及可生產本發明載體之細胞(例如，293、HER96、PERC.6細胞、CEF、鴨細胞株等)。此術語亦包括可作為或已作為本文所述載體之接受細胞及此類細胞之後代。

[0126]依據本發明之特定實施例，宿主細胞可進一步經包覆。細胞包覆技術為本領域所習知。

[0127] 本發明之又一觀點為一方法，用於重組生產本發明免疫性組合物或融合多胜肽所含或編碼之分枝桿菌抗原，其中使用本發明之載體(或感染性病毒顆粒)及/或宿主細胞。典型而言，該方法所含步驟為：(i)將載體導入適用之宿主細胞，以產生經轉染或感染之宿主細胞，(ii)於適合宿主細胞生長之條件下，體外培養該經轉染或感染之宿主細胞，(iii)回收細胞培養基，以及(iv)任擇地，自經回受之細胞及/或培養基上清液，純化分枝桿菌抗原或融合多胜肽。

[0128] 可以預期的是，本領域技術人員可理解本領域中可得之多種表達系統，以表達多胜肽，以及將載體導入宿主細胞之方法。此類方法包括顯微注射、 CaPO_4 -媒介之轉染、DEAE-聚葡萄糖媒介之轉染、電穿孔、脂染體/微脂體融合物、基因槍、轉導、病毒感染，及經由各種工具直接投予宿主生物體，但不侷限於此。該方法亦可結合傳統轉染試劑使用，如聚陽離子聚合物(例如，幾丁聚醣、聚甲基丙烯酸酯、PEI等)，與陽離子脂質(例如，DC-Chol/DOPE、transfectam、lipofectin等)，以協助核酸導入宿主細胞。

[0129] 宿主細胞可培養於傳統發酵生物反應器、培養瓶與培養皿。給定之宿主細胞可於適合之溫度、pH與氧含量下進行培養。針對此目的，本文並未企圖詳細描述本領域可得之各種原核與真核表達系統。

[0130] 在一較佳之實施例中，該方法使用大腸桿菌宿

主細胞，特別是攜帶D13原噬菌體於其基因組之大腸桿菌菌種，使T7聚合酶因乳糖或乳糖類似物(例如，IPTG：異丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷)誘發而表現。此類菌株可購自多家廠商(例如，Lucigen、Merck等)。質體導入後，經轉形之大腸桿菌細胞可於約18°C至約39°C溫度之間培養(較佳約30°C或約37°C) 6至48小時(較佳約8至約24小時)，並以適合載體篩選標記物(例如，加入抗生素)與宿主菌種(例如，於誘導劑如IPTG存在下)之傳統培養基中進行。細胞培養物經回收與溶解(例如，以界面活性劑進行化學溶解、超音波震盪等)。細胞裂解液於離心後，收集上清液與沈澱物，用於進一步分析(例如，藉由SDS PAGE)，以評估表達量及經表達材料之溶解度(例如，可溶性材料可於細胞裂解液之上清液中發現，而不溶性材料則位於包涵體中)。

[0131]經回收之分枝桿菌抗原或融合多胜肽，可任擇地以習知之純化方法純化，包括硫酸銨沉澱法、酸萃取法、凝膠電法；過濾與層析方法(例如，逆相、粒徑排阻、離子交換、親合、疏水性交互作用、氫氧磷灰石、高效能液態層析等)。所使用之條件與技術取決於某些因素如淨電荷、分子量、疏水性、親水性，並可為本領域技術人員所理解。此外，純化之程度取決於預期之用途。舉例而言，蛋白質濃度以Brandsford試驗(Biorad)分析、內毒素含量以Portable Test System (Charles River Laboratories)技術分析，且經純化多胜肽之質量以MALDI (基質輔助雷射脫附游離)電灑方法測量。

組成物

[0132] 在另一觀點中，本發明提供組成物，其包含本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體(例如，感染性病毒顆粒)，或宿主細胞(於此亦指“活性試劑”)，或其任何組合物(例如，不同多胜肽或載體/病毒顆粒之組合物)之至少一者。較佳為，組成物為醫藥組成物，其進一步包含醫藥上有效量之活性試劑、一或多種醫藥上可接受載劑。

[0133] 如本文所用，“醫藥上可接受載劑”意指包括任何與所有的載劑、溶劑、稀釋劑、賦形劑、佐劑、分散介質、塗層、抗菌與抗真菌劑，與吸收延遲劑，以及其類似物，其易於投予個體，特別是人類。

[0134] 如本文所用，“治療有效量”為足以達到預期用途之劑量。進行預防性使用時，此術語意指足以預防或延遲分枝桿菌感染(例如，*Mtb*感染)之發生，及/或確立之劑量。針對“治療”用途，係以組成物投予經分枝桿菌菌株感染之個體，目的為治療活躍期病症，或預防於潛伏期感染個體之再激活，最終為結合一或多種本文所述之傳統治療方法。特別是，治療有效量之本發明組成物可為於投藥個體身上誘發或刺激免疫系統(例如，導致發展先天及/或特定反應)所需之量。

[0135] 欲治療之個體可為新生兒、嬰兒、年輕人或成人。以本文所述之活性試劑治療前，個體可能先前進行卡介苗(BCG)免疫，或先前進行分枝桿菌感染之治療。其可能

會或可能不會共同感染另一病原生物體(例如，人類免疫缺乏病毒HIV)。

[0136]特別是，欲治療個體所感染之有毒分枝桿菌菌種(例如，*Mtb*)可能為抗藥性(例如，MDR、XDR或TDR)菌株。感染性分枝桿菌可為與本發明活性試劑所含或編碼抗原之任何來源分枝桿菌相同之菌株或分離物，或可源自不同菌株或分離物。

[0137]本發明組成物適用於緩衝液，以適度用於人類或動物之生理上或輕微鹼性pH條件值(例如，約pH 7至約pH 9)。適用之緩衝液包括磷酸鹽緩衝液(例如，PBS)、碳酸氫鈉緩衝液及/或Tris緩衝液，但不侷限於此。

[0138]本發明組成物可進一步包含適於人類或動物使用之稀釋劑。較佳為，等張、低張或弱高張，並具有相對低之離子強度。代表範例包括除菌水、生理食鹽水(例如，氯化鈉)、林格氏液、葡萄糖、海藻醣或蔗糖溶液、漢克氏液，以及其他水性生理平衡食鹽水(請見，舉例而言，最新版Remington : The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins)。

[0139]可使用額外之醫藥上可接受賦形劑，以提供所希望之醫藥上或藥物動力學上特性，其包括，舉例而言，修正或維持pH值、滲透壓、黏度、透明度、顏色、無菌性、穩定性、配方溶出率、修正，或維持釋放或吸收至人類或動物中、促進輸送通過血管屏障或穿透特定器官(例如，肺臟)。

[0140] 此外，本發明組成物可包含一或多種適合人體全身或黏膜應用之佐劑。較佳為，佐劑可刺激本發明組成物之免疫誘發能力，尤其是T細胞媒介之免疫性，例如，經由類鐸受體(TLR)，如TLR-7、TLR-8與TLR-9。適用之佐劑之代表範例包括明礬、礦物油乳劑如弗氏完全和不完全佐劑(IFA)、脂多醣或其衍生物(Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419)、皂素如QS21 (WO 98/56415)、咪唑喹啉化合物如咪喹莫特 (Imiquimod) (WO2007/147529)、胞嘧啶磷酸鳥苷寡去氧核苷酸如CpG，與陽離子性胜肽如IC-31 (Kritsch et al., 2005, J. Chromatogr Anal. Technol Biomed Life Sci 822: 263)，或其任何衍生物，但不限於此。

[0141] 本發明組成物所包括之醫藥上可接受載劑亦必須具有持續穩定性，以因應製造過程與長期之(亦即，至少一個月，較佳為至少一年)冷凍(例如， -70°C 、 -20°C)、冷藏(例如， 4°C)、室溫保存等條件。此類“長期”配方為本領域所習知(例如，WO98/02522；WO03/053463)。可以列舉，(a) 1M蔗糖、150 mM NaCl、1mM MgCl_2 、54 mg/l Tween 80、10 mM Tris pH 8.5，(b) 10 mg/ml甘露糖醇、1 mg/ml HAS、20 mM Tris，pH 7.2，與150 mM NaCl，以及(c)生理食鹽水，其特別適用於本發明組成物。

[0142] 本發明組成物可為多種形式，例如，固體、液體或經冷凍。固體(例如，經乾粉化或經冷凍乾燥)組成物可由

真空乾燥與冷凍乾燥方法取得。在一特定實施例中，本發明組成物係配製成噴霧乾燥（請見，例如，WO2010/135495），或液滴（特別偏好平均粒徑100-5000 μm 之液滴）形式於呼吸道傳輸（例如，經由吸入、鼻內或肺內途徑）。

[0143] 本發明免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，適合多種方式之投藥。任何傳統之投藥途徑皆可用於本發明內文中，包括全身、局部或黏膜途徑。

[0144] 全身投藥包括，舉例而言，皮下、皮內、肌內、靜脈內、腹膜內、血管內、動脈內注射及劃痕。注射時可使用傳統注射器與針頭，或本領域可得之任何其他適用裝置（例如，電穿孔法）。黏膜投藥包括口腔/消化道、鼻內、氣管內、肺內、陰道或直腸內途徑，但不侷限於此。呼吸道投藥之進行，可經由霧化或液滴噴霧化、噴霧，或使用適當分配器之乾粉組合物。局部投藥亦可利用透皮工具（例如，貼片與其類似物）進行。在本發明內文中，肌內、皮內與皮下途為特別較佳，同時還有鼻內、氣管內與肺內投藥。

[0145] 適當劑量可為多種參數之函數，特別是組成物所含之活性試劑、投藥方式；個體之年齡、健康狀況與體重；症狀之性質與程度；併用治療之種類；治療頻率；及/或預防或治療之需求。決定治療用適當劑量所需之精密計算，應定期由醫師依據相關情況完成。

[0146] 在用藥指示方面，含病毒載體組成物之適用劑量

為約 10^4 至約 10^{13} vp (病毒顆粒)、iu (感染性單元)或pfu (噬斑形成單位)，取決於所使用之載體與定量技術。評估樣本vp、iu與pfu數量之技術為本領域所常見。舉例而言，腺病毒顆粒(vp)數目常以測量A260吸光或HPLC決定、iu力價以定量式DBP免疫螢光決定、以及pfu則計算允許細胞感染後之斑點數目。較佳為，vp/iu比率低於100，係依據FDA準則。較佳劑量為含有約 10^5 至約 10^{12} vp之腺病毒載體(例如，約 5×10^8 、約 10^9 、約 5×10^9 、約 10^{10} 、約 5×10^{10} 或約 10^{11} vp)。以牛痘(例如，MVA)為主之組成物，其較佳劑量為約 5×10^5 至約 10^9 pfu，特佳為約 5×10^6 、約 10^7 、約 5×10^7 、約 10^8 或約 5×10^8 pfu。以麻疹為主之組成物，其較佳劑量為約 5×10^4 至約 10^7 pfu，特佳約 10^5 、 5×10^5 、 10^6 或 5×10^6 pfu。以質體載體為主之組成物，其投藥劑量可為介於10 μ g與20 mg之間，較佳為介於100 μ g與2 mg之間。蛋白質組成物之投藥劑量可為介於10 μ g與20 mg之間，較佳之組成物所含各分枝桿菌之抗原為每公斤重約0.1 mg至約2 mg。投藥之進行，可為單一劑量或某一時間間隔後之重複劑量。

[0147] 重複投藥方式(2、3、4、5、6、7、8、9、10等)，可彼此間隔一段適當時間，並以相同或不同給藥途徑，於相同或不同位置進行。此外，每次給藥可使用相同或不同之活性試劑。為了便於說明，二或三次彼此間隔約一週(例如，3至10天)之皮下給藥，特別適用於以MVA為主之組成物，而一或二次之肌內給藥，則特別適用於以Ad-、麻疹-與質體為主之組成物。於第一系列的啟動式投藥後(例如，

6個月至數年後)，進行一或多次“喚醒”投藥，以喚醒經啟動之抗分枝桿菌免疫反應。亦可能進行連續週期式投藥(例如，每週投藥之週期)，其於休停時間後重複投藥。

[0148]在一特定實施例中，投藥之進行可依據一啟動追加法，其包含連續投予一或多個啟動用組成物，以及一或多個追加用組成物。典型而言，啟動用與追加用組成物使用不同之活性試劑，皆包含或編碼至少一共同之分枝桿菌抗原、免疫性結構域或表位。啟動用與追加用組成物可藉由相同或不同之投藥途徑，投予至同一位置或其他位置。舉例而言，以多胜肽為主之組成物可經由黏膜途徑投藥，而以載體為主之則較佳經由，例如，皮下或肌內途徑注射。爲了便於說明，可考慮以活的減毒細菌(如BCG)啟動宿主反應，並追加至少一本文所述之“活性試劑”(例如，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體(例如，感染性病毒顆粒)，或宿主細胞或任何其他組合物)。

預防與治療用途

[0149]本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，較佳爲用於治療或預防分枝桿菌感染，或其造成或相關之任何疾病與病理狀況。此類用途之目的在於誘發或刺激保護性免疫反應，以對抗分枝桿菌抗原/表位。

[0150]在一實施例中，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，係用於預防有需求個體感染分枝桿菌，或延遲其感染危險之方法，尤

其是密切與發展為活動性病症之個體接觸，因此有分枝桿菌感染之危險者(例如，經由吸入TB患者所咳出潮濕液滴之桿菌傳播)。

[0151]在另一實施例中，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，係使用於經分枝桿菌菌種，尤其是 *Mtb*，感染之個體之活動性病症治療方法中，該方法包含之步驟為，投予一治療有效量之此述免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物之至少一者，至經感染且發展為活動性病症之個體中，以誘發免疫反應對抗感染性分枝桿菌菌種，因而延遲或降低發展為活動性病症之危險。

[0152]“活動性病症”意指分枝桿菌之感染具有嚴重疾病症狀。舉例而言，在人類個體，TB之特徵為一般臨床徵兆(如體重下降、無力、發燒、盜汗)、臨床徵兆，及/或症狀(如咳嗽、咳血、肺結核型胸痛)、及/或某些情況下依據感染位置(如淋巴結、骨類型、腦膜炎、泌尿生殖類型)之肺部外徵兆。

[0153]在又一實施例中，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，係使用於經分枝桿菌菌種，尤其是結核分枝桿菌潛伏性感染之個體再激活之預防或治療方法中，該方法包含之步驟為，投予一治療有效量之此述免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物之至少一者，至該潛伏性感染個體中，以誘發免疫反應對抗感染性分枝桿菌菌種，因

而預防或延遲再激活。

[0154]“潛伏性感染之個體”可理解為，個體經有毒分枝桿菌菌種(例如，*Mtb*)感染，卻未顯示疾病症狀或臨床徵兆。典型而言，潛伏性感染之個體，體內保留分枝桿菌，其未出現臨床疾病，卻保留了日後演變成臨床疾病之危險(再激活)，特別是內文中所述之免疫抑制(例如，共同感染於另一病原體如HIV，或接受免疫抑制治療，如TNF α 抑制劑)。若以任何診斷*Mtb*感染之試驗(例如，結核菌素測試、PPD反應性之芒圖氏測試、及/或IFN γ 釋出試驗)進行檢測，*Mtb*潛伏性感染之個體可預期呈現陽性。

[0155]術語“再激活”意指個體之分枝桿菌相關疾病症狀後期表現，經分枝桿菌感染測試呈陽性，但無明顯病發症狀。舉例而言，經感染個體可能發生再激活，其可能具有或不具有先前出現之活動性疾病症狀，或其經治療後足以使感染進入潛伏狀態。舉例而言，*Mtb*感染之個體先前以BCG進行免疫，或先前進行*Mtb*感染治療(例如，使用一或多個“第一線”化療藥物)。

[0156]在一特定實施例中，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，係作為BCG追加劑，以增加經接種個體之BCG疫苗接種功效。

結合化療

[0157]本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，可用於結合一或多種傳統治療，例如，一或多種有效對抗分枝桿菌感染(例如，*Mtb*

感染)之化療藥物。

[0158]化療典型上為主治醫生依據目前作法而判定。此類化療藥物之範例包括本領域中所述之抗生素，以及小型直接與間接之抑制劑分子、抗體與免疫治療藥物，但不限於此。典型而言，目前用於治療*Mtb*感染且不產生抗藥性之“第一線”抗生素化療，包括異菸酸酐、雷福黴素(亦即，利福平、利福噴丁與利福布丁)、乙胺丁醇、鏈黴素、吡吡醯胺與氟喹啉酮類。可用於治療對一或多種“第一線”治療藥物具抗藥性之*Mtb*感染之“第二線”化療藥物，包括氧氟沙星、賽普沙星、乙硫異煙胺、胺基水楊酸、環絲胺酸、胺丁卡黴素、康黴素與捲曲黴素。一或多種化療藥物一般係投予一段適當之時間，舉例而言，一或數月(例如，1、2、3、4、5、6、9或12個月)或更久。每日之投藥劑量為200至600 mg (例如，300或400 mg)，歷經範圍6至12個月之時間為適當。

[0159]在一實施例中，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，係用於減少對抗分枝桿菌(例如，*Mtb*)感染之化療時間。通常，投予本文所述之活性試劑將可增強化療效果(例如，降低臨床徵兆之時間及/或嚴重性、改進痰陰轉率等)、減少化療時間長度，及/或所使用之化療藥物數目，尤其是當感染性分枝桿菌具有抗藥性時。

[0160]依據本發明，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物，可於一或多種

化療藥物投藥之前、同時或之後投予。在一實施例中，本文所述之活性試劑係於化療投藥至少2週後投予。

[0161]在一較佳之實施例中，本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞及/或組成物，係用於誘發或增強經投藥個體之免疫反應。因此，本發明亦包含一用於誘發或刺激免疫反應以對抗分枝桿菌抗原之方法，係藉由投予個體本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞，及/或組成物。

[0162]經誘發或經刺激之免疫反應可為特異性(亦即，針對分枝桿菌表位/抗原)及/或非特異性(先天性)、體液性及/或細胞性。在本發明內文中，免疫反應較佳為針對分枝桿菌抗原/表位之CD4+或CD8+或兩者媒介之T細胞反應。

[0163]本文所述活性試劑之誘發或刺激免疫反應之能力，可使用多種本領域中標準之直接或間接試驗進行體外或體內評估。檢測與驗證亦於附屬範例中說明。

[0164]舉例而言，藉由測量NK/NKT細胞(例如，代表性與活化程度)，以進行非特異性免疫力之誘發，以及IFN相關之細胞介素及/或趨化因子產生級聯、活化TLRs與先天免疫之其他標記物(例如，Riano et al., 2012, Tuberculosis 92: 148-59)。

[0165]體液性反應之刺激能力，可藉由測定特異於至少一本文所述免疫性組合物與融合多胜肽所含或編碼抗原之抗體力價增加情形。示範性技術包括抗體結合、結合競爭及ELISA與西方墨點法，但不限於此。

[0166] 細胞免疫力之評估，舉例而言，係藉由評估免疫細胞如T淋巴細胞，其特異於至少一此述免疫性組合物與融合多胜肽所含或編碼之分枝桿菌抗原，之增加頻率。亦可藉由放射性標記法偵測細胞增生(例如，T細胞增生試驗，係藉由³H胸苷併入試驗)。偵測免疫反應之另一靈敏方法為ELISpot，其測定IFN γ 產生細胞之增加頻率。亦可由致敏個體或適當動物模式之免疫注射，評估抗原特異性T淋巴細胞之細胞毒殺能力。亦可使用常規生物試驗，進行活化型T細胞所產生之相關Th1及/或Th2細胞介素之定量(例如，藉由多參數流式細胞分析(ICS)、使用多工技術或ELISA之細胞介素型態分析等)。PCR技術亦可用於測定相關細胞介素之編碼mRNA量。本領域技術人員應理解的是，此相關細胞介素量之明顯增加或減少，可用於評估本文所述之一或多種活性試劑之免疫活性。

[0167] 最後，以適當之實驗動物，例如，小鼠、大鼠或天竺鼠，進行保護性免疫反應之體內評估(請見，Ashwin et al., 2008, Am J Resp, 39: 503-8；Acosta et al., 2011, Malays J Med, 18: 5-12)，例如，藉由測量分離自動物脾臟、肺臟或其他組織均質物之分枝桿菌菌落形成單位(cfu)減少量，其中動物預先免疫注射一或多種本文所述之活性試劑，接著感染有毒菌株之分枝桿菌菌種(例如，*Mtb*)，並與對照組實驗動物之分枝桿菌cfu，其感染相同有毒分枝桿菌菌株但未預先進行免疫注射，進行比較。治療與未治療組之間亦可評估動物存活率，以進行比較(治療組存活率之增加與保

護性免疫反應有關)。

[0168]此免疫學讀出之結果與本文所述活性試劑所提供對抗分枝桿菌感染之保護性免疫反應，有相當好的關聯性。

[0169]本發明免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞或組成物所提供之保護性反應，亦可以本文所述方法投藥之人類個體進行評估，並對照基線狀態或未處理之預期狀態。保護性反應可由醫師或其他熟習之醫護人員，使用任何相關之臨床測量加以證實，包括，例如：

- 一給定族群如華人族群，或一給定國家之移民族群之疾病發生率，及/或盛行率及/或頻率降低(例如，較低比例之新個體被診斷出分枝桿菌感染或發展為分枝桿菌感染之風險，或接受本文所述活性試劑之族群具有分枝桿菌感染之相關疾病)；
- 經治療之個體族群具有較高比例之痰陰轉率；
- 經治療之個體族群具有較高比例之治療中活動性病變；
- 緊密接觸於經感染之個體後，分枝桿菌傳播幅度下降(例如，被感染風險或發展為活動性病變之風險下降，或延緩及/或潛伏性感染個體之再激活風險下降或延緩)；
- 疾病狀態改善(例如，標的組織或生物樣本之細菌cfu減少；疾病症狀或其嚴重性降低(例如，標的器官之病變數量及/或嚴重性)，或疾病狀態穩定(未加

劇))；以及

- 經治療個體對於共同治療之反應有所改進(對於傳統化療藥物之需求、數量、時間及/或劑量下降)。

[0170] 在本發明內文中，保護性反應可為短暫性(停止投藥後數週)或持續性(數月或數年)。由於個體彼此之間臨床狀態之自然病程差異大，因此各個體於治療後毋須全部觀察到保護性反應，但應有顯著數量之個體出現反應(例如，可藉由本領域中任何統計檢測，如Tukey參數檢定、Kruskal-Wallis檢定、依據Mann與Whitney之U檢定、司徒頓t檢定、Wilcoxon檢定等，確定兩組別間之統計上顯著差異)。

[0171] 此類測量可於本文所述活性試劑投藥之前(基線)與治療期間之不同時點與停止治療後至少數(例如，12)週進行。

[0172] 用於一般指示，分枝桿菌感染與相關之疾病可藉由多種工具偵測。舉例而言，*Mtb*感染亦可由多種目前臨床上使用之方法檢測，如芒圖氏結核菌素皮膚檢測(TST)、Quantiferon檢測，及體外偵測HBHA反應(肝素結合血球凝集素；Hougardy et al., 2007；PLos One 2(10): e926)，或於ESAT6、CFP10與TB7.7之體外刺激後偵測IP10 (Ruhwald et al., 2008；Microbes Infect 9: 806-12)。個體若發展為活動性病徵，則可依現行作法偵測。為了便於說明，TB之診斷以偵測臨床標本之致病菌為主，並使用顯微鏡、培養技術、聚合酶鏈鎖反應(PCR)及其各種衍生技術。亦可進行DNA

指紋方法與間隔寡核苷酸分型法(*spoligotyping*)。分枝桿菌培養為辨別結核分枝桿菌群分離物與藥敏檢測之精準方法。亦可進行X光技術與臨床觀察，以支持活動性肺及/或肺外疾病之發現。另一方面，多種血清學試驗被建立以診斷*Mtb*感染，其使用多種抗原偵測循環抗體，包括補體結合試驗、血液凝集試驗、放射免疫分析法與酵素免疫吸附試驗(ELISA)。

抗體

[0173]在另一觀點中，本發明係有關一抗體，其選擇性地結合至本發明免疫性組合物或融合多胜肽所含或編碼之至少一分枝桿菌抗原。

[0174]如此所述，“抗體”包含任何多胜肽，其中包含抗原結合片段或抗原結合結構域，並可選擇性地結合於標的蛋白質，且不會顯著地結合至不相關之蛋白質。在某些情況下，可被理解的是，抗體結合至標的蛋白質時，儘管有某種程度交聯活性，但仍具有選擇性。典型而言，當抗體與抗原間之結合常數 K_A 高於 10^{-6} M時，被認為具有特異性。適當之結合條件，如抗體濃度、溶液離子強度、溫度、結合時間、阻斷劑濃度(例如，血清白蛋白、牛奶酪蛋白)等，可由本領域技術人員以常規技術進行最佳化。

[0175]本發明之抗體可為多株、單株、單特異性、多特異性、人類、人源化、單鏈、嵌合體、合成、重組型抗體，以及保留抗原結合能力之此類抗體之任何片段，包括Fab、F(ab')₂、Fv與scFv片段，但不侷限於此。

形成複合物，以及藉由任何適當之工具偵測及/或量化該複合物之形成。偵測標的分枝桿菌抗原之存在，為分枝桿菌感染(例如，*Mtb*)之一指標。

[0180]在另一實施例中，本發明係有關一方法，用於偵測及/或量化針對生物樣本(例如，取自分枝桿菌感染或易受感染個體之血漿、血清等)分枝桿菌之抗體，所包含之步驟為：以該生物樣本與一試劑接觸，該試劑內含本發明之任何免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、感染性病毒顆粒、宿主細胞，並於特定條件下使抗體與任何前述試劑所含或編碼之分枝桿菌抗原/表位之間形成複合物，以及藉由任何適當之工具偵測及/或量化該複合物之形成。偵測特異性抗體之存在，為分枝桿菌感染(例如，*Mtb*)之一指標。

[0181]此技術領域者可輕易測定用於本發明方法之試劑量。抗原/抗體複合物之偵測及/或定量工具，為常規且為本領域技術人員所習知。就說明目的，可能會提及墨點法、ELISA、所謂的夾層技術、競爭技術與PCR技術，特別是所謂的“即時”技術。上述試劑之用途，可輔以耦合(亦即，物理性接合)至可偵測受質。可偵測受質之範例包括各種酵素(例如，辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶)、輔基團(例如，鏈黴親合素/生物素，或抗生物素/生物素)、螢光材料(例如，繖形酮、螢光素、螢光素衍生物)、發光材料、生物發光材料(例如，發光素酶、發光素，或水母發光素)，以及放射性物質(例如， ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或

³H)。

[0182] 本發明亦有關於用於診斷分枝桿菌(例如, *Mtb*)感染之試劑套組, 在抗原試驗方面, 其包含本發明之抗體, 而在抗體試驗方面, 其包含本發明之免疫性組合物、融合多胜肽、核酸分子、載體、宿主細胞與組成物。

[0183] 所有上述提及之專利、文獻與數據庫之揭示皆完整併入本案以作為參考資料, 如同每一單獨之專利、文獻或數據庫, 特別並單獨指出併入參考資料。

【圖式簡單說明】

[0184] 圖1為附屬範例中所述之經產生與使用之各種 *Mtb* 抗原融合多胜肽示意圖。“SS”意指訊息胜肽、“TM”穿膜結構域、“F” Flag標籤、“M” Myc標籤與“H” his標籤。符號*代表 *Mtb* 抗原相對於原始型之修飾。圖中亦說明本文使用之各編號之融合多胜肽與表達用之質體載體 (pTGXXXXX)。

圖2說明了個別 *Mtb* 基因表現之西方墨點分析, 並接著以特異性抗體進行免疫偵測。2x10⁶ 個 HEK293 細胞以 Lipofectamine 2000 轉染 5 μg 之 DNA。轉染 18 小時後, 將蛋白酶體抑制劑 MG132 加入培養基。培養 48 小時後收取細胞, 並以電泳法分析細胞裂解液, 係於 10% 凝膠上以 1/1000 稀釋之兔抗血清進行免疫偵測, 以辨識 Rv2029* (圖 2A)、RPFB-Dhyb (圖 2B), 並以商業抗體辨識 ESAT-6 (圖 2C) 與 Rv2626 (圖 2D)。

圖3說明了 *Mtb* 融合物之西方墨點分析, 包含潛伏期抗

原(pTG18295, 編碼融合物編號9)、活躍期抗原(pTG18296, 編碼融合物編號10)、復甦期抗原(pTG18307, 編碼融合物編號12), 及復甦期與活躍期抗原(pTG18297, 編碼融合物編號11), 接著進行抗Flag免疫偵測。+/-代表有或無MG132。

圖4說明了*Mtb*融合物之西方墨點分析, 分別包括TB10.4 (圖4A)、Rv0569 (圖4B)與Rv2626 (圖4C)M, 接著以商業抗TB10.4抗體(ABIN361292)、抗Rv0569之兔抗血清與抗Rv2626之小鼠單株抗體 26A11進行免疫偵測。

圖5說明了動物以融合物編碼質體 pTG18266 (SS-Ag85B-TB10.4-ESAT6-TM; 圖5A)、pTG18296 (細胞質 Ag85B-TB10.4-ESAT6; 圖5B)、pTG18310、pTG18315與 pTG18308 質體混合物, 其分別編碼 Ag85B、TB10.4與 ESAT6抗原(圖5C)及pGWiz (圖5D), 進行免疫注射後所誘發 IFN γ 產生細胞之數目。於最後之DNA注射2週後, 以特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應, 再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞之免疫反應。

圖6說明了動物以融合物編碼質體 pTG18268 (SS-RPFB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6-TM ; 圖 6A)、pTG18297 (細胞質 RPFB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6; 圖 6B)、pTG18307、pTG18310、pTG18315與pTG18308 質體混合物, 其分別編碼RPFB-Dhyb、Ag85B、TB10.4與ESAT6 抗原(圖6C)及pGWiz (圖6D), 進行免疫注射後所誘發 IFN γ 產生細胞之數目。於最後之DNA注射2週後, 以特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應, 再以ELISpot IFN γ 試驗評估細

胞之免疫反應。

圖 7 說明了動物以融合物編碼質體 pTG18267 (SS-RPFB-TM；圖7A)、pTG18307 (細胞質RPFB-Dhyb；圖7B)與pGWiz (圖7C)，進行免疫注射後所誘發IFN γ 產生細胞之數目。於最後之DNA注射2週後，以特異性胜肽匯集池，包含RpfB與RpfD抗原，進行體外再刺激反應，再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞之免疫反應。

圖 8 說明了動物以融合物編碼質體 pTG18269 (SS-Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TM；圖8A)、pTG18295 (細胞質Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807；圖8B)、pTG18301、pTG18303、pTG18300、pTG18304與pTG18302質體混合物，其分別編碼Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807抗原(圖8C)及pGWiz (圖8D)，進行免疫注射後所誘發IFN γ 產生細胞之數目。於最後之DNA注射2週後，以特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞之免疫反應。

圖9說明了經純化之Rv2626 (圖9A)、RPFB-Dhyb融合物(圖9B)與TB10.4 (圖9C) 之SDS-PAGE分析。

圖 10 說明了動物以融合物編碼質體 pTG18323 (Rv2029 – Rv2626 – Rv1733 – Rv0111；圖10a)或pGWiz (圖10b)進行免疫注射後所產生之細胞免疫反應。於最後之DNA注射2週後，以特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以IFN γ ELISpot試驗評估IFN γ 產生細胞之數目。各柱狀圖代表一隻小鼠之反應(7隻小鼠/組)。

圖 11 說明了小鼠以 (a) MVATG18365 (*Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111 + RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6 W/O SS/TM*)，或 (b) MVATG18364 (*Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111 + RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6*) 進行免疫注射後所誘發之細胞免疫反應。於 MVA 注射一週後，以特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以 IFN γ ELISpot 試驗評估 IFN γ 產生細胞之數目。各柱狀圖代表個別小鼠之反應 (5 隻小鼠/組)。

圖 12 摘錄了 BALB/c 小鼠以所有 MVA 候選物進行疫苗接種之 IFN γ 反應程度，其依據 TB 疾病期或生化合理性分類。於 MVA 注射一週後，以 14 種 MTB 抗原之特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以 IFN γ ELISpot 試驗評估 IFN γ 產生細胞之數目。經偵測之反應強度以各再刺激反應之中位數值 (斑點/ 10^6 脾細胞) 增加倍數排名，其中截止值以色碼 (請見圖標範圍 -, +, ++, +++) 顯示。斜線方格意指給定之 MVA 疫苗中缺少抗原。

圖 13 說明了基因轉殖 HLA-A2 小鼠以 (a) MVATG18376 (*Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111 + RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6 + Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807*)，或 (b) 空載體 MVATGN33.1，進行免疫注射後所誘發之細胞免疫反應。於 MVA 注射一週後，以特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以 IFN γ ELISpot 試驗評估 IFN γ 產生細胞之數目。各柱狀圖代表個別小鼠之反應 (6 隻小鼠/組)。

圖 14 說明了 C3H/HeN 小鼠以 (a) MVATG18377 (*Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111 + RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-*

ESAT6 W/O SS/TM + Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807), 或**(b)**空載體MVATGN33.1, 進行免疫注射後所誘發之細胞免疫反應。於MVA注射一週後, 以特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應, 再以IFN γ ELISpot試驗評估IFN γ 產生細胞之數目。各柱狀圖代表個別小鼠之反應(6隻小鼠/組)。

圖15摘錄了HLA-A2、C57BL/6與C3H/HeN小鼠, 以所述之MVA候選物進行疫苗接種之IFN γ 反應程度。於MVA注射一週後, 以14種MTB抗原之特異性胜肽匯集池進行體外再刺激反應, 再以IFN γ ELISpot試驗評估IFN γ 產生細胞之數目。經偵測之反應強度以各再刺激反應之中位數值(斑點/ 10^6 脾細胞)增加倍數排名, 其中截止值以色碼(請見圖標範圍-、+、++、+++)**顯示**。斜線方格意指給定之MVA疫苗中缺少抗原。

材料與方法

分析方法

[0185]由可取得之文獻與數據庫中評估*Mtb*抗原之現有數據, 目的為找出可作為免疫治療疫苗之首選*Mtb*基因/抗原, 使其於自然感染過程之所有階段中提升抗TB之免疫力。

[0186]經選取抗原隨後提交至數據挖掘評分系統, 其可轉錄並比較不同來源之數據。產生一整體最終“評分”, 其反映了各抗原之價值。此評分考量了抗原之免疫潛力, 及其對於動物模式與人類之感染性挑戰保護能力(舉例而言, 人類之保護數據比動物模式之誘發免疫原性更容易評分)。一旦收集了特定抗原之所有數據, 各類別以0至5等級

評分，0為最糟之可能等級，而5為最佳。等級之選擇亦取決於數據品質(例如，實驗中使用正確之對照組、嚴格之詮釋)及數據健全性(例如，實驗進行次數、確認/支持該發現之文獻數量)。

抗原之電腦輔助生化分析

[0187]針對預期之潛在表達問題，生化與生物數據亦為最佳化表達與融合物設計之重要數據。舉例而言，蛋白質之生物功能可能會有潛在毒性，造成基因不穩定及/或載體媒介表達之安全疑慮。此外，蛋白質未折疊可影響穩定性與表達量，因為細胞降解率增高。

[0188]進行所有*Mtb*抗原之廣泛書目檢索以更好地理解與確認這類蛋白質之結構與功能。

[0189]此外，亦進行生化與生物資訊預測，以確認*MTB*抗原。生物資訊預測工具(Nielsen et al., 2007 PLoS One 2: e796; Nielsen et al., 2008, PLoS Comput Biol 4: e1000107)係用於觀察第I與II HLA分子之經預測表位。辨別這些表位區可能有利於經選取*Mtb*抗原之最佳化或促使建立以免疫為主之分析。

[0190]此外，進行廣泛性電腦輔助結構預測分析，以預測生化特性及/或生物功能，因此允許*Mtb*抗原之選取與設計(例如，是否全長之原始型可被表達或是否需要修飾)。

[0191]更具體地，

- 於蛋白質數據庫(PDB)中搜尋結構類似物。以原始參數用於BLASTP程式，進行數據庫NPS@ 3D

SEQUENCES (取自PDB)篩選。此搜尋可找到抗原或蛋白質同源性高於25% 之NMR或晶體結構。3D結構以CN3D 4.1.或PDB viewer觀察。

- 搜尋UNIPROT-SWISSPROT與TB數據庫。以一級結構為詢問項，於UNIPROT-SWISSPROT數據庫搜尋感興趣 *Mtb* 抗原之蛋白質同源物，並以BLAST搜尋NPS@。以原始參數用於BLASTP程式，進行數據庫UNIPROT-SWISSPROT之篩選；UNIPROT-SWISSPROT條目可提供蛋白質功能、結構域、潛在訊息胜肽、轉譯後修飾及參考資料等一般資訊。有關經選取 *Mtb* 抗原之一般資訊(例如，基因功能、基因間之遺傳連結、表現型與基因相關之突變、免疫原性，以及參考資料)，可以Rv蛋白質名稱為詢問項檢索TB數據庫。
- 訊息胜肽之預測：此類短型N端序列常被預測為穿膜結構域，且未存在於自然界與成熟蛋白質。某些抗原之訊息胜肽可於UNIPROT-SWISSPROT數據庫中發現，或使用signal v3.0演算法之隱藏式馬可夫模型(hidden Markov model)。
- 若同源物搜尋無結果，則進行額外之搜尋：
- 以三種不同程式(例如，dense Alignment surface (DAS)法、演算法TMHMM與TopPred0.01)預測潛在之穿膜結構域(TM)。我們觀察到，表達於病毒載體如MVA時，相對應抗原之此類疏水性TM結構域可

能會損害遺傳穩定性。

- 以PROSITE SCAN搜尋已知蛋白質模體之蛋白質結構域、家族與功能區位置。
- 以多種預測方法(即：SOPM、MLRC、HNN、DSC、PHD、PREDATOR)預測二級結構。若6種方法皆預測出，則該二級結構被視為極有可能。若6種方法中有3種預測出，則該二級結構被視為有可能。
- 疏水性群集分析(HCA)。HCA法係依據蛋白質折疊之基本特徵：親水性/疏水性二分法與蛋白質球狀結構域之疏水性密實度。以HCA繪圖分辨蛋白質序列之疏水性群集。這類群集之特徵為疏水性折疊蛋白質包埋於核心。若疏水性群集至少位於蛋白質之某些部位，則抗原被視為可能具有折疊狀態。
- 預測原始非穩定區段，以分辨未折疊區段(MetaPrDOS預測)。本分析藉由預測蛋白質未折疊區段，以補充HCA繪圖。所有區段中，高於閾值0.5者(非穩定趨勢)皆被視為蛋白質未折疊部位。應注意的是，多數情況下，蛋白質之N與C端部位在原始狀態下皆為未折疊。若此情形延伸至末端且小於10個殘基，則視為融合物之潛在連接子。
- 螺旋捲曲結構域之預測(利用COILS程式)。抗原之寡聚合狀態可影響抗原融合物之設計。若至少14個殘基之一蛋白質部分之輸出可能性數值為1，則預測為螺旋捲曲結構域。

[0192]此外，進行序列比對，以確認不同*Mtb*菌株與分離物中，經選取之*Mtb*抗原具有保留性。更精確地，各經選取抗原(示範性*Mtb*抗原係源自H37Rv菌種)間之胺基酸序列以Clustal W2 ([@.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/))進行多重序列比對，而其同等之11種其他*Mtb*菌株(臨床分離物)與牛分枝桿菌，已於蛋白質數據庫(BLASTP搜尋)中找到。其結果為，TB抗原於12種分枝桿菌菌株中顯示高度保留，其分析後之等同度比例為100%至96%，取決於抗原與分枝桿菌菌種。主要之例外可見於Rv3478，其中H37Rv與CDC1551序列之間僅出現88%等同度。

[0193]最後，進行最終TB抗原選取之另一重要標準為，確保各感染階段之抗原具有均衡之代表性。舉例而言，某些潛伏期抗原被選取，儘管其最終之數據挖掘評分低於多數之活躍期抗原。

***Mtb*抗原融合物之構築**

[0194]經設計之12種*Mtb*抗原融合物如圖1所示。有五種融合物依據生化合理性設計(融合物3、5、6、8與14)，其中融合物2、4與13之設計係有關TB之疾病階段，其中融合物2含有活躍期抗原、融合物4含有活躍期與復甦期抗原，且融合物13由潛伏期抗原組成。為了促進各種基因融合物之診斷，並避免各*MTB*抗原需要特異性抗體，以標籤序列加入各融合物，分別為Flag標籤(DYKDDDDK；SEQ ID NO: 25)位於N端，以及c-myc (EQKLISEEDL；SEQ ID NO: 26)與His (HHHHHH；SEQ ID NO: 27)標籤位於C端。

[0195]另一方面，訊息胜肽(亦稱為訊息序列或SS)與膜錨泊胜肽(亦稱為穿膜或TM胜肽/結構域)，係分別加入*Mtb*融合蛋白質之N端與C端，以確保錨泊於細胞表面，其預期可於某些情況下使免疫活性最佳化。然而，加入TM結構域對於編碼有Rv0111或Rv1733之融合物並非必要，因為這些蛋白質已具有膜錨泊胜肽。為便於比較，亦設計四種不含任何訊息序列(SS)與TM結構域之融合物，以研究細胞定位(於SS與TM胜肽存在下之膜表現情況，對比於無此類胜肽存在下之細胞質位置)對於表達量與免疫活性之影響。舉例而言，pTG18269編碼之*Mtb*抗原(Rv0569 - Rv1813* - Rv3407 - Rv3478 - Rv1807)相同於pTG18295，除了pTG18269所編碼融合物之N端具有SS，且C端Myc與His標籤之間具有TM以外，而pTG18295所編碼融合物不具此類SS與TM胜肽。

[0196]編碼有不同*Mtb*抗原與融合物之合成基因，係由Geneart (Regensburg, Germany)所合成。這些基因經最佳化，以符合人類密碼子使用，並於ATG起始密碼子前面加入Kozak序列(ACC)。此外，排除一些模體：TTTTTNT、GGGGG、CCCCC，其對於痘病毒載體之表達有害，以及AAAGGG、AAAAGG、GGGAAA、GGGGAA (與互補序列TTCCCC、TTTCCC、CCTTTT、CCCCTT)，其對於某些其他載體之表達有害。

[0197]將融合物選殖至pGWiz質體(Gelantis)，且限制酶切位設計為*NotI*與*BamH*。此質體包含經修改之CMV促進

子，接著為取自CMV立即早期基因之內含子A，以及高效能之人工轉錄終止子。

pTG18266之構築(融合物編號2)

[0198] 融合物編號2之胺基酸序列如SEQ ID NO: 28所示。胺基酸1至23對應於狂犬病毒ERA品系醣蛋白前驅物N端之訊息胜肽(描述於Genbank 編號 M38452)、胺基酸24至31對應於Flag標籤、胺基酸32至317對應於Ag85B*、胺基酸318至412對應於TB10.4、胺基酸413至506對應於ESAT6、胺基酸507至516對應於c-myc標籤、一Ser連接子、胺基酸518至583對應於源自ERA品系狂犬病毒醣蛋白之膜錨泊胜肽，以及胺基酸584至589對應於His標籤。融合物編號2之編碼核苷酸序列如SEQ ID NO: 40所示，其以合成方式產生，並將合成基因選殖至pGWiz，且限制酶切位為 *NotI* 與 *BamH1*，以取得pTG18266。

pTG18267之構築(融合物編號3)

[0199] 融合物編號3之胺基酸序列如SEQ ID NO: 30所示。胺基酸1至23對應於狂犬病毒PG品系醣蛋白前驅物N端之訊息胜肽(描述於Genbank 編號 ay009097 與 WO2008/138649之SEQ ID NO: 2)、胺基酸24至31對應於Flag標籤、胺基酸32至380對應於RPFB-Dhyb*、胺基酸381至390對應於c-myc標籤、一Ser連接子、胺基酸392至457對應於源自PG品系狂犬病毒醣蛋白之膜錨泊胜肽(WO2008/138649之SEQ ID NO: 3)，以及胺基酸458至463對應於His標籤。融合物編號3之編碼核苷酸序列如SEQ ID

NO: 42所示，其以合成方式產生，並將合成基因選殖至 pGWiz，且限制酶切位為 *NotI*與*BamHI*，以取得pTG18267。

*pTG18268*之構築(融合物編號4)

[0200]融合物編號4之胺基酸序列如SEQ ID NO: 32所示。胺基酸1至23對應於狂犬病毒PG品系醣蛋白前驅物N端之訊息胜肽(描述於Genbank 編號 ay009097)、胺基酸24至31對應於Flag標籤、胺基酸32至380對應於RPFB-Dhyb*、胺基酸381至666對應於Ag85B*、胺基酸667至761對應於TB10.4、胺基酸762至855對應於ESAT6、胺基酸856至865對應於c-myc標籤、一Ser連接子、胺基酸867至932對應於源自PG品系狂犬病毒醣蛋白之膜錨泊胜肽，以及胺基酸933至938對應於His標籤。融合物編號4之編碼核苷酸序列如SEQ ID NO: 44所示，其以合成方式產生，並將合成基因選殖至 pGWiz，且限制酶切位為 *NotI*與*BamHI*，以取得pTG18268。

*pTG18269*之構築(融合物編號5)

[0201]融合物編號5之胺基酸序列如SEQ ID NO: 34所示。胺基酸1至23對應於狂犬病毒ERA品系醣蛋白前驅物N端之訊息胜肽(描述於Genbank 編號 M38452)、胺基酸24至31對應於Flag標籤、胺基酸32至118對應於Rv0569、胺基酸119至227對應於Rv1813*、胺基酸228至325對應於Rv3407、胺基酸326至717對應於Rv3478、胺基酸718至1115對應於Rv1807、胺基酸1116至1125對應於c-myc標籤、一Ser連接子、胺基酸1127至1192對應於源自PG品系狂犬病毒醣

蛋白之膜錨泊胜肽(WO2008/138649之SEQ ID NO: 3)，以及胺基酸843至848對應於His標籤。融合物編號5之編碼核苷酸序列如SEQ ID NO: 46所示，其以合成方式產生，並將合成基因選殖至pGWiz，且限制酶切位為 *NotI*與*BamH1*，以取得pTG18269。

pTG18270之構築(融合物編號6)

[0202]融合物編號6之胺基酸序列如SEQ ID NO: 36所示。胺基酸1至23對應於狂犬病毒ERA品系醣蛋白前驅物N端之訊息胜肽(描述於Genbank 編號 M38452)、胺基酸24至31對應於Flag標籤、胺基酸32至317對應於Ag85B*、胺基酸318至459對應於Rv2626、胺基酸460至808對應於RPFB-Dhyb*、胺基酸809至956對應於Rv1733*、胺基酸957至966對應於c-myc標籤、一Ser連接子，以及胺基酸968至973對應於His標籤。融合物編號6之編碼核苷酸序列如SEQ ID NO: 48所示，其以合成方式產生，並將合成基因選殖至pGWiz，且限制酶切位為 *NotI*與*BamH1*，以取得pTG18270。

pTG18272之構築(融合物編號8)

[0203]融合物編號8之胺基酸序列如SEQ ID NO: 37所示。胺基酸1至23對應於狂犬病毒ERA品系醣蛋白前驅物N端之訊息胜肽(描述於Genbank 編號 M38452)、胺基酸24至31對應於Flag標籤、胺基酸32至317對應於Ag85B*、胺基酸318至459對應於Rv2626、胺基酸460至607對應於Rv1733*、胺基酸608至617對應於c-myc標籤、一Ser連接子，以及胺基酸619至624對應於His標籤。融合物編號8之

編碼核苷酸序列如SEQ ID NO: 49所示，其以合成方式產生，並將合成基因選殖至pGWiz，且限制酶切位為 *NotI*與 *BamH1*，以取得pTG18272。

*pTG18323*之構築(融合物編號13)

[0204]融合物編號13之胺基酸序列如SEQ ID NO: 38所示。胺基酸1至28對應於麻疹病毒F蛋白質N端之訊息胜肽(Hallé品系，描述於Genbank 編號 X05597-1)、胺基酸29至36對應於Flag標籤、胺基酸37至349對應於Rv2029*、胺基酸350至491對應於Rv2626、胺基酸492至639對應於Rv1733*、胺基酸640至932對應於Rv0111*、胺基酸933至942對應於c-myc標籤、一Ser連接子，以及胺基酸944至949對應於His標籤。融合物編號13之編碼核苷酸序列如SEQ ID NO: 50所示，其以合成方式產生，並將合成基因選殖至pGWiz且限制酶切位為 *NotI*與 *BamH1*，以取得pTG18323。

*pTG18324*之構築(融合物編號14)

[0205]融合物編號14之胺基酸序列如SEQ ID NO: 39所示。胺基酸1至28對應於麻疹病毒F蛋白質N端之訊息胜肽(Hallé品系，描述於Genbank 編號 X05597-1)、胺基酸29至36對應於Flag標籤、胺基酸37至349對應於Rv2029*、胺基酸350至444對應於TB10.4、胺基酸445至538對應於ESAT6、胺基酸539至831對應於Rv0111*、胺基酸832至841對應於c-myc標籤、一Ser連接子，以及胺基酸843至848對應於His標籤。融合物編號14之編碼核苷酸序列如SEQ ID NO: 51所示，其以合成方式產生，並將合成基因選殖至

pGWiz且限制酶切位為 *NotI*與*BamHI*，以取得pTG18324。

融合物9-12之構築

[0206]以定向突變法 (Quick Change Site-Directed mutagenesis kit, Stratagene)自質體pTG18267、pTG18269、pTG18266與pTG18268刪除目標序列，係使用適當配對之引子，OTG20188 (CGCGGCCGCACCATGGATTACAAGGATGACGACG；SEQ ID NO: 52) 與 OTG20189 (CGTCGTCATCCTTGTAATCCATGGTGCGGCCGCG；SEQ ID NO: 53)用於刪除訊息勝序列，以及OTG20190 (CATCTCAGAAGAGGATCTG-CATCATCATCATCATATTG；SEQ ID NO: 54)與OTG20191 (CAATGATGATGATGATGATGCAGATCCTCTTCTGAGATG；SEQ ID NO: 55)用於刪除TM序列。所得之質體分別為pTG18307 (融合物編號12 = 細胞質融合物編號3)、pTG18295 (融合物編號9 = 細胞質融合物編號5)、pTG18296 (融合物編號10 = 細胞質融合物編號2)與pTG18297 (融合物編號11 = 細胞質融合物編號4)，對應於胺基酸序列為SEQ ID NO: 31、35、29與33，其編碼之核苷酸序列為SEQ ID NO: 43、47、41與45。

個別*Mtb* 基因表達質體之構築

[0207] Flag序列與c-myc-His序列經*NheI*限制酶切位隔開，並將其導入pGWiz質體之CMV促進子下游。一含有CMV促進子末端、Flag與c-myc-His序列之DNA片段係由Geneart合成，並將其插入質體 FLAG_TAG_1。此質體以限制酶*PvuII*與*BglIII*切割，並將所得片段插入經相同酵素切割之

pGWiz，以取得pTG18282。Rv3407、Rv0569、Rv1807、Rv1813*、Rv3478與Rv2626等個別基因，隨後以pTG18269進行PCR放大反應，除了Rv2626以外，其以pTG18323為模板。

[0208]用於分離各TB基因之放大反應引子對係列於表1。

表1：

TB基因	引子名稱	引子序列
Rv3407	OTG20232 SEQ ID NO: 56	GATGACGACGATAAGGCTAGCAGAGCCACCGTGGGACTGG
	OTG20233 SEQ ID NO 57	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCCTGTTCATCCCGCATCTCGT
Rv0569	OTG20234 SEQ ID NO: 58	GATGACGACGATAAGGCTAGCAAGGCCAAAGTCGGCG
	OTG20235 SEQ ID NO: 59	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCTGTTCCTCTGGCGTGC
Rv1807	OTG20236 SEQ ID NO: 60	GATGACGACGATAAGGCTAGCGATTTTGCCACCCTCCCACC
	OTG20237 SEQ ID NO: 61	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGCCAGCTGCAGGAGGTCTGG
Rv1813*	OTG20238 SEQ ID NO: 62	GATGACGACGATAAGGCTAGCGCCAACGGCAGCATGAGCG
	OTG20239 SEQ ID NO: 63	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGTTGCAGGCCAGTTCACGA
Rv3478	OTG20240 SEQ ID NO: 64	GATGACGACGATAAGGCTAGCGTGGACTTCGGCGCCCTGC
	OTG20241 SEQ ID NO: 65	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGCCAGCGGCTGGAGTTCTGG
Rv2626	OTG20242 SEQ ID NO: 66	GATGACGACGATAAGGCTAGCACAACCGCCAGAGACATCATG
	OTG20243 SEQ ID NO: 67	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCAGAGGCCAGGGCCATGGGG

[0209]所得之擴增子以“*In fusion Advantage*” PCR選殖法(Clontech)選殖至pTG18282，其以*NheI*切割成線型。如此可使Tag序列融合於*Mtb*基因。所產生之質體分別命名為pTG18300 (Rv3407)、pTG18301 (Rv0569)、pTG18302 (Rv1807)、pTG18303 (Rv1813*)、pTG18304 (Rv3478)與

pTG18305 (Rv2626)。

[0210] 融合至5'端Flag與3'端c-myc-His序列之ESAT6、Rv1733*、Ag85B*、TB10-4、Rv0111*與Rv2029*等六種表達匣係由 Geneart 合成，並插入 pGWiz。其分別命名為 pTG18308 (ESAT6)、pTG18309 (Rv1733*)、pTG18310 (Ag85B*)、pTG18315 (TB10.4)、pTG18329 (Rv0111*)、pTG18317 (Rv2029*)。由於Rv1733*與Rv0111*蛋白質含有TM結構域，因此將狂犬病毒ERA品系醣蛋白前驅物N端之訊息胜肽融合至Flag序列上游以避免表達之問題。

[0211] 無論個別或融合*Mtb*基因之編碼，用於免疫注射之質體皆於無內毒素條件下產生。

重組型MVA之構築

標籤序列之刪除

[0212] 自*Mtb*抗原融合物移除標籤序列，以避免其出現於MVA載體。位於*Mtb* 融合物基因匣(亦即，Flag位於訊息胜肽與*Mtb*融合物第一個胺基酸之間，而cmyc標籤位於*Mtb*融合物最後一個胺基酸與膜錨泊胜肽之間)內之標籤序列，係以定向突變法刪除，其利用QuikChange Site-directed Mutagenesis套組(Stratagene)與下表2所示適當之引子進行。位於*Mtb* 融合物基因匣(含有細胞質融合物與His標籤)外之標籤序列，係以PCR刪除，其利用引子將起始子Met與終止密碼子加至融合物兩端。

表2

融合物	刪除Flag之引子對	刪除cmv之引子對	所得質體
4	OTG20313 (SEQ ID NO:68) OTG20314 (SEQ ID NO: 69)	OTG20315 (SEQ ID NO: 70) OTG20316 (SEQ ID NO: 71)	pTG18339
5	OTG20317 (SEQ ID NO: 72) OTG20318 (SEQ ID NO: 73)	OTG20319 (SEQ ID NO: 74) OTG20320 (SEQ ID NO: 75)	pTG18340
6	OTG20321 (SEQ ID NO: 76) OTG20322 (SEQ ID NO: 77)	NA	pTG18341
13	OTG20333 (SEQ ID NO: 78) OTG20334 (SEQ ID NO: 79)	NA	pTG18342
14	OTG20333 (SEQ ID NO: 78) OTG20334 (SEQ ID NO: 79)	NA	pTG18343

*MVATG18355*之構築(融合物編號13)

[0213]將編碼融合物編號13 (SF-Rv2029*-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*，如SEQ ID NO: 38 之1至28與37至932之部位所示)之核苷酸序列置於由p7.5K促進子(SEQ ID NO: 80；CCACCCACTTTTTATAGTAAGTTTTTCACCCATAAATAAT AAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATA TTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAAG AACAGT)調控之載體上。促進子序列係以PCR與適當之引子OTG20405 (SEQ ID NO: 81)與OTG20406 (SEQ ID NO: 82)，自哥本哈根品系VV (牛痘病毒) DNA放大取得，而融合物編號13序列係以PCR與引子OTG20407 (SEQ ID NO:83)與OTG20408 (SEQ ID NO: 84)，自質體pTG18342放大取得。隨後，以雙PCR與引子OTG20405 (SEQ ID NO: 81)與OTG20408 (SEQ ID NO: 84)，將p7.5K與融合物編號13編碼序列重新組合。將所得片段插入牛痘轉移質體pTG17960之限制酶位置*Bgl*II與*Not*I，以取得pTG18355。

[0214]MVA轉移質體pTG17960設計為可插入核苷酸序

列，以進行MVA基因組刪除區III之同源重組轉移。其源自質體pTG1E (描述於Braun *et al.*, 2000, *Gene Ther.* 7:1447)，並將側翼序列(BRG3與BRD3)選殖至MVA刪除區III兩側(Sutter and Moss, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10847)。轉移質體亦包含一融合物，其位於維多利亞管水母增強型綠色螢光蛋白質基因(*eGFP*基因，分離自pEGP-C1，Clontech)，與大腸桿菌黃嘌呤-鳥糞嘌呤磷酸核糖轉移酶基因(*gpt* 基因)之間，並以早晚期牛痘病毒合成促進子p11K7.5 (惠贈自R. Wittek, University of Lausanne)調控。黃嘌呤-鳥糞嘌呤磷酸核糖轉移酶之合成，以使GPT⁺重組型MVA生長於含有黴酚酸、黃嘌呤、次黃嘌呤之選擇性培養基(Falkner *et al.*, 1988, *J. Virol.* 62, 1849-54)，而*eGFP*有利於重組型MVA菌班之觀察。篩選標記物*eGFP-GPT*係以相同方向置於兩同源序列之間。於選殖篩選後，篩選標記物可於數代培養後去除，而無需篩選，以生成*eGFP-GPT*重組型MVA。

[0215]以MVA感染之原代雞胚纖維母細胞(CEF)核轉染pTG18355 (依據Amaya Nucleofector技術)，其進行同源重組以產生MVATG18355。於含有黴酚酸、黃嘌呤、次黃嘌呤之選擇性培養基生長後，以斑點純化法進行病毒篩選。如前面所述，篩選標記物隨即於非選擇性培養基培養數代後去除。以PCR確認親代MVA不含雜質。

*MVATG18364*之構築(融合物編號13 + 融合物編號4)

[0216]將編碼融合物編號4 (SR-RPFB-Dhyb*-Ag85B*-

TB10.4-ESAT6-TMR，為SEQ ID NO: 32之一部份，由位置1至23、32至855與866至932)之核苷酸序列，置於由pH5R促進子(SEQ ID NO: 85, TTTATTCTATACTTAAAAAATGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTTCATTATCGCGATATCGTTAAGTTTG)調控之載體上，其以PCR與引子對OTG20445 (SEQ ID NO: 86)與OTG20446 (SEQ ID NO: 87)選殖自野生型MVA基因組DNA。經放大之產物以*NotI*與*PacI*切割。融合物編號4編碼序列係以PCR與OTG20447 (SEQ ID NO: 88)與OTG20380 (SEQ ID NO: 89)引子，自pTG18339放大。經放大之產物以*PacI*與*XhoI*切割。兩片段皆選殖至限制酶切位*NotI*與*XhoI*之pTG18355，以取得pTG18364。

[0217]於CEF進行前述之同源重組，以產生MVATG18364。

*MVATG18365*之構築(融合物編號13 + 融合物編號11)

[0218]將編碼融合物編號11 (RPFB-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6，為SEQ ID NO: 33之一部份，由位置10至位置833，前接位置1之Met起始子)之核苷酸序列，置於由pH5R促進子調控之載體上。促進子係取自pTG18364，使用PCR與OTG20445 (SEQ ID NO: 86)與OTG20446 (SEQ ID NO: 87)引子，且經放大之片段以限制酶*NotI*與*PacI*切割。融合物編號11編碼序列係選殖自pTG18297，使用PCR與引子對OTG20448 (SEQ ID NO: 90)與OTG20382 (SEQ ID NO:

91)，且經放大之產物以限制酶 *PacI* 與 *XhoI* 切割。兩片段皆選殖至限制酶切位 *NotI* 與 *XhoI* 之 pTG18355，以取得 pTG18365。

[0219] 於 CEF 進行前述之同源重組以產生 MVATG18365。

MVATG18376 之構築(融合物編號13 + 融合物編號 4 + 融合物編號5)

[0220] 將編碼融合物編號 5 (SR-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR，為 SEQ ID NO: 34 之一部份，由位置 1 至 23、32 至 1115 與 1126 至 1192) 之核苷酸序列，置於由 B2R 促進子 (SEQ ID NO: 92, TATATTATTAAGTGTGGTGTGGTTCGATGTAAAATTT-TTGTCGATAAAAATTAATAACTTAATTTATTATTGATCTCGTGTGTACAACCGAAATC) 調控之載體上。促進子係以 PCR 與引子對 OTG20469 (SEQ ID NO: 93) 與 OTG20470 (SEQ ID NO: 94)，自 VV Western Reserve 品系 DNA 上放大，且經放大之片段以限制酶 *XhoI* 與 *NheI* 切割。融合物編號 5 編碼序列係以引子對 OTG20472 (SEQ ID NO: 95) 與 OTG20473 (SEQ ID NO: 96)，自 pTG18340 放大，再以限制酶 *NheI* 與 *BamHI* 切割。兩經切割片段皆選殖至 *XhoI* 與 *BamHI* 可線型切割之 pTG18364，以取得 pTG18376。

[0221] 於 CEF 進行前述之同源重組以產生 MVATG18376。

MVATG18377 之構築(融合物編號13+ 融合物編號11 +

融合物編號5)

[0222] B2R 促進子係以上述之引子對 OTG20469 與 OTG20470，自 pTG18376 放大，並經 *Xho*I 與 *Nhe*I 限制酶切割。編碼融合物編號 5 (SR-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR) 之核苷酸序列係以上述方式放大，並選殖至 B2R 促進子調控，且 *Xho*I 與 *Bam*HI 可線型切割之 pTG18364，以取得 pTG18377。

[0223] 於 CEF 進行前述之同源重組以產生 MVATG18377。

MVATG18378 之構築(融合物編號13+ 融合物編號4 + 融合物編號9)

[0224] 編碼融合物編號 9 (Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807，為 SEQ ID NO: 35 之一部份，由位置 10 至位置 1093，前接位置 1 之 Met 起始子) 之核苷酸序列係以 PCR 與引子對 OTG20483 (SEQ ID NO: 97) 與 OTG20474 (SEQ ID NO: 98)，自 pTG18295 放大。經放大之產物係以限制酶 *Nhe*I 與 *Bam*HI 切割，其與經限制酶 *Xho*I 與 *Nhe*I 切割之 B2R 促進子 (如前述，放大自 pTG18376)，一同選殖至 *Xho*I 與 *Bam*HI 可線型切割之 pTG18364，以取得 pTG18378。

[0225] 於 CEF 進行前述之同源重組以產生 MVATG18378。

MVATG18379 之構築(融合物編號13+ 融合物編號11 + 融合物編號9)

[0226] 編碼融合物編號 9 (Rv0569-Rv1813*-Rv3407-

Rv3478-Rv1807)之核苷酸序列與B2R促進子皆以上述方式放大，並一同選殖至 *XhoI* 與 *BamHI* 可線型切割之 pTG18365，以取得pTG18378。

[0227]於 CEF 進行前述之同源重組以產生 MVATG18379。

*MVATG18404*之構築(融合物編號14 + 融合物編號6)

[0228]編碼融合物編號 14 (SF-Rv2029*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*，為SEQ ID NO: 39之一部份，由位置1至28以及位置 37至 831)之核苷酸序列係以PCR與引子對 OTG20407 (SEQ ID NO: 83)與OTG20525 (SEQ ID NO: 99)，自pTG18343放大。p7.5K促進子係取自 pTG18355，使用PCR與OTG20524 (SEQ ID NO: 100)與OTG20406 (SEQ ID NO: 82)引子。融合物編號14編碼序列隨後以雙PCR與引子對OTG20524 (SEQ ID NO: 100)與OTG20525 (SEQ ID NO: 99)，選殖至經p7.5K促進子調控之載體。所得之片段經 *BamHI*與*NotI*限制酶切割，並插入限制酶切位 *BglII*與*NotI*之牛痘轉移質體pTG17960，以取得pTG18395。

[0229]編碼融合物編號 6 (SS-Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb*-Rv1733*，為SEQ ID NO: 36之一部份，由位置1至23與32至956)之核苷酸序列，係以PCR與引子對 OTG20527 (SEQ ID NO. 101)與OTG20376 (SEQ ID NO: 102)，自 pTG18341放大，且經放大之產物以限制酶 *PacI*與 *XhoI* 切割。pH5R促進子以上述方式自pTG18355放大，並以限制酶 *NotI*與 *PacI* 切割。兩經切割片段皆選殖至 *NotI*與 *XhoI* 可線型

切割之pTG18395，以取得質體pTG18404。

[0230]於 CEF 進行前述之同源重組以產生 MVATG18404。

*MVATG18417*之構築(融合物編號14 + 融合物編號6 + 融合物編號5)

[0231]將編碼融合物編號5 (SR-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR)之核苷酸序列，置於由B2R促進子，其取自經限制酶*XhoI*與*BamHI*切割之pTG18376，調控之載體上。將所得片段插入經相同酵素切割之pTG18404，以取得pTG18417。

[0232]於 CEF 進行前述之同源重組以產生 MVATG18417。

*MVATG18418*之構築(融合物編號14 + 融合物編號6 + 融合物編號9)

[0233]將編碼融合物編號9 (Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807)之核苷酸序列置於由B2R促進子，其取自經限制酶*XhoI*與*BamHI*切割之pTG18379，調控之載體上。將所得片段插入經相同酵素切割之 pTG18404，以取得pTG18418。

[0234]於 CEF 進行前述之同源重組以產生 MVATG18418。

生產與蛋白質純化

[0235]以四種大腸桿菌菌株進行檢測，以表達個別之 *MTB* 抗原。所有菌株皆於其基因組內攜帶DE3原噬菌體，允

許其藉由乳糖或乳糖類似物(亦即，IPTG)誘發表達T7聚合酶。四種菌株分別為B121(DE3) (Lucigen)，典型之蛋白質表達菌株、C41(DE3) (Lucigen)，用於有毒蛋白質之表達、B121(DE3) Rosetta (Merck Chemical)，用於密碼子使用不同於大腸桿菌之蛋白質表達，以及C43(DE3) (Lucigen)，用於表達含有穿膜胜肽(例如，Rv1733)之蛋白質。此外，以三種不同溫度與生產時間進行檢測，以最佳化抗原產量。

表達試驗以決定最佳條件

[0236] 以編碼*Mtb*抗原之質體使各大腸桿菌菌株轉型，進行量產。自新鮮轉型培養盤上挑選五個菌落，接種於含有安比西林之50 ml LB (Luria Broth)培養基，並使其於37°C之搖晃下生長至隔日。以預培養樣本接種於含自動誘發培養基(AI培養基包含葡萄糖/乳糖與抗生素；Studier, 2005, Protein Expr Purif. 41: 207-34)之瓶中，並隨即於18°C、30°C與37°C下分別培養24、8與8小時。培養結束時，細胞培養液以吸光值600 nm測量並離心收取。將細胞沈澱物再懸浮於PBS中，並於超音波裂解細胞之前，各培養條件皆以OD 600 nm調整至約50。細胞裂解液隨後於4°C下以10,000 g離心10分鐘，並將上清液與沈澱物樣本(典型上10 µL)載入SDS-PAGE，以評估最佳條件。

MTB抗原之生產與純化

[0237] 含有His標籤之*Mtb*抗原純化，係以生長於2L培養瓶之500 mL培養物應用前述之最佳化條件進行。細胞以離心收取，並將250 mL培養物之沈澱物保存於-20°C直到使

用。將收取之細菌再懸浮於PBS或胍溶液中，其取決於抗原之溶解度、投入超音波震盪以裂解細胞、並以IMAC親合層析法純化，係依據供應商建議，以原始或變性條件填入Ni瓊脂糖6速流樹脂(GE Healthcare；reference 17-5318)。利用增加咪唑(50 mM、100 mM與250mM)濃度以沖提出蛋白質。將含有純蛋白質之分液匯集，並透析至PBS或尿素，其取決於抗原溶解度。

蛋白質確認

[0238] 進行多種檢測，以評估經純化*Mtb*抗原於經沖提分液中之量與質。

[0239] 以購自 Charles River Laboratories 之 Portable Test System (PTS) 測定內毒素含量。依據製造商建議，使用偵測範圍0.005至0.5 EU/mL之盒匣。

[0240] 依據製造商建議，以Bradford試驗(Bioroad)測定蛋白質濃度。以稀釋於樣本緩衝液之牛血清白蛋白(BSA)作為標準品。

[0241] 於SDS-PAGE (4-12% Invitrogen)上，利用電泳分析法評估經沖提分液與經透析溶液之純度。

[0242] 以MALDI (基質輔助雷射脫附/游離)或電灑法測定經純化蛋白質之質量。比較經測定與計算之質量，以確認蛋白質是否完整。以胰蛋白酶消化後之胜肽質量測定，檢查蛋白質於溶液或凝膠層帶中之等同度。以MALDI及/或液相層析耦合串聯質譜法(LC/MS/MS)測定胜肽質量。比較經測定與計算之胜肽質量，以確認蛋白質之等同度。

針對*MTB*抗原之抗體生產

[0243]以兩種不同抗原特異性胜肽(Eurogentec; Seraing, Belgium)之混合物，進行飼兔之免疫注射後，產生針對不同*Mtb*抗原之抗體。此類15或16個胺基酸殘基之胜肽係於運行表位B預測程式後選出。飼兔於第0天與三追加日第7、10與18天之兩種特異性胜肽免疫注射後，產生Rv1733*、Rv2029*、Rv0569、Rv1807、Rv0111、RPFB-Dhyb*、Rv1813*與Rv3407抗原之抗血清。於第一個胜肽注射日與第21天取得血液樣本。飼兔於第29天進行最終採血。在Rv3478方面，飼兔於第0、22、49與77天以兩個特異性16 mer胜肽進行免疫注射。於第一次胜肽注射前與第31與59天取得血液樣本。飼兔於第87天進行最終採血。

[0244]以ELISA分析，其使用特異性胜肽，以及西方墨點法分析，其使用個別*Mtb*基因表達質體，評估最終之血清。

Mtb 融合蛋白質之體外檢測

DNA 媒介之表達產物之西方墨點分析

[0245]利用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen ; #11668-019)，將5 μ g之各種編碼*Mtb*抗原融合物之質體或個別之基因，轉染2x10⁶ HEK293細胞，並於轉染後18小時將蛋白酶體抑制劑MG132 (10 μ M)加入生長培養基。以pGWIZ質體作為陰性對照組。於48小時後，將培養基移除，並以每盤450 μ L之Tris-Glycin-SDS 2X緩衝液(參考LC2676 ; Novex)，其內含 β -巰基乙醇(5 % v:v)，進行細胞裂解。裂解液隨後進行超音波震盪，並於95 °C下加熱5分鐘。以30微

升之細胞裂解液進行電泳分析，係載入由Criterion Precast凝膠系統(Biorad)預製之10% Criterion凝膠中。於電泳後，將蛋白質轉移至PVDF薄膜(Macherey Nagel, 741260)。以1/500稀釋之單株抗Flag M2過氧化酶(HRP)抗體(Sigma；#A8592)或1/5000稀釋之單株抗His過氧化酶抗體(Invitrogen；#R931-25)，進行免疫偵測。以ImmunStar WesternC套組(Biorad, ref 170.5070)進行免疫複合物之顯影。

[0246]飼兔於免疫注射後所得之血清(1/1000稀釋)，如前面所述，亦用於Rv1733*、Rv2029*、Rv0569、Rv1807、Rv0111*、Rpf-B-D、Rv1813*、Rv3407與Rv3478之西方墨點法偵測。分別以商業上抗體偵測ESAT6、Ag85B*、TB10.4與Rv2626、小鼠單株抗體HYB076-08 (Santa-Cruz；#sc-57730, 1/500稀釋)偵測ESAT6、兔多株抗血清NR-13800 (BEI, 1/5000稀釋)偵測Ag85B*、小鼠單株抗體26A11 (Lifespan-Biosciences；#LS-C91052, 1/1000稀釋)偵測Rv2626及多株兔抗體ABIN361292 (Antibodies-online, 1/1000稀釋)偵測TB10.4。

MVA媒介之表達產物之西方墨點分析

[0247]各種MVA產生之*Mtb*抗原融合物，以MOI 1感染 10^6 A549細胞，並於感染後30分鐘將蛋白酶體抑制劑MG132 (10 μ M)加入生長培養基。以MVATGN33.1空載體作為陰性對照組。於24小時後，將培養基移除，並以每盤300 μ L之Tris-Glycin-SDS 2X緩衝液(參考LC2676；Novex)，其

內含 β -巰基乙醇(5 % v:v)，進行細胞裂解。裂解液隨後進行超音波震盪，並於95 °C下加熱5分鐘。以20微升之細胞裂解液進行電泳分析，係載入由Criterion Precast凝膠系統(Biorad)預製之4-15% Criterion凝膠中。於電泳後，將蛋白質轉移至PVDF薄膜(Trans-blot® Turbo™ Transfer System (#170-4155, Biorad))。以*Mtb*特異性抗體進行免疫偵測，如前述有關DNA質體之表達產物。以ImmunStar WesternC套組(Biorad, ref 170.5070)進行免疫複合物之顯影。

以小鼠模式進行免疫原性之評估

DNA 免疫注射方法

[0248]以融合物編碼質體，或包含於融合物中之個別*Mtb*抗原編碼質體之混合物，進行間隔2或3週之小鼠三次免疫注射。以100 μ g DNA溶於100 μ L除菌PBS中，並經由肌內途徑注射於脛骨前肌。於最終DNA注射後2週，以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞免疫反應。

MVA 免疫注射方法

[0249]於BALB/c、基因轉殖HLA-A2、C57BL/6與C3H/HeN小鼠中，評估MVA TB候選物之免疫原性。各MVA載體係溶於100 μ L之經Tris-HCl緩衝且含有蔗糖之緩衝液中，並以 1×10^7 pfu劑量經由皮下注射於尾巴根部。於MVA注射後7日，以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞免疫反應。

胜肽庫

[0250]經免疫小鼠之脾細胞係以一胜肽庫進行體外再刺激反應。更精確地，涵蓋前述融合物之所有14種*Mtb*抗原

之679種胜肽(15個殘基長度，由11個胺基酸重疊而成)被合成出(ProImmune)。以DMSO配製胜肽匯集池，其最終濃度為1 $\mu\text{mol/L}$ 。欲涵蓋各*MTB*抗原之全長，需要1至4個匯集池。

[0251]Rv1733涵蓋於2個18與17種胜肽之匯集池。匯集池1：18種胜肽，其涵蓋Rv1733殘基62至144；匯集池2：17種胜肽，其涵蓋Rv1733殘基134至210。

[0252]Rv2029涵蓋於4個19種胜肽之匯集池。匯集池1：19種胜肽，其涵蓋Rv2029殘基1至87；匯集池2：19種胜肽，其涵蓋Rv2029殘基77至163；匯集池3：19種胜肽，其涵蓋Rv2029殘基153至239；匯集池4：19種胜肽，其涵蓋Rv2029殘基229至314。

[0253]Rv0569涵蓋於1個20種胜肽之匯集池，其涵蓋Rv0569殘基1至88。

[0254]Rv1807涵蓋於4個匯集池，前3個匯集池各含有25種胜肽，且第四個匯集池有22種胜肽。匯集池1：25種胜肽，其涵蓋Rv1807殘基1至111；匯集池2：25種胜肽，其涵蓋Rv1807殘基101至211；匯集池3：25種胜肽，其涵蓋Rv1807殘基201至311；匯集池4：22種胜肽，其涵蓋Rv1807殘基301至399。

[0255]Rv0111涵蓋於4個匯集池，前3個匯集池各含有20種胜肽且第四個匯集池含有19種胜肽。匯集池1：20種胜肽，其涵蓋Rv0111殘基361至451；匯集池2：20種胜肽，其涵蓋Rv0111殘基441至531；匯集池3：20種胜肽，其涵蓋Rv0111殘基521至611；匯集池4：19種胜肽，其涵蓋

Rv0111殘基601至685。

[0256] RpfB-Dhyb涵蓋於4個匯集池，前3個匯集池各含有22種胜肽且第四個匯集池含有19種胜肽。匯集池1：22種胜肽，其涵蓋RpfB殘基30至127；匯集池2：22種胜肽，其涵蓋RpfB殘基117至215；匯集池3：22種胜肽，其涵蓋RpfB殘基205至284與RpfD殘基53至71；匯集池4：19種胜肽，其涵蓋RpfD殘基61至146。

[0257] Rv1813涵蓋於1個25種胜肽之匯集池，其涵蓋Rv1813殘基34至143。

[0258] Rv3407涵蓋於1個22種胜肽之匯集池，其涵蓋Rv3407殘基1至99。

[0259] Rv3478涵蓋於4個24種胜肽之匯集池。匯集池1：24種胜肽，其涵蓋Rv3478殘基1至107；匯集池2：24種胜肽，其涵蓋Rv3478殘基97至203；匯集池3：24種胜肽，其涵蓋Rv3478殘基193至299；匯集池4：24種胜肽，其涵蓋Rv3478殘基289至393。

[0260] Rv2626涵蓋於2個17與16種胜肽之匯集池。匯集池1：17種胜肽，其涵蓋Rv2626殘基1至79；匯集池2：16種胜肽，其涵蓋Rv2626殘基69至143。

[0261] Ag85B涵蓋於3個23種胜肽之匯集池。匯集池1：23種胜肽，其涵蓋Ag85B殘基39至141；匯集池2：23種胜肽，其涵蓋Ag85B殘基131至233；匯集池3：23種胜肽，其涵蓋Ag85B殘基223至325。

[0262] ESAT-6涵蓋於1個21種胜肽之匯集池，其涵蓋

ESAT-6殘基1至95。

[0263]TB10.4涵蓋於1個21種胜肽之匯集池，其涵蓋TB10.4殘基1至95。

*IFN γ ELISpot*試驗

[0264]收集經免疫注射小鼠之脾細胞，並裂解紅血球(Sigma, R7757)。以三重複將每孔 2×10^5 細胞培養於塗布抗小鼠IFN γ 單株抗體(BD Biosciences; 10 μ g/mL, 551216)之Multiscreen培養盤(Millipore, MSHA S4510)中40小時，所使用之 α MEM培養基(Gibco, 22571)內含10% FCS (JRH, 12003-100M)、80 U/mL盤尼西林/ 80 μ g/mL鏈黴素(PAN, P06-07-100)、2 mM L-麩醯胺酸(Gibco, 25030)、1x非必需胺基酸(Gibco, 11140)、10 mM HEPES (Gibco, 15630)、1 mM 丙酮酸鈉(Gibco, 31350)與50 μ M β -巰基乙醇(Gibco, 31350)，並加入10單位/mL之重組型鼠IL2 (Peprotech, 212-12)，以及陰性對照組、或者：

- 前述之胜肽匯集池，最終濃度為1 μ mol/L。
- 5 μ g/ml之伴刀豆球蛋白A (Sigma, C5275)以作為陽性對照組。
- 不相關之胜肽。

[0265]IFN γ 產生T細胞係以前述之ELISpot (細胞介素特異性酵素免疫斑點分析)試驗進行量化(Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76: 12735-46)。以平均值顯示所得之三重複結果。陽性觀察反應(或截止值)之實驗用閾值，係以計算單獨培養基之斑點平均值 + 2個標準差，以取得一閾值，並

以 10^6 細胞報導。連結於CTL ELISpot盤讀儀之技術性截止值亦定義為50斑點/ 10^6 細胞(其為設定值，高於該值時，盤讀儀之CV (變異係數)將系統性地低於20%)。ELISpot反應之統計分析係以 Kruskal-Wallis 檢測進行，並以 Mann-Whitney檢測計算顯著差異。P值等於或小於0.05將被視為具有顯著差異。

含MTB抗原之疫苗對於結核分枝桿菌感染小鼠之治療功效評估

[0266]雌性 C57BL/6 小鼠(6至8週大)於第0週，以 Henderson裝置併合 Aero控制單元施加氣溶膠(Hartings et al., 2004, J Pharmacol Toxicol Methods 49: 39-55)。結核分枝桿菌施加菌株H37Rv (NCTC 7416)係培養於恆化培養箱 (James et al., 2000, J Appl Microbiol 88: 669-77)，以柯立森霧化器(Collison nebulizer)產生 $2\ \mu\text{m}$ 粒徑之細微顆粒，並直接送至動物鼻口。柯立森霧化器內之懸浮粒子經調整以傳送各組小鼠一估計吸入劑量約100 CFU/肺。

[0267]小鼠於感染後第10與14週，以MVATG18364、MVATG18376或MVATG18377皮下注射於尾巴根部一固定位置(10^7 pfu/100 μL /小鼠)。一組小鼠注射MVATGN33.1以作為陰性對照組(10^7 pfu/100 μL /小鼠)。

[0268]小鼠每週處理異菸酸酐(INH, 25 mg/kg體重)與利福噴丁(RIF, 10 mg/kg體重)一次，係以胃灌流10週，由第6週至第15週(方法改編自Aagaard et al., 2011, Nat Med, 17: 189-194)。於第6週之藥物處理前犧牲5小鼠。

[0269]於結束抗生素處理時(感染後15週)犧牲各組五隻小鼠，以確定治療期結束後之清除率，其餘則於第21週執行。於無菌條件下取出器官(例如，脾臟)、解剖時冷凍並進行細菌負載分析。器官均質物樣本之系列稀釋物置於7H11 Middlebrook OADC選擇性培養基，並培養3週以計數存活之分枝桿菌(CFU)。細菌負載數據以Log10總菌落形成單位(CFU)表示。

[0270]以Mann-Whitney檢測進行MVA候選物療效之比較與排序。*P*值小於0.05者被視為具有顯著差異。

結果

範例1：免疫性組合物適用之*Mtb*抗原之篩選

[0271]*Mtb*基因組表達約4000個基因，但是與*Mtb*生命週期功能與角色相關之大多數基因仍未被確認。如材料與方法中所述，自可取得文獻與數據庫中調查*Mtb*抗原之現有數據，目的在於自*Mtb*基因組中找出最適用之基因/抗原，以提供能於所有自然感染階段中引發抗TB免疫性之免疫治療疫苗。

[0272]這些書目分析允許“預篩選出”隸屬所有三感染階段之33種*Mtb*抗原，即7種活躍期抗原、5種復甦期(Rpf)抗原與19種潛伏期抗原及兩種PE/PPE 抗原。

- 活躍期抗原：ESAT-6 (Rv3875)、CFP-10 (Rv3874)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85A (Rv3804)、Ag85B (Rv1886) 與兩種“類ESAT-6抗原”(Rv3620與Rv3619)；
- 兩種PE/PPE抗原(Rv2608與Rv3478)，其與致病力有關。

- 復甦期抗原：預篩選出5種現有 Rpf 基因 (RpfA (Rv0867c)、RpfB (Rv1009)、RpfC (Rv1884c)、RpfD (Rv2389)、RpfE (Rv2450c))。Rpf 為分泌型或膜結合型細胞溶素酶，其表達為潛伏細胞之復甦所需。
- 自現有150種潛伏期基因中預篩選出19種潛伏期。更精確地，有12種屬於DosR調節子，其中有45個基因於潛伏期間表達增加，而另外5種篩選自培養期間可受調控之基因，其被認為類似*Mtb*於體內之潛伏期狀態。依據最近報導之前臨床與早期臨床階段數據，亦篩選出三種潛伏期抗原 (Bertholet et al., 2008, *J. Immunol.* 181: 7948-57; Bertholet et al., 2010, *Sci Transl Med* 2: 53ra74, Mollenkopf et al., 2004, *Infect Immun* 72: 6471-9)。總之，19種預篩選出之潛伏期抗原為 Rv1733c、Rv2029c、Rv1735、Rv1737、Rv2628、Rv0569、Rv2032、Rv2627c、Rv0111、Rv3812、Rv1806、Rv1807、Rv0198、Rv2626、Rv0081、Rv2005c、Rv2660、Rv3407與Rv1813。

[0273] 接著，進行第二輪篩選以排序33種預篩選 *MTB* 抗原。*Mtb* 抗原之第二輪篩選係依據數據挖掘篩選法 (請見材料與方法)，反映其免疫性與保護性潛力 (保留最高之評分) 及生化學預測。

[0274] 選擇以下抗原：

- 潛伏期抗原：Rv1733、Rv2029、Rv0569、Rv0111、Rv1807與Rv3407。亦選擇Rv2626與Rv1813，因其

極佳之數據挖掘評分與生化學預測評分。

- 活躍期抗原：ESAT-6 (Rv3875)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85B (Rv1886)與Rv3478。必須注意的是，經預篩選之活躍期Rv3619抗原具有良好的數據挖掘評分，但作為類ESAT-6蛋白質，評分卻未優於ESAT-6本身，故未保留於列表中。另一範例中，活躍期Rv2608與Rv3478抗原具有相同之數據挖掘評分，但是Rv3478之選取係依據其於人類世代研究中之較強誘發能力。
- 復甦期抗原：RpfB與RpfD。於5種復甦期之基因產物中，有3種Rpfs (RpfB、D與E)以其數據挖掘評分後之極相似評分而脫穎而出，但是僅RpfB與D被選取，主要原因有二。第一，於5種Rpfs中，有4種之細胞與體液性反應被報導具有交叉反應性 (Yeremeev et al., 2003, *Infect Immun* 71: 4789-94)，除了RpfB以外，其於判斷後選出。第二，依據RpfB與D之間而非RpfB與E之間，其溶菌酶結構域(LD)較低序列同源性的序列分析後選取RpfD。因此假設，保留Rpfs B與D足以產生針對5種Rpfs之免疫反應。

範例2：融合物設計

[0275]進行廣泛之電腦輔助預測與文獻書目分析，以預測經選取*Mtb*抗原之生化特性及/或生物功能，如材料與方法中所述。

[0276]將選取之14種抗原候選物分成三組，其需要不同種類之分析。

- 抗原數據可得，為其於各種病毒載體之表達，亦即Ag85B ESAT-6與TB10-4於MVA (Kolilab *et al.* 2010, *Clin Vaccine Immunol* 17: 793-801)；於牛痘病毒 (Malin *et al.* 2000, *Microbes Infect* 2: 1677-85)與於腺病毒 (Mu *et al.*, 2009, *Mol Ther* 17: 1093-100；Dietrich *et al.* 2005, *J Immunol* 174: 6332-9；and Havenga *et al.* 2006；*J Gen Virol* 87: 2135-43)之表達。在這些情況中，文獻書目分析為設計序列以插入載體構築體之主要資訊來源。
- 抗原無病毒載體化數據被報導，但一致或同源於已知結構之蛋白質。在這些情況中，結構數據為設計*Mtb*序列以插入載體構築體 (Rv2626、Rv2029、RpfB、RpfD與Rv0569)之主要資訊來源。
- 抗原無病毒載體化數據被報導，且未同源於任何已知結構之蛋白質。在這些情況中，以電腦輔助生化分析與預測用於確認抗原，並設計*Mtb*序列以插入載體構築體 (Rv0111、Rv3407、Rv3478、Rv1807與Rv1813)。

Ag85B 抗原之設計

[0277] Ag85B具有一段40個殘基長度之訊息胜肽，其相同於Kolilab之MVA載體，但未存在於Malin之牛痘病毒與腺病毒構築體。由於Ag85B訊息胜肽經預測為TM結構域，發

明人建議，本發明載體構築體不保留Ag85訊息胜肽。因此，用於本文所述載體構築體之經推薦Ag85B*一級結構，可為SEQ ID NO: 20所示之胺基酸序列。

ESAT-6抗原之設計

[0278] ESAT-6與CFP-10形成雜雙體，此雜雙體交互作用預期可引發兩蛋白質折疊。單獨之ESAT-6為熔球狀，當結合於CFP10時變為螺旋-轉-螺旋。因此，ESAT-6與其同伴結合時，可能比其單獨表現時更穩定。因此，用於本文所述載體構築體之經推薦ESAT-6一級結構，可為一全長之蛋白質(胺基酸序列如SEQ ID NO: 14所示)，且最終未加入起始子Met (例如，若位於融合物內部位置)。

TB10-4 (Rv0288)之設計

[0279] TB10-4屬於ESAT-6蛋白質之相同家族。TB10-4之NMR結構顯示可與Rv0287形成雜雙體複合物，預期可穩定其結構。無文獻報導以痘病毒表達TB10-4，而TB10-4全長之表達則報導於腺病毒載體，其形式為融合於Ag85A或Ag85B之C端部位。在此基礎上，用於本文所述載體構築體之經推薦TB10.4一級結構，可為一全長之蛋白質(胺基酸序列如SEQ ID NO: 2所示)，且最終未加入起始子Met。

Rv2626之設計

[0280] Rv2626之結晶(Sharpe et al., 2008, J Mol Biol 383: 822-36)顯示，其以同型雙體表達，並伴隨次單元內部與之間之雙硫鍵結。Rv2626無訊息胜肽被預測出。由於Rv2626具有極佳之折疊，用於本文所述載體構築體之經推

薦Rv2626一級結構，可為一全長之蛋白質(胺基酸序列如SEQ ID NO: 10所示)，且最終未加入起始子Met。

Rv0569之設計

[0281] Rv0569之結構未知，但是此蛋白質與Rv2302具有62%等同度(81%相似度)，包括76個胺基酸之重疊區段(於88個殘基中)。後者之結構已由MMR解出(Buchko et al., 2006, *Bacteriol* 188: 5993-6001)，並顯示於溶液中具有極佳之折疊構造，包含反平行之 β 折疊核心與C端之 α 螺旋。此蛋白質未有螺旋捲曲被預測出。未有習知之功能與Rv0569蛋白質有關。由於潛在之極佳折疊構造，用於本文所述載體構築體之經推薦*Mtb* Rv0569一級結構，可為一全長之蛋白質(胺基酸序列如SEQ ID NO: 3所示)，且最終未加入起始子Met。

Rv2029之設計

[0282] Rv2029之結構未知，但是此蛋白質與大腸桿菌磷酸果糖激酶-2 (pfk2)具有35%等同度，包括310個胺基酸之重疊區段(於339個殘基中)。此外，PROSCAN檢索發現一完整保留之醣激酶區段。因此，Rv2029於*Mtb*中可能具有磷酸果糖激酶活性。磷酸果糖激酶可於醣解過程中催化果糖-6-磷酸鹽之磷酸化。大腸桿菌pfk2之結構中，ATP結合型為四聚體結構，而ATP未結合型為雙體結構(酵素活性之異位調節)。在大腸桿菌酵素中，刪除C端最後4個殘基將完全抑制ATP誘導之四聚體作用。因此，為了避免Rv2029之寡聚合作用異質性(混合了雙體與四聚體形式)，建議刪除C端

部位(亦即，刪除最後25個殘基)。此外，爲了去除Rv2029之酵素活性，建議進行D265N突變(始於Met起始子之位置265，或無Met時之位置264)，其幾乎可完全去除大腸桿菌pfk-2酵素活性(Cabrera *et al.*, 2010, Arch Biochem Biophys 502: 23-30)。在此基礎上，用於本文所述載體構築體之經推薦Rv2029抗原(Rv2029*)一級結構，可爲SEQ ID NO: 21所示之胺基酸序列。

*RpfB*與*RpfD*之設計

[0283]復甦期促進因子(Rpf)爲分泌型蛋白質，其於細菌再激活時期產生(自休眠期至生長期)。結核分枝桿菌具有五種不同Rpf (A至E)，皆具有保留之催化結構域(類溶菌酶結構域)。除此結構域之外，這五種蛋白質無顯著相似性。RpfB之結構已取得約一半(殘基194-362)，且訊息胜肽被預測出(殘基1-29；Ruggiero *et al.* 2009, J Mol Biol 385: 153-62)。當表達於大腸桿菌時，全長蛋白質(無訊息胜肽)爲單體形式。

[0284]針對RpfB進行電腦輔助預測與分析，以分析無可得結構之蛋白質(30-193)部位。除了訊息胜肽以外，未有穿膜結構域被預測出。HCA繪圖、二級結構預測與原始不規則區段預測，皆發現一極佳之折疊區段30-193。螺旋捲曲預測與利用PROSCAN之習知模體搜尋，皆無任何顯著結果。

[0285]恥垢分枝桿菌復甦期試驗顯示，藤黃微球菌(*Micrococcus luteus*) Rpf之催化結構域活性，取決於復甦期

活性所需之一保留性殘基(突變體E292K；Mukamolova *et al.* 2006, *Mol Microbiol* 59: 84-98)。此外，兩殘基T315與Q347皆涉及溶菌酶之受質結合，其相同於RpfB (Cohen-Gonsaud, *et al.* 2005, *Nat Struct Mol Biol* 12, 270-3)。

[0286]此外，亦選擇設計一種RPFB-D雜交物，為RpfB分子且催化結構域以Rpfs中最多樣之催化結構域取代(亦即，RpfD催化結構域)。因此，表達於病毒載體之RPFB-D雜交物，為一種經由三個突變而催化活性相抵之雜交蛋白質(E292K、T315A與Q347A)，且無訊息胜肽。因此，用於融合物之經推薦雜交蛋白質一級結構，可為SEQ ID NO: 31所示，以RpfB殘基10至殘基283融合至RpfD殘基51至殘基147，之胺基酸序列，且最終加入起始子Met。

*Rv1807*之設計

[0287]*Rv1807*之結構未被公佈，但是以PDB數據庫之BLAST搜尋，產生僅一相符於*Mtb* PPE蛋白質(*Rv2430*)之前150個殘基之結果。PE/PPE為一大型之*Mtb*蛋白質家族(約100 PE與60 PPE成員)，其具有共同的PE (脯胺酸、麩胺酸)或PPE (脯胺酸、脯胺酸、麩胺酸)模體位於N端部位。PE蛋白質與PPE以雜雙體形式表達，且其功能未知。針對UNIPROT-SWISSPROT之BLAST搜尋出現數個相符之結果，但是其皆為額外之*Mtb* PPE，因此無法取得更多資訊。

[0288]在大腸桿菌中，可溶性PPE (*Rv2430*)或PE (*Rv2431*)明顯僅能以雜雙體形式表達(Strong *et al.* 2006, *Proc Natl Acad Sci* 103: 8060-5)。這些作者提出，*Rv1807*單

獨表達於大腸桿菌時為包涵體形式。PROSCAN搜尋未明顯產生任何符合於習知模體之結果。此蛋白質無訊息胜肽或穿膜結構域被報導或預測。HCA繪圖及二級結構預測皆發現整體蛋白質具有極佳之折疊，除了最後60-70個殘基區段以外。此外，利用原始不規則區段預測，最後60個殘基經預測為未折疊，而Rv1807之螺旋捲曲預測未產生任何明顯結果。

[0289]在ESAT6與TB10-4方面，共表達Rv1807與其同伴(亦即，Rv1806)，將可能有利於蛋白質穩定性，以及，其潛在免疫原性。錯誤折疊蛋白質之表達(單體形式)會破壞重組型載體穩定性(蛋白質毒性)。此外，Rv1807之未折疊C端部位，對於免疫原性及/或重組型病毒穩定性亦可具有不利影響。因此，用於融合物之經推薦Rv1807一級結構，可為一全長之蛋白質(SEQ ID NO: 6)。若全長之抗原遭遇問題，可使用C端最後60個殘基刪除之截短型抗原(如SEQ ID NO: 18所示)。

Rv3478之設計

[0290]Rv3478為另一PPE蛋白質。其PPE結構域係57%等同於Rv1807之PPE結構域(兩完整蛋白質間之等同度為41%)。針對UNIPROT-SWISSPROT之BLAST搜尋，產生數個相符之結果，其皆為其他*Mtb* PPE。HCA繪圖證實，所有蛋白質序列中皆存在疏水性部位。換言之，HCA繪圖未指出Rv3478之未折疊親水性區段。但是，在Rv1807方面，Rv3478之最後40至50個殘基，經預測為未折疊(依據二級結

構與原始不規則預測)。此蛋白質無訊息胜肽或穿膜結構域被報導或預測。Rv3478之螺旋捲曲預測未產生任何明顯結果。在Rv1807方面，經推薦之一級結構為一全長之蛋白質 (SEQ ID NO: 13)，或者，若遭遇問題，可使用C端最後40個殘基刪除之截短型抗原(如SEQ ID NO: 24所示)。

Rv0111之設計

[0291] Rv0111經預測為可能具有醯基轉移酶活性之膜蛋白質。經DAS、TMHMM與TopPred預測，有十個穿膜結構域，跨越殘基58至427。無訊息胜肽被預測出。二級結構經預測皆沿著一級結構產生，並伴隨一間隔449-469，其相符於經預測之原始不規則區段。Rv0111之螺旋捲曲預測未產生任何明顯結果。

[0292] Proscan分析產生四個相似性 $\geq 80\%$ 之結果：醛酮還原酶酵素位置、醯基轉移酶脂基結合位置、糖運輸蛋白質與真核載脂蛋白質。由於前三者為蛋白質前面300個殘基之結果，因此建議移除至少此部分之蛋白質，以避免任何潛在之生物活性。如此一來，亦捨棄蛋白質之大部分穿膜結構域。因此，用於病毒載體之經推薦Rv0111一級結構，可為C端蛋白質(例如，原始抗原之殘基393-685，如SEQ ID NO: 15所示)，於分泌性架構下，其僅有一TM用於細胞膜之錨泊。若遭遇表達問題，可使用無任何TM結構域之更多截斷型抗原(原始Rv0111之殘基429-685，始於SEQ ID NO: 15之殘基37)。

Rv1813之設計

[0293] Rv1813之結構未被公佈，而針對PDB之BLAST搜尋亦無符合之結果。Rv1813為一小型蛋白質(143個殘基)，其經預測含有訊息胜肽(1-32)且無穿膜結構域。在Uniprot-Swissprot 數據庫中，其未明顯同源於其他蛋白質。HCA繪圖、二級結構預測與原始不規則區段預測，皆發現其完整蛋白質具有極佳之折疊。螺旋捲曲預測未產生任何明顯結果。在TB庫中沒有功能被報導，且PROSCAN搜尋未有任何明顯相符於習知模體之結果。因此，用於病毒載體之經推薦Rv1813一級結構，可為一全長之蛋白質，且不具其訊息胜肽(殘基1至34)，其胺基酸序列如SEQ ID NO: 19所示。

Rv3407之設計

[0294] Rv3407之結構未被公佈，而針對PDB之BLAST搜尋亦無任何符合之結果。Rv3407為一小型蛋白質(99個殘基)，其於Uniprot-Swissprot 數據庫中未明顯同源於其他蛋白質。此蛋白質無訊息胜肽或穿膜結構域被報導或預測。HCA繪圖與二級結構預測皆發現其完整蛋白質具有極佳之折疊。然而，原始不規則區段預測指出，最後33個殘基可能無既定之折疊結構。此最後一項結果未符合於HCA與二級結構預測之情形，可能為MORE (“分子辨識元件”)的訊息，其可於結合至同伴蛋白質時發生折疊。就Rv3407而言，C端 α 螺旋僅於Rv3407結合至同伴時出現。螺旋捲曲預測未產生任何明顯結果。在TB庫中沒有功能被報導，且PROSCAN搜尋未有任何明顯相符於習知模體之結果。經推

薦之Rv3407一級結構，可為一全長之蛋白質(SEQ ID NO: 12)。若遭遇穩定性問題，可使用刪除C端最後33個殘基之截斷型抗原(如SEQ ID NO: 23所示)。

*Rv1733*之設計

[0295] 依據UNIPROT-SWISSPROT 與TB庫，Rv1733經預測為膜蛋白質，並伴隨兩個穿膜結構域(其亦以DAS、TMHMM與TopPred預測)。首個TM結構域經預測為訊息胜肽。除了這些穿膜結構域以外，此蛋白質之少數二級結構被預測出。HCA繪圖證實，兩穿膜螺旋間存在少數疏水性區段。最後，進行兩穿膜螺旋間之原始不規則區段(約20個殘基之長度)預測。總之，這些結果指出，穿膜結構域旁之折疊可能較鬆散。針對不含訊息胜肽之Rv1733之PROSCAN搜尋，未有任何明顯相符於習知模體之結果。Rv1733之螺旋捲曲預測未產生任何明顯結果。因此，用於病毒載體之經推薦Rv1733一級結構，可為一完整蛋白質扣除其訊息胜肽(62個首要殘基)，如SEQ ID NO: 17所述。或者，亦可使用一全長之Rv1733 (SEQ ID NO: 5)。

範例3：*Mtb* 基因融合物之構築

[0296] 經設計之12種不同融合蛋白質如圖1與表3所示。更特別地，依據生化合理性設計5種融合物，分別如下所述：

- 融合物編號3 (RPFB-Dhyb*)；
- 融合物編號5 (Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807)；

- 融合物編號 6 (Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb*-Rv1733*);
- 融合物編號 8 (Ag85B*-Rv2626- Rv1733*); 以及
- 融合物編號 14 (Rv2029*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*)。
- 依循下列之生化合理性以設計融合物
- 兩雙體蛋白質(亦即, Rv2626與Rv2929*)不應被融合至相同融合物, 以避免任何立體衝突。
- 兩膜蛋白質不應被融合至相同融合物(亦即, Rv1733*與Rv0111*), 以避免潛在之毒性。
- 具有TM之蛋白質(Rv1733*與Rv0111*)應被插入融合物末端, 以允許分泌型構築體進行漿膜錨泊。
- 若有可能, 融合蛋白質應始於一良好折疊之蛋白質(亦即, Ag85B*、Rv2029*、Rv2626、Rv0569、RPFB-D雜交物*), 使其對於融合物其他部位產生«伴侶»效應。
- 製造三種融合物, 其中兩種為最小之抗原部分(亦即, Ag85B*、Rv2029*、Rv2626、Rv0111*、Rv1733*、TB10-4、ESAT-6、RPFB-D雜交物*), 而最後一種融合物為剩餘之(任擇之)抗原部分(亦即, Rv0569、Rv1813*、Rv3407、Rv1807、Rv3478)。

[0297] 另一方面, 融合物亦依據TB之疾病階段設計。融合物編號 2 含有活躍期抗原(Ag85B*-TB10.4-ESAT6), 而融合物編號 4 含有活躍期與復甦期抗原(RPFB-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6)。融合物編號 13 由潛

伏期抗原(Rv2029*-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*)組成。

[0298]如材料與方法中所述，將一系列之胜肽加入*Mtb* 抗原融合物，分別為N端之Flag標籤與C端之c-myc與His標籤胜肽，目的為促進編碼基因產物及N端訊息胜肽與C端膜錨泊胜肽之偵測，以增強免疫活性(要注意的是，加入TM結構域，並非融合物末端為Rv0111*或Rv1733*者所必須，因為這些蛋白質已包含此結構域)。

[0299]為便於比較，亦構築無任何SS與TM胜肽之融合物，以評估經編碼之*MTB*抗原於細胞質之表達。融合物編號3 (pTG18267)、編號5 (pTG18269)、編號2 (pTG18266)與編號4 (pTG18268)係刪除SS與TM胜肽，產生融合物編號12 (pTG18307)、編號9 (pTG18295)、編號10 (pTG18296)與編號11 (pTG18297)。這些構築體亦保留了N端之Flag標籤與C端之c-myc與His標籤。

表3 提供了本研究中各種融合物之摘錄。

	融合物#	TB抗原	質體
各階段之融合物	13	Rv2029*-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*	pTG18323
	2	Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18266
	4	RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18268
最大之融合物	5	Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807	pTG18269
依據生化規則融合之融合物	6	Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733*	pTG18270
	14	Rv2029-TB10.4-ESAT6-Rv0111*	pTG18324
	8	Ag85B*-Rv2626-Rv1733*	pTG18272
	3	RPFB-Dhyb	pTG18267
不具有SS與TM之融合物	9	Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807	pTG18295
	10	Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18296
	11	RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18297
	12	RPFB-Dhyb	pTG18307

[0300] 爲便於比較，用於前述融合物之個別 *Mtb* 基因編碼質體，係以 PCR 放大或由 Geneart 進行基因合成。更精確地，以 pTG18269 作爲模板，放大 Rv3407、Rv0569、Rv1807、Rv1813* 與 Rv3478，而 pTG18323 則用於放大 Rv2626。ESAT6、Rv1733*、Ag85B*、TB10-4、Rv0111* 與 Rv2029* 以經合成之基因製造。

[0301] 個別基因之處理方式同於融合物，亦即，插入 pGWiz 之 CMV 促進子下游，並於 5' 端融合 Flag 與 3' 端融合 c-myc-His 序列。由於 Rv1733* 與 Rv0111* 蛋白質含有 TM 結構域，因此，將狂犬病毒 ERA 品系醣蛋白質前驅物 N 端之訊息胜肽融合至 Flag 序列上游，以避免表達上之問題。經生產之質體分別命名爲 pTG18300 (Rv3407)、pTG18301 (Rv0569)、pTG18302 (Rv1807)、pTG18303 (Rv1813*)、pTG18304 (Rv3478)、pTG18305 (Rv2626)、pTG18308 (ESAT6)、pTG18309 (Rv1733*)、pTG18310 (Ag85B*)、pTG18315 (TB10.4)、pTG18329 (Rv0111*)、pTG18317 (Rv2029*)。

[0302] 於導入對應之表達質體後，以原核表達系統評估各個融合蛋白質。以西方墨點法分析表達情形，而免疫活性則於小鼠之 DNA 免疫注射後以 ELISpot IFN γ 試驗評估。在可能的情況下，比較細胞質型(無 SS 與 TM)與膜錨泊型之表達與免疫原性，以及比較融合物與表達個別 *MTB* 抗原之質體混合物之免疫原性。

範例4：*Mtb*抗原與融合物之表達分析

[0303] 無論以個別或融合物形式表達，*Mtb* 基因之表達分析，係以取自經轉染之HEK293細胞之細胞裂解液進行西方墨點分析。

4.1 經個別MTB抗原編碼質體轉染之細胞裂解液之西方墨點法分析

[0304] 以針對表達基因匣所含標籤胜肽(例如，抗Flag M2過氧化酶(HRP)抗體、單株抗c-myc過氧化酶抗體與單株抗His過氧化酶抗體)，或特異於MTB抗原之抗體，進行個別*Mtb*抗原之免疫偵測。具體而言，以飼兔經免疫注射後之血清(請見材料與方法)用於偵測Rv1733*、Rv2029*、Rv0569、Rv1807、Rv0111*、Rpf-B-D、Rv1813*、Rv3407與Rv3478，而商業上抗體則用於偵測ESAT6、Ag85B*、TB10.4與Rv2626。

[0305] 結果摘錄於表4。更具體地，無論使用何種免疫偵測系統(抗Flag、抗His抗體、特異性兔抗體與商業上抗體)，所有個別之蛋白質皆可偵測出符合預期大小之層帶。有些蛋白質亦偵測到額外之產物，其取決於所使用之免疫偵測系統。此外，偵測到高程度之表達，除了Rv3407以外，以及較少程度之TB10.4與ESAT6。表達偵測之範例如圖2所示，包括幾個具代表性之MTB抗原，亦即Rv2029* (圖2A)、RPF-B-Dhyb (圖2B)、ESAT6 (圖2C)與Rv2626 (圖2D)。

表4：

TB抗原 (質體)	預期大小 (表達程度)	以抗Flag與抗His抗體偵測之 額外產物	以 <i>Mtb</i> 抗體偵測 之額外產物
Rv3407 (pTG18300)	14.4 kDa (+)		
Rv0569 (pTG18301)	12.9 kDa (+++)		1個弱層帶 ≈ 10 kDa
Rv1807 (pTG18302)	43.3kDa (++)		
Rv1813* (pTG18303)	15.1 kDa (+++)		
Rv3478 (pTG18304)	42.8 kDa (+++)	2個約16與26 kDa之N端經剪切產 物(經抗Flag抗體辨識)	1個層帶 ≈ 30 kDa
Rv2626 (pTG18305)	18.9 kDa (+++)	對應於Rv2626雙體之額外層帶	雙體 ≈ 43 kDa
ESAT6 (pTG18308)	13.0 kDa (++)		
Rv1733* (pTG18309)	21.2 kDa (+++)	1個約20 kDa之N端經剪切產物， 與3個介於8與10 kDa間之 C端產物	2個層帶 ≈ 10 與20 kDa
Ag85B* (pTG18310)	33.9 kDa (+++)	5個約26、24、20、17與12 kDa之 次要N端經剪切產物，以及 1個約34 kDa之C端經剪切產物 (以抗His抗體偵測)	3個弱層帶 ≈ 26、28與34 kDa
TB10.4 (pTG18315)	13.5 kDa (++)		
Rv0111* (pTG18329)	37.6 kDa (+++)	1個約8 kDa之N端經剪切產物，與 1個約34 kDa之C端經剪切產物	1個層帶 ≈ 34 kDa，與2個極 弱層帶 ≈ 18與 20 kDa
Rv2029* (pTG18317)	35.8 kDa (+++)		
RfpB-Dhyb* (pTG18307)	39.4kDa (+++)		2個弱層帶 ≈ 40 kDa

4.2 經*Mtb* 抗原融合物編碼質體轉染之細胞裂解液之西方墨點法分析

[0306] HEK293細胞經可表達不同*Mtb*基因融合物之質體轉染，且表達產物以上述之相同條件進行西方墨點法分

析。轉染反應係於蛋白酶體抑制劑MG132存在與不存在下進行。於此，再次以抗Flag M2過氧化酶(HRP)抗體、單株抗c-myc過氧化酶抗體與單株抗His過氧化酶抗體，及抗*Mtb*特異性抗體進行免疫偵測。

[0307]經標籤化融合物之預期大小如以下所示：

- 融合物編號2 (pTG18266) : 63.6 kDa
- 融合物編號3 (pTG18267) : 49.0 kDa
- 融合物編號4 (pTG18268) : 99.7 kDa
- 融合物編號5 (pTG18269) : 122.0 kDa
- 融合物編號6 (pTG18270) : 103.5 kDa
- 融合物編號8 (pTG18272) : 67.3 kDa
- 融合物編號9 (pTG18295) : 112.9 kDa
- 融合物編號10 (pTG18296) : 53.8 kDa
- 融合物編號11 (pTG18297) : 90.0 kDa
- 融合物編號12 (pTG18307) : 39.3 kDa
- 融合物編號13 (pTG18323) : 101.5 kDa
- 融合物編號14 (pTG18324) : 90.6 kDa

[0308]所有的*Mtb*抗原融合物皆以抗Flag與抗His單株抗體偵測。*Mtb*融合物產物亦以抗c-myc單株抗體偵測，除了pTG18266、pTG18267、pTG18268與pTG18269以外。由於鄰近之TM結構域，c-myc表位可能不適用於這些融合物，而細胞質之相對位置(pTG18296、pTG18307、pTG18297與pTG18295)則有良好之抗myc抗體偵測效果。圖3說明了*Mtb*融合物之西方墨點法分析，其中包含潛伏期抗原

(pTG18295編碼之融合物編號9)、活躍期抗原(pTG18296編碼之融合物編號10)、復甦期抗原(pTG18307編碼之融合物編號12)，及復甦期與活躍期抗原(pTG18297編碼之融合物編號11)，接著進行抗Flag之免疫偵測。以抗His抗體之免疫偵測產生相同之表達情形。

[0309]圖4說明了*Mtb*融合物之西方墨點法分析，包括TB10.4 (圖4A)、Rv0569 (圖4B)與Rv2626 (圖4C)，接著以相對應之特異性血清進行免疫分析，分別為含有TB10.4之融合物編號2 (pTG18266)、編號10 (pTG18296)、編號4 (pTG18268)、編號11 (pTG18297)、編號14 (pTG18324)；含有Rv0569之融合物編號5 (pTG18269)與編號9 (pTG18295)及含有Rv2626之融合物編號13 (pTG18323)、編號6 (pTG18270)與編號8 (pTG18272)。以pGWiz作為陰性對照組，並以編碼TB10.4之pTG18315作為陽性對照組。

[0310]無論使用何種免疫偵測系統，所有融合物中符合預期大小之層帶皆被凸顯出，且於某些情況下，亦觀察到額外之融合物產物。特別是，pTG18270、pTG18272與pTG18323可偵測到雙體。這三種融合物含有Rv2626，其具有形成雙體之能力以對抗還原性條件。以抗Flag與抗His抗體進行pTG18323與pTG18269之免疫偵測時，可凸顯出一些額外的次要蛋白質水解產物。此外，以抗Flag與抗His抗體進行pTG18266、pTG18268、pTG18269、pTG18270、pTG18272、pTG18323與pTG18324之偵測時，可觀察到一些高於預期大小之額外產物。這些層帶對應於N端醮化之產

物，其可由體外處理N端醣化酶F加以證實(亦即，細胞萃取物以N端醣化酶處理後產生預期大小之表達產物)。除了融合物編號4 (pTG18267, RpfB-D*)以外，所有含訊息胜肽之融合物皆產生N端醣化產物。N端醣化之產物亦可由抗原特異性抗體，及含有Rv2626融合物pTG18270、pTG18272與pTG18323之雙體形式進行偵測。一些融合物之蛋白質水解產物亦可由特異性血清偵測出(數據未顯示)，其取決於融合物與血清。舉例而言，以Rv3407之特異性血清可偵測出 ≈ 40 kDa之pTG18269及 ≈ 36 與 38 kDa之pTG18295之額外層帶，但是未見於Rv0569特異性血清之偵測。

[0311]所有融合物可觀察到類似與高程度之表達，且MG132存在下產物量更高。膜錨泊融合物(pTG18269、pTG18268)之表現量可媲美其於細胞質相對部分(pTG18295、pTG18297)，除了pTG18266以外，其表達量優於細胞質融合物(pTG18296)。融合物編號5 (pTG18269)之Rv1807特異性抗體偵測結果極微弱，而在細胞質融合物(pTG18295)部分則並非如此。由於鄰近TM序列，Rv1807特異性表位可能不適用於此融合物。

範例5：DNA免疫注射評估

[0312]於DNA免疫注射後，以不同小鼠模式評估各種*Mtb*抗原融合物之免疫活性。

5.1. 活躍期*Mtb*抗原融合物誘發之免疫原性評估

[0313]於3週之間隔內，BALB/c小鼠以肌內途徑免疫注射三次表達有細胞膜錨泊形式(SS/TM: pTG18266)，或細胞

質形式(pTG18296)之融合物“*Ag85B - TB10.4 - ESAT6*”質體。為便於比較，小鼠亦免疫注射包括個別*Mtb*抗原之融合物(pTG18310 (*Ag85B*) + pTG18315 (*TB10.4*) + pTG18308 (*ESAT6*))之編碼質體混合物，並以空載體pGWiz作為陰性對照組。於最後之DNA注射2週後，以描述於材料與方法之各種胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞之免疫反應。

[0314]如圖5所示，所有的pTG18266免疫注射小鼠皆誘發出對抗*Ag85B*與*TB10.4*抗原之強細胞反應(其表達錨泊型*Ag85B-TB10.4-ESAT*融合物)，而8隻動物中有6隻產生對抗*ESAT-6*之IFN γ 產生細胞(圖5a)。在免疫注射pTG18296之小鼠中(其表達細胞質型*Ag85B-TB10.4-ESAT*融合物)，亦偵測到對抗*Ag85B*與*TB10.4*抗原之IFN γ 產生細胞之活化反應，但相較於錨泊型融合物，其誘發量較低，而偵測到極弱之*ESAT-6*對抗反應(圖5b)。非常有趣的是，當比較圖5a/5b與圖5c時，*Ag85B*、*TB10.4*與*ESAT-6*，以融合蛋白質(pTG18266與pTG18296)之形式表達時，可偵測到所有三種抗原之最強對抗反應，而非個別質體(混合pTG18310、pTG18315與pTG18308)之單獨表達。如所預期，以空質體進行免疫注射未誘發任何特異性免疫反應(圖5d)。

[0315]因此，至少在活躍期之*Mtb*抗原，這些結果凸顯了設計抗原融合物以表達於細胞表面(具有SS與TM胜肽)之效益，以使所得*Mtb*抗原融合物之免疫活性最佳化。

5.2. 活躍期與復甦期Mtb抗原融合物誘發之免疫原性評估

[0316]於3週之間隔內，BALB/c小鼠以肌內途徑免疫注射三次表達有細胞膜錨泊形式(SS/TM: pTG18268)或細胞質形式(pTG18297)之融合物“*RpfB-Dhyb - Ag85B - TB10.4 - ESAT6*”質體。為便於比較，小鼠亦免疫注射包括個別TB抗原之融合物(pTG18307 (*RpfB-Dhyb*) + pTG18310 (*Ag85B*) + pTG18315 (*TB10.4*) + pTG18308 (*ESAT6*))之編碼質體混合物，並以空載體pGWiz作為陰性對照組。於最後之DNA注射2週後，以描述於材料與方法之各種胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞之免疫反應。

[0317]如圖6所示，免疫注射pTG18268質體(其表達錨泊型RpfB-DHyb-Ag85B-TB10.4-ESAT-6融合物)，造成強的RpfB-DHyb、Ag85B與TB10.4抗原特異性反應，其特徵在於，以對應之胜肽匯集池進行體外再刺激反應後，偵測到高量之IFN γ 產生細胞，而少數動物可誘發出對抗ESAT-6之IFN γ 產生細胞且量較低(圖6a)。在免疫注射pTG18297之小鼠中(其表達細胞質型RpfB-DHyb-Ag85B-TB10.4-ESAT-6融合物)，亦偵測到對抗RpfB-DHyb、Ag85B與TB10.4抗原之IFN γ 產生細胞之活化反應，但相較於錨泊型融合物，其誘發量較低，而偵測到極弱之ESAT-6對抗反應(圖5b)。除了ESAT-6以外，如圖6c所示，RpfB-DHyb、Ag85B與TB10.4以融合蛋白質形式表達時(pTG18268與pTG18297；圖6a與

6b)，可得到三種抗原之最強抗*Mtb*反應，而非個別質體(混合pTG18307 + pTG18310 + pTG18315 + pTG18308)之單獨表達。如所預期，以空質體進行免疫注射未引發任何特異性免疫反應(圖6d)。

5.3. 復甦期*Mtb*抗原融合物誘發之免疫原性評估

[0318]於3週之間隔內，BALB/c小鼠以肌內途徑免疫注射三次表達有細胞膜錨泊形式(SS/TM: pTG18267)或細胞質形式(pTG18307)之融合物“*RpfB-Dhyb*”質體。以空載體pGWiz作為陰性對照組。於最後之DNA注射2週後，以描述於材料與方法之四種胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞之免疫反應。

[0319]如圖7所示，以pTG18267進行疫苗注射之小鼠(其表達錨泊型*RpfB-DHyb*融合物，包含SS/TM胜肽)，可觀察到高量之IFN γ 產生細胞，顯示這些小鼠引發強的特異性細胞反應(圖7a)。免疫注射pTG18307(其表達細胞質型*RpfB-DHyb*融合物)，亦造成IFN γ 產生細胞之活化反應，但幅度稍低(圖7b)。此外，相較於處理pTG18307之組內一致性，以pTG18267處理之組內一致性似乎較高。如所預期，以空質體進行免疫注射未引發任何特異性免疫反應(圖7c)。

5.4. 潛伏期*Mtb*抗原融合物誘發之免疫原性評估

[0320]於3週之間隔內，BALB/c小鼠以肌內途徑免疫注射三次表達有細胞膜錨泊形式(pTG18269)，或細胞質形式(pTG18295)之融合物“*Rv0569 - Rv1813 - Rv3407 - Rv3478 - Rv1807*”質體。為便於比較，小鼠亦免疫注射包括個別*Mtb*

抗原之融合物(pTG18300 (*Rv3407*) + pTG18301 (*Rv0569*) + pTG18302 (*Rv1807*) + pTG18303 (*Rv1813*) + pTG18304 (*Rv3478*))之編碼質體混合物，並以空載體pGWiz作為陰性對照組。於最後之DNA注射2週後，以描述於材料與方法之各種胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞之免疫反應。

[0321]如圖8所示，免疫注射pTG18269質體(其表達錨泊型*Rv0569* - *Rv1813* - *Rv3407* - *Rv3478* -*Rv1807*融合物)，造成強的*Rv3407*與*Rv3478*抗原特異性反應，而針對*Rv1807*之幅度則較低(圖8a)。免疫注射pTG18295 (其表達細胞質型 version of the *Rv0569* - *Rv1813* - *Rv3407* - *Rv3478* -*Rv1807*融合物)之小鼠，觀察到對抗此三種抗原之IFN γ 產生細胞之產量類似(圖8b)。注射此混合質體之小鼠，其反應皆落於相同級別內(圖8c)。另一方面，針對*Rv1813*與*Rv0569*，所有情況下皆無明顯反應(圖8a、b與c)。如所預期，以空質體進行免疫注射未引發任何特異性免疫反應(圖8d)。

[0322]其他品系小鼠亦用於調查抗*Mtb*抗原之反應，以涵蓋不同之MHC單倍型：BALB/c小鼠為H-2^d、C57BL/6小鼠為H-2^b、CBA/J與C3H/HeN小鼠為H-2^k。

[0323]於2週之間隔內，小鼠以肌內途徑免疫注射三次表達有潛伏期抗原“*Rv2029* – *Rv2626* – *Rv1733* – *Rv0111*”之pTG18323，或以空載體pGWiz作為陰性對照組。於最後之DNA注射2週後，以描述於材料與方法一節之各種胜肽匯集池進行體外再刺激反應，再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞

之免疫反應。如圖10所示，C3H/HeN小鼠以pTG18323質體進行免疫注射，造成強的特異於Rv2029 (胜肽編號1之陽性匯集池)、Rv2626 (編號2之陽性匯集池)與Rv1733抗原(編號2之陽性匯集池) (圖10a)之免疫反應。於免疫注射pGWiz與體外再刺激Rv0111胜肽匯集池後，觀察到非特異性之背景反應(圖10b)，因而使pTG18323於疫苗接種後之抗Rv0111特異性反應偵測變得複雜。

[0324] H-2^k CBA/J小鼠以pTG18323免疫注射後，亦可偵測到類似程度之Rv2029、Rv2626與Rv1733抗原特異性免疫反應。相反的，在BALB/c小鼠中，IFN γ 產生細胞僅可於Rv2626胜肽之再刺激後偵測到特異性，而C57BL/6小鼠則無訊號被偵測出。

[0325] 結論為，這些結果凸顯之事實為，經檢測之*Mtb* 抗原融合物序列可於不同單倍型小鼠誘發穩健之以細胞為主之免疫反應。

5.5. 依據生化學規則融合之融合物誘發之免疫原性評估

[0326] 於2週之間隔內，BALB/c小鼠或C57BL/6小鼠以肌內途徑免疫注射三次表達有融合物編號6、8或14之編碼質體，其依據*MTB* 抗原之生化學特性設計，亦即，pTG18270 (*Ag85B* – *Rv2626* – *RpfB-Dhyb* – *Rv1733*)、pTG18272 (*Ag85B* – *Rv2626* – *Rv1733*)與pTG18324 (*Rv2029* – *TB10.4* – *ESAT-6* – *Rv0111*)。為便於比較，小鼠亦免疫注射空白載體pGWiz，以作為陰性對照組。於最後之DNA注射2週後，以描述於材料與方法一節之各種胜肽匯集池進行體外再刺激

反應，再以ELISpot IFN γ 試驗評估細胞之免疫反應。

[0327] 免疫注射pTG18270之BALB/c與C57BL/6小鼠皆有特異於Ag85B與RpfB-Dhyb抗原之強的細胞反應，而特異於Rv2626之高量IFN γ 產生細胞僅發現於BALB/c小鼠。免疫注射pTG18272，於BALB/c小鼠可產生特異於Ag85B之IFN γ 產生細胞活化反應，而於C57BL/6小鼠可產生特異於Ag85B與Rv2626抗原之反應，但以其相較於pTG18270之誘發反應皆較低。於免疫注射pTG18324之小鼠，可偵測到特異於TB10.4與ESAT-6抗原之高量IFN γ 產生細胞，而特異於Rv2029與Rv0111之IFN γ 產生細胞亦被誘發，但量較低。如所預期，以空質體進行免疫注射未引發任何特異性免疫反應。

[0328] 結論為，經檢測之融合物，其依據生化學為主之合理性設計以增加融合物之穩定性與產量，對於不同感染階段之*Mtb*抗原特異性，展現良好之免疫反應。

5.6. *Mtb* 抗原融合物誘發之抗Rv1733體液性反應評估

[0329] 於3週之間隔內，BALB/c小鼠以肌內途徑免疫注射三次表達有融合物“Ag85B* - Rv2626 - Rv1733*” (pTG18270)與融合物“Ag85B* - Rv2626 - RPFB-Dhyb* - Rv1733*” (pTG18272)之質體。為便於比較，小鼠亦免疫注射包括個別*Mtb*抗原之融合物(pTG18310 (Ag85B*) + pTG18305 (Rv2626) + pTG18309 (Rv1733*))之編碼質體混合物，並以空載體pGWiz作為陰性對照組。於最後之DNA注射2週後，評估體液性免疫反應。匯集免疫注射小鼠之血清，並以西方墨點法分析。更特別地，將每列100 ng之

Rv1733重組型蛋白質(以大腸桿菌生產，請見範例編號8)載入丙烯醯胺凝膠中，並以1/200之稀釋血清進行免疫偵測。其結果為，以pTG18270、pTG18272與編碼個別*MTB*抗原之質體混合物進行免疫注射之小鼠血清，發現皆可特異地偵測出Rv1733蛋白質。

5.7. *Mtb* 抗原融合物誘發之抗Rv1813體液性反應評估

[0330]於3週之間隔內，BALB/c小鼠以肌內途徑免疫注射三次表達有細胞膜錨泊形式(SS/TM: pTG18269)或細胞質形式(pTG18295)之融合物“Rv0569 - Rv1813 - Rv3407 - Rv3478 -Rv1807”質體。為便於比較，小鼠亦免疫注射包括個別*Mtb*抗原之融合物(pTG18300 (*Rv3407*) + pTG18301 (*Rv0569*) + pTG18302 (*Rv1807*) + pTG18303 (*Rv1813*) + pTG18304 (*Rv3478*))之編碼質體混合物，並以空載體pGWiz作為陰性對照組。於最後之DNA注射2週後，評估體液性免疫反應。匯集免疫注射小鼠之血清，並以西方墨點法分析，係以每列100 ng之Rv1813重組型蛋白質(以大腸桿菌生產，請見範例編號8)載入丙烯醯胺凝膠中。以1/200之稀釋血清進行免疫偵測。其結果為，以pTG18269 (其編碼細胞膜錨泊形式之融合物)進行免疫注射之小鼠血清，發現可特異地偵測出Rv1813蛋白質。

範例6：表達有*Mtb*抗原之重組型MVA之產生

[0331]總共有10個MVA疫苗候選物被設計，以表達出1至3種*Mtb*融合物，而各種*Mtb*抗原之表達係以經感染A549細胞之細胞裂解液進行西方墨點法分析。

6.1 TB疾病階段之重組型MVA之產生

[0332]有七種重組型MVA候選物被設計出，其涵蓋一、二或三種基因匣，用於表達代表TB疾病不同階段之*Mtb*融合物。融合物編號4與融合物編號11皆含有活躍期與復甦期抗原(RPFB-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6)，並以細胞膜錨泊形式(融合物編號4，具有N端訊號胜肽與C端膜錨泊胜肽)，或細胞質形式(融合物編號11相符於融合物編號4之細胞質型)表達。融合物編號13含有潛伏期抗原(Rv2029*-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*)。融合物編號5與融合物編號9皆含有額外之潛伏期抗原(Rv056-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807)表達於細胞之不同部位，包括錨泊於細胞膜(融合物編號5包含N端訊號胜肽與C端膜錨泊胜肽)或位於細胞質(融合物編號9)。

[0333]總結之，此七種MVA候選物如以下所述：

- **MVATG18355**包含融合物編號13並經由p7.5K促進子調控。
- **MVATG18364**包含融合物編號13並經由p7.5K促進子調控，且融合物編號4經由pH5R促進子調控。
- **MVATG18365**包含融合物編號13並經由p7.5K促進子調控，且融合物編號11經由pH5R促進子調控。
- **MVATG18376**包含融合物編號13並經由p7.5K促進子調控、融合物編號4經由pH5R促進子調控，且融合物編號5經由B2R促進子調控。
- **MVATG18377**包含融合物編號13並經由p7.5K促進

子調控、融合物編號11經由pH5R促進子調控，且融合物編號5經由B2R促進子調控。

- **MVATG18378**包含融合物編號13並經由p7.5K促進子調控、融合物編號4經由pH5R促進子調控，且融合物編號9經由B2R促進子調控。
- **MVATG18379**包含融合物編號13並經由p7.5K促進子調控、融合物編號11經由pH5R促進子調控，且融合物編號9經由B2R促進子調控。

6.2 依據生化學上合理性產生重組型MVA

[0334]有三種重組型MVA候選物被設計出，其涵蓋二或三種基因匣，用於表達依據生化學上合理性設計之*Mtb*融合物。融合物編號6含有下列抗原Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb*-Rv1733*，而融合物編號14含有Rv2029*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*。N端訊息胜肽皆加入此兩種融合物，而無TM結構域被加入，係因這些融合物終止於Rv0111或Rv1733，其已含有膜錨泊胜肽。

- **MVATG18404**包含融合物編號14並經由p7.5K促進子調控，且融合物編號6經由pH5R促進子調控。
- **MVATG18417**包含融合物編號14並經由p7.5K促進子調控、融合物編號6經由pH5R促進子調控，且融合物編號5經由B2R促進子調控。
- **MVATG18418**包含融合物編號14並經由p7.5K促進子調控、融合物編號6經由pH5R促進子調控，且融合物編號9經由B2R促進子調控。

6.3 經由MVA表達之Mtb抗原與融合物之西方墨點法分析

[0335]以前述之各種MVA候選物感染A549細胞(MOI 1)，且表達產物於材料與方法所述之條件下經由西方墨點法分析。以本文所述之各種Mtb抗原之特異性抗體進行免疫偵測。具體而言，以飼兔經免疫注射後之血清(請見材料與方法)用於偵測Rv1733*、Rv2029*、Rv0569、Rv1807、Rv0111*、RPFB-Dhyb*、Rv1813*、Rv3407與Rv3478，而商業上抗體則用於偵測ESAT6、Ag85B*、TB10.4與Rv2626。

[0336]其結果為，無論何種受測之重組型MVA，所有融合物皆可凸顯出相符於預期大小之層帶。更具體地，以MVATG18355、MVATG18364、MVATG18365、MVATG18376、MVATG18377、MVATG18378與MVATG18379感染之細胞，其細胞裂解液於抗Rv2626與抗Rv0111之免疫偵測後，可觀察到約98.4 kDa之層帶(融合物編號13之預期大小)。以含有融合物編號4之MVATG18364、MVATG18376與MVATG18378及含有融合物編號11之MVATG18365、MVATG18377與MVATG18379分別感染之細胞，其細胞裂解液於抗ESAT6之免疫偵測後，可觀察到約96.7 kDa之層帶(融合物編號4之預期大小)與約87 kDa之層帶(融合物編號11之預期大小)。此外，以含有融合物編號5之MVATG18376與MVATG18377及含有融合物編號9之MVATG18378與MVATG18379分別感染之細胞，其細胞裂解液於抗Rv3407之免疫偵測後，可觀察到約119.7 kDa之層帶

(融合物編號5之預期大小)與約109.9 kDa之層帶(融合物編號9之預期大小)。最後，以MVATG18404感染之細胞，其細胞裂解液分別於抗Rv2626與抗Rv0111之免疫偵測後，可觀察到約100.4 kDa之層帶(融合物編號6之預期大小)與約87.5 kDa之層帶(融合物編號14之預期大小)。

[0337]此外，在某些情況下，亦發現額外之融合物產物。特別是，融合物編號13與融合物編號6可偵測到雙體，可能是因為Rv2626形成雙體以對抗還原性條件。關於融合物編號13，完整融合物編號13 (預期大小為98.4 kDa)之表達確實可偵測出，但是量相當低。以抗Rv2626 (約70 kDa)與抗Rv0111 (約30kDa)可觀察到主要蛋白質水解產物，顯示融合物編號13有蛋白質水解性斷裂。

[0338]融合物編號 4與編號11可偵測到類似之表達量，其包含相同抗原 (RPFB-Dhyb*-Ag85B*-TB10.4-ESAT6)，但分別為膜錨泊型(融合物編號4)或細胞質型(融合物編號11)。融合物編號 4可觀察到比預期大小更大之層帶 (115 kDa而非96.7 kDa)，其可能為N端醮化產物。兩融合物亦可偵測出次要蛋白質水解產物。

[0339]以抗Rv3407抗體偵測表達有融合物編號5與編號9之MVA細胞裂解液，亦發現類似之表達量(兩者皆為Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807抗原融合物，但是分別為膜錨泊型(融合物編號5)或細胞質型(融合物編號9))。於含有融合物編號 5之細胞裂解液中，發現一大於預期分子大小之層帶(120 kDa而非98.4 kDa)，其可能為N端醮

化產物。另一方面，以抗Rv1807抗體偵測融合物編號5，可發現極弱之層帶，而這未發生於細胞質型。據推測，Rv1807特異性表位可能不適用於膜錨泊型融合物，係因其鄰近TMR序列。

範例7：表達*Mtb*抗原之MVA候選物疫苗之免疫原性評估

7.1 於BALB/c小鼠中表達*Mtb*抗原之MVA候選物疫苗之免疫原性評估

[0340]以分別表達 «Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111» (對應於融合物編號13)與«RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6» (對應於融合物編號4或編號11)之MVATG18365與MVATG18364，進行BALB/c小鼠之免疫注射。於融合物編號13中，SS結構域位於N端，而Rv1733與Rv0111表達有TM結構域，其應可將融合物導引至細胞表面。以MVATG18364表達之融合物編號4包含SS與TM結構域，而融合物編號11(MVATG18365)並未如此，且理論上應維持細胞質之表達形式。注射一週後，以本文所述之胜肽匯集池進行再刺激反應，再以IFN γ ELISpot試驗評估特異性免疫反應。小鼠亦免疫注射空MVA載體(MVATGN33.1)，以作為陰性對照組。

[0341]如圖11a與b所示，相較於MVATGN33.1載體，兩載體MVATG18365與MVATG18364可於BALB/c小鼠中，誘發特異於Rv2626、Rv0111、RpfB-Dhyb、Ag85B與TB10.4之IFN γ 陽性反應。相較於MVATG18365(細胞質型融合物)，MVATG18364(錨泊型融合物)之反應皆有系統地增強，除了Rv2626以外，其顯示類似之反應。所偵測之特異

於Rv2029、Rv1733與ESAT6之反應則較弱且零星。

[0342]此外，以描述於“範例6”一節之所有重組型MVA候選物疫苗注射BALB/c小鼠，並以材料與方法一節所述之IFN γ ELISpot試驗，分析特異於所有Mtb抗原之細胞免疫反應。BALB/c小鼠以各MVA候選物誘發之反應範圍與強度之摘錄，係描述於圖12。所有的MVA疫苗，以及依據TB疾病感染階段或生化學上合理性設計之Mtb抗原融合物，皆可於BALB/c小鼠中誘發特異於，14種抗原中之12種，之IFN γ 反應。未偵測出特異於兩種潛伏期抗原，Rv1733與Rv0569，之陽性細胞反應。

7.2 於基因轉殖HLA-A2小鼠中表達Mtb抗原之MVA候選物疫苗之免疫原性評估

[0343]如同我們在以DNA為主之研究中所觀察到的，小鼠單倍體對於所選取之Mtb抗原免疫原性具有影響(請見第5節)。爲了進一步分析MVA候選物所誘發之Rv1733與Rv0569抗原免疫原性，表達有兩抗原之重組型MVAs，係注射至表達有人類MHC第I類分子、HLA-A2之基因轉殖小鼠中。注射一週後，以本文所述之胜肽匯集池進行再刺激反應，再以IFN γ ELISpot試驗評估細胞免疫反應。小鼠亦免疫注射空MVA載體(MVATGN33.1)，以作爲陰性對照組。具體而言，以表達«Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111»(對應於融合物編號13)、«RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6»(對應於融合物編號4)及«Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807»(對應於融合物編號5或編號9)之MVATG18376或

MVATG18378 疫苗進行 HLA-A2 小鼠之免疫注射。於 MVATG18376 表達之融合物編號 5 中，SS 與 TM 結構域分別表達於 N 端與 C 端。圖 13 說明了 HLA-A2 小鼠以 MVATG18376 疫苗進行免疫注射後，所誘發之 IFN γ 反應。14 種抗原中，有 7 種可偵測到特異性免疫反應 (圖 13a)。以特異於 RpfB-Dhyb 與 Ag85B 抗原之胜肽進行脾細胞再刺激反應後，可偵測到高量之 IFN γ 產生細胞 (分別為 1397 斑點/ 10^6 細胞，與 1160 斑點/ 10^6 細胞)。相反地，MVATG18376 疫苗可誘發特異於 Rv1807、Rv1813、Rv3407 與 ESAT6 之較低量細胞反應。此外，以 Rv0569 特異性胜肽進行細胞再次激反應後，相較於使用 MVATGN33.1 空白疫苗所偵測到之訊號 (36 斑點/ 10^6 細胞，圖 13b)，可偵測到低量 ($1 \times$ 截止值 $<$ 中位數 $<$ $2 \times$ 截止值，186 斑點/ 10^6 細胞，圖 13a) 卻顯著之 IFN γ 產生細胞。以 MVATG18378 候選物進行免疫注射之 HLA-A2 小鼠，亦可誘發類似之結果，其誘發特異於 Rv0111 與 TB10.4 抗原之額外弱反應。以 MVATG18376 與 MVATG18378 疫苗誘發之 IFN γ 反應，摘錄於圖 15。無論注射何種 MVA 候選物，HLA-A2 基因轉殖小鼠皆未觀察到特異於 Rv1733、Rv2029、Rv2626 與 Rv3478 之反應。

7.3 於 C57Bl/6 小鼠表達 Mtb 抗原之 MVA 候選物疫苗之免疫原性評估

[0344] 以表達 «Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111» (對應於融合物編號 13)、«RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6» (對應於融合物編號 11) 及 «Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807»

(對應於融合物編號 5 或編號 9) 之 MVATG18377 或 MVATG18379 疫苗，進行 H-2^b 單倍體 C57BL/6 小鼠之免疫注射，以證實 Rv0569 與 Rv1733 抗原之免疫原性。注射一週後，以本文所述之胜肽匯集池進行再刺激反應，再以 IFN γ ELISpot 試驗評估特細胞免疫反應。小鼠亦免疫注射空 MVA 載體 (MVATGN33.1)，以作為陰性對照組。細胞 IFN γ 反應摘錄於圖 15。兩種 MVA 疫苗皆可驅動強的特異於 Rv1807、RpfB-Dhyb、Rv3478、Ag85B 與 ESAT6 抗原 (範圍為 92 至 861 斑點/10⁶ 細胞) 之免疫反應，而特異於 TB10.4 與 Rv0569 抗原之陽性 IFN γ 反應則僅於免疫注射 MVATG18379 候選物之小鼠偵測出 (分別為 78 與 58 斑點/10⁶ 細胞)。經免疫注射之 C57BL/6 小鼠中，並無特異於 Rv1733、Rv2029、Rv2626、Rv0111、Rv1813 與 Rv3407 之陽性反應被偵測出。

7.4 於 C3H/HeN 小鼠中表達 Mtb 抗原之 MVA 候選物疫苗之免疫原性評估

[0345] 由於特異於 Rv1733 之免疫原性已於疫苗注射質體之 H-2^k 單倍體 C3H/HeN 小鼠中證實 (請見 5.4 節)，我們亦將表達了含有 Rv1733 蛋白質之融合物 MVATG18376、MVATG18378、MVATG18377 與 MVATG18379 注射至此小鼠品系。注射一週後，以本文所述之胜肽匯集池進行再刺激反應，再以 IFN γ ELISpot 試驗評估特細胞免疫反應。小鼠亦免疫注射空 MVATGN33.1 載體，以作為陰性對照組。如圖 14 所示，相較於 MVATGN33.1，MVATG18377 疫苗可於 C3H/HeN 小鼠誘發 IFN γ 反應。以 Rv2029 與 Rv2626 胜肽進行

再刺激反應之脾細胞，可偵測到高量之IFN γ 產生細胞(分別為660與353斑點/10⁶細胞)。經免疫注射之C3H/HeN小鼠亦誘發低的特異於RpfB-Dhyb、Rv1813、Rv3407與Rv3478 抗原之細胞免疫反應，範圍為78至250斑點/10⁶細胞。如同經DNA免疫注射之C3H/HeN小鼠所證實，相較於以空MVATGN33.1載體疫苗注射之小鼠所得結果(9斑點/10⁶細胞，圖14b)，此小鼠品系可驅動Rv1733特異性IFN γ 反應(183斑點/10⁶細胞)。於免疫注射MVATGN33.1與體外Rv0111、Ag85B與Rv1807胜肽匯集池之再刺激反應後(圖14b)，可偵測到非特異性背景反應，使得MVATG18377於疫苗接種後，這些抗原之特異性偵測變得困難。

[0346]除了MVATG18377、MVATG18376、MVATG18378與MVATG18379於C3H/HeN小鼠所誘發之免疫反應，係如圖15所示。在四種受測之MVA候選物中，MVATG18377最具免疫性(14種抗原中之7種)。MVATG18376與MVATG18378僅針對14種抗原中之2種(Rv2029與Rv2626)誘發細胞免疫反應，而MVATG18379可驅動之反應不僅有此兩種抗原，還有Rv1733。MVATG18377與MVATG18379可表達相同之融合蛋白質，除了融合物«Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807»以外。在MVATG18377中，SS與TM結構域分別表達於融合物編號5之N端與C端部位，而在MVATG18379中，兩種結構域不存在。MVATG183773融合物對於5種抗原中之3種具有免疫性，而MVATG18379則沒有。這些結果顯示，將融合蛋白

質送至細胞膜可改進其免疫原性。

[0347]結論為，以MVA載體及DNA質體進行免疫注射，對於本申請案所述之融合物涵蓋之所有*Mtb*抗原，可誘發強的特異性細胞反應。經DNA免疫注射之小鼠，亦可偵測到特異於兩種受測抗原之體液性免疫反應。至於DNA質體方面，以MVA表達之膜錨泊型*Mtb*融合物，所誘發之特異性免疫反應具有某種程度之增進。

範例8： *MTB*抗原之生產與純化

8.1 用於經選取*MTB*抗原生質生產之最佳化條件

[0348]以四種大腸桿菌菌株進行檢測，用於表達個別之*Mtb*抗原及不同之培養條件(例如，溫度)。

[0349]這些試驗凸顯出，所有14種經選取之抗原可於一特定溫度下，於至少一菌種中表達，但是各*Mtb*抗原之間觀察到明顯差異。的確，一些*Mtb*抗原易於多種大腸桿菌菌種中產生，且無論其培養條件(例如，Rv0111、Rv0569、Rv1807、Rv2029、Rv2626、RpfB-D融合物)，而其他抗原卻需要極特定之宿主細胞與條件(例如，Rv1733、Rv1813、TB10-4)。另一方面，多數*Mtb*抗原可於不同之大腸桿菌菌種中取得高表達量，除了Rv3407、Ag85B與Rv1813以外，其表達量較低但可測得。此外，某些*Mtb*抗原以可溶性材料形式產生(例如，Rv2626、Rv3407與Ag85B，其可直接收集自細胞裂解液上清液)，而其餘為不溶性材料(例如，RPFB-D、Rv0111、Rv1733、Rv2029、Rv3478、Rv1807、ESAT6與TB10.4，其收集自細胞裂解後之沈澱物)。有趣的

代表1、3與6 μL 之經純化匯集池)。

[0355]在這三種情況下，皆測量經純化匯集池之內毒素含量，並顯示其最大量為10 EU/mg蛋白質。

[0356]因此，此三種蛋白質經純化後，為具有可接受之產量、純度與內毒素含量。

[0357]作為總結，本發明提供一經最佳化之*MTB*抗原組合物。經廣泛地文獻書目、數據挖掘評分與生化學上電腦輔助分析後，選取14種*Mtb*抗原，並個別地或以融合物形式選殖至質體載體上。如同西方墨點法所證實，所有融合物皆可高量表達，並於一系列針對N與C端標籤或融合物上各*Mtb*抗原之抗體免疫偵測後，得到正確與預期大小之蛋白質。於BALB/c小鼠進行之免疫注射試驗，支持了經選取之*Mtb*抗原組合物與融合物，誘發 T細胞反應之免疫潛力。

[0358]此外，經選取之*Mtb*抗原(RpfB與RpfD為融合物形式)可由重組工具於細菌中個別生產。藉由調整標準步驟，如菌株與培養條件(例如，生長溫度)，使大腸桿菌之表達條件最佳化。所有蛋白質皆成功地以公升規模表達與生產。

範例9：含*Mtb*抗原之疫苗對於結核分枝桿菌感染小鼠之療效評估

[0359]以預先感染*Mtb*品系H37Rv之小鼠，共同投予三種*Mtb*表達之MVA候選物MVATG18364、MVATG18376與MVATG18377，及抗生素，以評估其療效。MVATGN33.1亦注射至一組別中，以作為陰性對照組。於抗生素治療結

束時(於注射後第15週)與6週後(於感染後第21週)，收集小鼠脾臟以進行細菌負載評估。小鼠組別、藥物療法與免疫注射時間表如表5 所示。

表5：

組別	小鼠數目	治療	施加氣溶膠第0週	預處理CFU (第1天, 第6週)	INH/RIF治療 (第6週至第15週)			CFU (復發) 第21週
					MVA 第10週	MVA 第14週	CFU 第15週	
1	5	無	5	5				
2	20	INH/RIF	20	-			5	15
3	20	INH/RIF + MVATG18376	20	-	20	20	5	15
4	20	INH/RIF + MVATG18377	20	-	20	20	5	15
5	20	INH/RIF + MVATG18364	20	-	20	20	5	15
6	20	INH/RIF + MVATGN33.1	20		20	20	5	15

[0360] 於Mtb感染後六週，及開始化療與MVA免疫注射前，分枝桿菌可於所有組別小鼠脾臟內繁衍($2.64 \log_{10}$ 總cfu)。如所預期，化療期間分枝桿菌負載下降。在僅進行化療之第2組中，於第15週Mtb量逐步減少至 $1.18 \log_{10}$ 總cfu，且於第21週減至 $0.70 \log_{10}$ 總cfu。有趣的是，在第15週時，以抗生素與MTB抗原表達之MVA共同處理之小鼠之分枝桿菌負載($0.70 \log_{10}$ 總CFU，於第15週，第3-5組)，低於僅以抗生素處理(第2組)，及以對照組空載體MVA組合抗生素處理(第6組)之小鼠，顯示Mtb表達之MVA具有較強之抗菌效果。值得注意的是，治療後六週(第21週)，經MVA疫苗注射小鼠之分枝桿菌並未增生，且負載量被控制在接近抗生素單獨治療小鼠之觀察量(範圍為 0.70 至 $0.85 \log_{10}$ 總cfu)。以空載體MVATGN33.1組合藥物治療作為對照組，其於第

15週與第21週時，並未誘發任何優於僅使用抗生素療法之
抗分枝桿菌功效。

【符號說明】

(無)

【序列表】

- <110> 傳斯堅公司
 <120> 分枝桿菌抗原疫苗
 <130> 363354D32654
 <150> EP 12305825.7
 <151> 2012-07-10
 <150> EP 12306539.3
 <151> 2012-12-07
 <150> EP 13305737.2
 <151> 2013-06-03
 <160> 102
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> 結核分枝桿菌
 <400> 1

Met Pro Ala Arg Ser Val Pro Arg Pro Arg Trp Val Ala Pro Val Arg
 1 5 10 15

Arg Val Gly Arg Leu Ala Val Trp Asp Arg Pro Glu Arg Arg Ser Gly
 20 25 30

Ile Pro Ala Leu Asp Gly Leu Arg Ala Ile Ala Val Ala Leu Val Leu
 35 40 45

Ala Ser His Gly Gly Ile Pro Gly Met Gly Gly Gly Phe Ile Gly Val
 50 55 60

Asp Ala Phe Phe Val Leu Ser Gly Phe Leu Ile Thr Ser Leu Leu Leu
 65 70 75 80

Asp Glu Leu Gly Arg Thr Gly Arg Ile Asp Leu Ser Gly Phe Trp Ile
 85 90 95

Arg Arg Ala Arg Arg Leu Leu Pro Ala Leu Val Leu Met Val Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ala Ala Arg Ala Leu Phe Pro Asp Gln Ala Leu Thr Gly Leu
 115 120 125

Arg Ser Asp Ala Ile Ala Ala Phe Leu Trp Thr Ala Asn Trp Arg Phe
 130 135 140

Val Ala Gln Asn Thr Asp Tyr Phe Thr Gln Gly Ala Pro Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Leu Gln His Thr Trp Ser Leu Gly Val Glu Glu Gln Tyr Tyr Val Val
 165 170 175

Trp Pro Leu Leu Leu Ile Gly Ala Thr Leu Leu Leu Ala Ala Arg Ala
 180 185 190

Arg Arg Arg Cys Arg Arg Ala Thr Val Gly Gly Val Arg Phe Ala Ala
 195 200 205

Phe Leu Ile Ala Ser Leu Gly Thr Met Ala Ser Ala Thr Ala Ala Val
 210 215 220

Ala Phe Thr Ser Ala Ala Thr Arg Asp Arg Ile Tyr Phe Gly Thr Asp
 225 230 235 240

Thr Arg Ala Gln Ala Leu Leu Ile Gly Ser Ala Ala Ala Ala Leu Leu
 245 250 255

Val Arg Asp Trp Pro Ser Leu Asn Arg Gly Trp Cys Leu Ile Arg Thr
 260 265 270

Arg Trp Gly Arg Arg Ile Ala Arg Leu Leu Pro Phe Val Gly Leu Ala
 275 280 285

Gly Leu Ala Val Thr Thr His Val Ala Thr Gly Ser Val Gly Glu Phe
 290 295 300

Arg His Gly Leu Leu Ile Val Val Ala Gly Ala Ala Val Ile Val Val
 305 310 315 320

Ala Ser Val Ala Met Glu Gln Arg Gly Ala Val Ala Arg Ile Leu Ala
 325 330 335

Trp Arg Pro Leu Val Trp Leu Gly Thr Ile Ser Tyr Gly Val Tyr Leu
 340 345 350

Trp His Trp Pro Ile Phe Leu Ala Leu Asn Gly Gln Arg Thr Gly Trp
 355 360 365

Ser Gly Pro Ala Leu Phe Ala Ala Arg Cys Ala Ala Thr Val Val Leu
 370 375 380

Ala Gly Ala Ser Trp Trp Leu Ile Glu Gln Pro Ile Arg Arg Trp Arg
 385 390 395 400

Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser
 405 410 415

Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val Val Pro Val Gly Ala Gly Pro Gly
 420 425 430

Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro Gly Val Ser Ala Val Ala Ala Val
 435 440 445

Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser Gln Pro Ala Pro Gly Pro Arg Asp
 450 455 460

Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser Val Phe Gly Asp Ser Ile Gly Trp
 465 470 475 480

Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro Thr Pro Gly Phe Arg Phe Ile Asp
 485 490 495

His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu Val Arg Gly Thr Pro Tyr Arg Tyr
 500 505 510

Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg Ala Glu Cys Asp Gly Trp Pro Ala
 515 520 525

Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg Asp Gln Pro Asp Val Ala Leu Leu
 530 535 540

Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val Asp Arg Val Asn Glu Gly Arg Trp
 545 550 555 560

Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Glu Leu
 565 570 575

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

Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly Gly Glu Lys Pro Asp Gly Arg Leu

<400> 3

Met Lys Ala Lys Val Gly Asp Trp Leu Val Ile Lys Gly Ala Thr Ile
1 5 10 15

Asp Gln Pro Asp His Arg Gly Leu Ile Ile Glu Val Arg Ser Ser Asp
20 25 30

Gly Ser Pro Pro Tyr Val Val Arg Trp Leu Glu Thr Asp His Val Ala
35 40 45

Thr Val Ile Pro Gly Pro Asp Ala Val Val Val Thr Ala Glu Glu Gln
50 55 60

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

Ala Ile Leu His Ala Arg Gly Thr
85

<210> 4

<211> 362

<212> PRT

<213> 結核分枝桿菌

<400> 4

Met Leu Arg Leu Val Val Gly Ala Leu Leu Leu Val Leu Ala Phe Ala
1 5 10 15

Gly Gly Tyr Ala Val Ala Ala Cys Lys Thr Val Thr Leu Thr Val Asp
20 25 30

Gly Thr Ala Met Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile Asp Ile
35 40 45

Val Glu Glu Asn Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp Leu Tyr Pro
50 55 60

Ala Ala Gly Val Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu Arg Arg
65 70 75 80

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

Trp Thr Thr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu Ala Met
100 105 110

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

Ser Gly Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln Leu Asn
130 135 140

Asp Gly Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn Val Ala
145 150 155 160

Gly Leu Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp His Val
165 170 175

Val Pro Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val
180 185 190

Thr Arg Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu Pro Pro
195 200 205

Asn Ala Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val
210 215 220

Val Glu Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe Ala Val
225 230 235 240

Ala Glu Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala Asn Val
245 250 255

Val Val Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro
260 265 270

Gly Thr Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile
275 280 285

Ala Gly Cys Glu Ala Gly Gly Asn Trp Ala Ile Asn Thr Gly Asn Gly
290 295 300

Tyr Tyr Gly Gly Val Gln Phe Asp Gln Gly Thr Trp Glu Ala Asn Gly
305 310 315 320

Gly Leu Arg Tyr Ala Pro Arg Ala Asp Leu Ala Thr Arg Glu Glu Gln
325 330 335

Ile Ala Val Ala Glu Val Thr Arg Leu Arg Gln Gly Trp Gly Ala Trp
340 345 350

Pro Val Cys Ala Ala Arg Ala Gly Ala Arg
 355 360

<210> 5
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> 結核分枝桿菌

<400> 5

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

Arg Leu Arg Leu Pro Cys Arg Thr Ile Leu Arg Val Phe Ser Arg Asn
 20 25 30

Pro Leu Val Arg Gly Thr Asp Arg Leu Glu Ala Val Val Met Leu Leu
 35 40 45

Ala Val Thr Val Ser Leu Leu Thr Ile Pro Phe Ala Ala Ala Ala Gly
 50 55 60

Thr Ala Val Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln
 65 70 75 80

Thr Arg His Pro Ala Thr Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile
 85 90 95

Asp Ser Asn Thr Thr Ala Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr
 100 105 110

Val Pro Ala Arg Trp Val Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val
 115 120 125

Asn Ala Lys Pro Gly Thr Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val
 130 135 140

Asp Ser Ala Gly Gln Leu Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala
 145 150 155 160

Ile Ala Asp Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala
 165 170 175

Ala Val Ala Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg
 180 185 190

Val Arg Asn Ala Ser Trp Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr
 195 200 205

Gln Arg
 210

<210> 6
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> 結核分枝桿菌

<400> 6

Leu Asp Phe Ala Thr Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr
 1 5 10 15

Ser Gly Ala Gly Ser Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp His
 20 25 30

Gly Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ala Ser Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Val
 35 40 45

Leu Ser Thr Leu Thr Gly Glu Glu Trp His Gly Pro Ala Ser Ala Ser
 50 55 60

Met Thr Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala
 65 70 75 80

Val Arg Ala Glu Gln Ala Gly Ala Gln Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala
 85 90 95

Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Ala Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Glu Ala
 100 105 110

Asn Arg Ala Gln Leu Met Ala Leu Ile Ala Thr Asn Val Leu Gly Gln
 115 120 125

Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Thr Glu Ala Gln Tyr Ala Glu Met Trp
 130 135 140

Ser Gln Asp Ala Met Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Ala
 145 150 155 160

Ala Thr Gln Leu Thr Pro Phe Thr Glu Pro Val Gln Thr Thr Asn Ala
 165 170 175

Ser Gly Leu Ala Ala Gln Ser Ala Ala Ile Ala His Ala Thr Gly Ala
 180 185 190

Ser Ala Gly Ala Gln Gln Thr Thr Leu Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ile
 195 200 205

Pro Ser Val Leu Gln Gly Leu Ser Ser Ser Thr Ala Ala Thr Phe Ala
 210 215 220

Ser Gly Pro Ser Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Ser Trp
 225 230 235 240

Leu Asp Lys Leu Trp Ala Leu Leu Asp Pro Asn Ser Asn Phe Trp Asn
 245 250 255

Thr Ile Ala Ser Ser Gly Leu Phe Leu Pro Ser Asn Thr Ile Ala Pro
 260 265 270

Phe Leu Gly Leu Leu Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gly Asp
 275 280 285

Val Leu Gly Glu Ala Thr Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Leu Val Ala
 290 295 300

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

Gly Asn Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr
 325 330 335

Ala Ala Ala Pro Leu Ala Ser Pro Leu Gly Ser Ala Leu Gly Gly Thr
 340 345 350

Pro Met Val Ala Pro Pro Pro Ala Val Ala Ala Gly Met Pro Gly Met
 355 360 365

Pro Phe Gly Thr Met Gly Gly Gln Gly Phe Gly Arg Ala Val Pro Gln
 370 375 380

Tyr Gly Phe Arg Pro Asn Phe Val Ala Arg Pro Pro Ala Ala Gly
 385 390 395

<210> 7

5

<211> 143
 <212> PRT
 <213> 結核分枝桿菌

<400> 7

Met Ile Thr Asn Leu Arg Arg Arg Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Leu
 1 5 10 15

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

His Leu Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met Ser Glu Ile Ala
 35 40 45

Gly Leu Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala
 50 55 60

Pro Ser Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Ala Glu Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val
 85 90 95

Val Ser Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys
 100 105 110

Tyr Gln Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala Glu Asp Asp Ala
 115 120 125

Val Asn Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn
 130 135 140

<210> 8
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> 結核分枝桿菌

<400> 8

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met
 1 5 10 15

Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
 20 25 30

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

Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val
 50 55 60

Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro
 85 90 95

Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val
 100 105 110

Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly
 115 120 125

Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu
 130 135 140

Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser
 145 150 155 160

Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala
 165 170 175

Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu
 180 185 190

Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met
 195 200 205

Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser
 210 215 220

Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu
 225 230 235 240

Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro
 245 250 255

Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe
 260 265 270

Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly
 275 280 285

Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp
 290 295 300

Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser
 305 310 315 320

Ser Leu Gly Ala Gly
 325

<210> 9
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> 結核分枝桿菌

<400> 9

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

Leu Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val Asp Val Val
 20 25 30

Arg Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr Asp Pro Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu Gly Gly Cys
 50 55 60

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

Ala Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile Pro Ile Ala
 85 90 95

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Phe Thr Val Asn Glu Ser Arg Thr Ala Lys
 100 105 110

Gln Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val Ala Glu Gln
 115 120 125

Glu Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser Ala Ala Phe
 130 135 140

Val Val Ala Ser Gly Ser Leu Pro Pro Gly Val Ala Ala Asp Tyr Tyr
 145 150 155 160

Gln Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro Leu Ile Leu
 165 170 175

Asp Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly Val Phe Leu
 180 185 190

Leu Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly Ser Glu Leu
 195 200 205

Leu Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala Ala His Glu Leu Ile Asp Arg
 210 215 220

Gly Arg Ala Glu Val Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln Gly Ala Leu
 225 230 235 240

Leu Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile Pro Met Thr
 245 250 255

Ala Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asp Ala Met Val Ala Ala Ile Thr
 260 265 270

Val Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val Arg Leu Gly
 275 280 285

Asn Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr Ala Ala Cys
 290 295 300

Asn Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu Leu Ala Ala Glu Pro Thr
 305 310 315 320

Glu Val Gly Gln Asp Gln Tyr Val Trp His Pro Ile Val Asn Pro Glu
 325 330 335

Ala Ser Pro

- <210> 10
- <211> 143
- <212> PRT
- <213> 結核分枝桿菌

<400> 10

Met Thr Thr Ala Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly
 1 5 10 15

Glu His Glu Thr Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp
20 25 30

Ile Gly Ala Leu Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met
35 40 45

Leu Thr Asp Arg Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp
50 55 60

Pro Asn Thr Ala Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr
65 70 75 80

Val Asp Ala Asn Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu
85 90 95

His Gln Val Arg Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly
100 105 110

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

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

<210> 11
<211> 154
<212> PRT
<213> 結核分枝桿菌

<400> 11

Met Thr Pro Gly Leu Leu Thr Thr Ala Gly Ala Gly Arg Pro Arg Asp
1 5 10 15

Arg Cys Ala Arg Ile Val Cys Thr Val Phe Ile Glu Thr Ala Val Val
20 25 30

Ala Thr Met Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Ser Thr Ile Ser Ser Lys
35 40 45

Ala Asp Asp Ile Asp Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Glu Ser Gly Gly
50 55 60

Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile
65 70 75 80

Ser Gln Ala Thr Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala
 85 90 95

Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr
 100 105 110

Gln Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp
 115 120 125

Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu
 130 135 140

Thr Gly Gly Cys Ser Gly Ser Arg Asp Asp
 145 150

<210> 12
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> 結核分枝桿菌

<400> 12

Met Arg Ala Thr Val Gly Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Arg Glu Leu
 1 5 10 15

Arg Gln His Ala Ser Arg Tyr Leu Ala Arg Val Glu Ala Gly Glu Glu
 20 25 30

Leu Gly Val Thr Asn Lys Gly Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile Pro Val
 35 40 45

Gln Ala Ala Glu Arg Ser Arg Glu Ala Leu Ile Glu Ser Gly Val Leu
 50 55 60

Ile Pro Ala Arg Arg Pro Gln Asn Leu Leu Asp Val Thr Ala Glu Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Gly Arg Lys Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Asn Glu Met Arg
 85 90 95

Asp Glu Gln

<210> 13
 <211> 393

<212> PRT

<213> 結核分枝桿菌

<400> 13

Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met
 1 5 10 15

Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp
 20 25 30

Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser
 35 40 45

Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly
 50 55 60

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

Ala Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala
 85 90 95

Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala
 100 105 110

Glu Asn Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly
 115 120 125

Gln Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met
 130 135 140

Trp Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr
 165 170 175

Asn Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile
 180 185 190

Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu
 195 200 205

Gln Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu
 210 215 220

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

Val Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val
245 250 255

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

Ala Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met
275 280 285

Ser Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu
290 295 300

Gly Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser
305 310 315 320

Leu Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro
325 330 335

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

Ala Pro Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly His Ser Val Asn
355 360 365

Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro Ala Arg Ala Tyr
370 375 380

Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly
385 390

<210> 14
<211> 95
<212> PRT
<213> 結核分枝桿菌

<400> 14

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

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

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

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

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

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

<210> 15
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> N端截斷型 Rv0111 抗原(393-685)

<400> 15

Glu Gln Pro Ile Arg Arg Trp Arg Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val
 20 25 30

Val Pro Val Gly Ala Gly Pro Gly Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro
 35 40 45

Gly Val Ser Ala Val Ala Ala Val Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser
 50 55 60

Gln Pro Ala Pro Gly Pro Arg Asp Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser
 65 70 75 80

Val Phe Gly Asp Ser Ile Gly Trp Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro
 85 90 95

Thr Pro Gly Phe Arg Phe Ile Asp His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu
 100 105 110

Val Arg Gly Thr Pro Tyr Arg Tyr Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg
 115 120 125

Ala Glu Cys Asp Gly Trp Pro Ala Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg
 130 135 140

Asp Gln Pro Asp Val Ala Leu Leu Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val
 145 150 155 160

Asp Arg Val Asn Glu Gly Arg Trp Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe
 165 170 175

Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser Ile Val Gly
 180 185 190

Ser Thr Gly Val Arg Val Met Val Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly
 195 200 205

Gly Glu Lys Pro Asp Gly Arg Leu Tyr Pro Glu Asp Gln Pro Glu Arg
 210 215 220

Val Asn Lys Trp Asn Ala Met Leu His Asn Ala Ile Ser Gln His Ser
 225 230 235 240

Asn Val Gly Met Ile Asp Leu Asn Lys Lys Leu Cys Pro Asp Gly Val
 245 250 255

Tyr Thr Ala Lys Val Asp Gly Ile Lys Val Arg Ser Asp Gly Val His
 260 265 270

Leu Thr Gln Glu Gly Val Lys Trp Leu Ile Pro Trp Leu Glu Asp Ser
 275 280 285

Val Arg Val Ala Ser
 290

<210> 16
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> N與C端截斷型 RpfB

<400> 16

Thr Val Asp Gly Thr Ala Met Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val
 1 5 10 15

Ile Asp Ile Val Glu Glu Asn Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp
20 25 30

Leu Tyr Pro Ala Ala Gly Val Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val
35 40 45

Leu Arg Arg Ser Arg Pro Leu Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala
50 55 60

Lys Gln Val Trp Thr Thr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln
65 70 75 80

Leu Ala Met Thr Asp Thr Ala Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg
85 90 95

Val Pro Leu Ser Gly Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val
100 105 110

Gln Leu Asn Asp Gly Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro
115 120 125

Asn Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser
130 135 140

Asp His Val Val Pro Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln
145 150 155 160

Ile Gln Val Thr Arg Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro
165 170 175

Leu Pro Pro Asn Ala Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser
180 185 190

Arg Glu Val Val Glu Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr
195 200 205

Phe Ala Val Ala Glu Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val
210 215 220

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

Thr Lys Pro Gly Thr Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser
245 250

<210> 17
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> N端截斷型 Rv1733 (63-210)且無訊息胜肽

<400> 17

Ala Gly Thr Ala Val Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln
 1 5 10 15

Ala Gln Thr Arg His Pro Ala Thr Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly
 20 25 30

Val Ile Asp Ser Asn Thr Thr Ala Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys
 35 40 45

Ile Thr Val Pro Ala Arg Trp Val Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly
 50 55 60

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

Trp Val Asp Ser Ala Gly Gln Leu Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala
 85 90 95

Arg Ala Ile Ala Asp Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser
 100 105 110

Val Ala Ala Val Ala Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu
 115 120 125

Ile Arg Val Arg Asn Ala Ser Trp Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe
 130 135 140

Cys Thr Gln Arg
 145

<210> 18
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C端截斷型 Rv1807 (1-339)

<400> 18

Leu Asp Phe Ala Thr Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr
 1 5 10 15

Ser Gly Ala Gly Ser Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp His
 20 25 30

Gly Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ala Ser Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Val
 35 40 45

Leu Ser Thr Leu Thr Gly Glu Glu Trp His Gly Pro Ala Ser Ala Ser
 50 55 60

Met Thr Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala
 65 70 75 80

Val Arg Ala Glu Gln Ala Gly Ala Gln Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala
 85 90 95

Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Ala Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Glu Ala
 100 105 110

Asn Arg Ala Gln Leu Met Ala Leu Ile Ala Thr Asn Val Leu Gly Gln
 115 120 125

Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Thr Glu Ala Gln Tyr Ala Glu Met Trp
 130 135 140

Ser Gln Asp Ala Met Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Ala
 145 150 155 160

Ala Thr Gln Leu Thr Pro Phe Thr Glu Pro Val Gln Thr Thr Asn Ala
 165 170 175

Ser Gly Leu Ala Ala Gln Ser Ala Ala Ile Ala His Ala Thr Gly Ala
 180 185 190

Ser Ala Gly Ala Gln Gln Thr Thr Leu Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ile
 195 200 205

Pro Ser Val Leu Gln Gly Leu Ser Ser Ser Thr Ala Ala Thr Phe Ala
 210 215 220

Ser Gly Pro Ser Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Ser Trp
 225 230 235 240

Leu Asp Lys Leu Trp Ala Leu Leu Asp Pro Asn Ser Asn Phe Trp Asn
 245 250 255

Thr Ile Ala Ser Ser Gly Leu Phe Leu Pro Ser Asn Thr Ile Ala Pro
 260 265 270

Phe Leu Gly Leu Leu Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gly Asp
 275 280 285

Val Leu Gly Glu Ala Thr Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Leu Val Ala
 290 295 300

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

Gly Asn Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr
 325 330 335

Ala Ala Ala

<210> 19
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> N端截斷型 Rv1813 (35-143)且無訊息胜肽

<400> 19

Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met Ser Glu Ile Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala Pro Ser
 20 25 30

Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg Ala Glu
 35 40 45

Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val Val Ser
 50 55 60

Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys Tyr Gln
 65 70 75 80

Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala Glu Asp Asp Ala Val Asn
85 90 95

Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn
100 105

<210> 20
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N端截斷型 Ag85B (40-325)且無訊息胜肽

<400> 20

Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser
1 5 10 15

Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn
20 25 30

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

Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln
50 55 60

Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr
65 70 75 80

Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr
85 90 95

Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala
100 105 110

Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met
115 120 125

Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe
130 135 140

Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met
145 150 155 160

Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys
 165 170 175

Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn
 180 185 190

Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu
 195 200 205

Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn
 210 215 220

Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys
 225 230 235 240

Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn
 245 250 255

Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu
 260 265 270

Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly
 275 280 285

<210> 21
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C端截斷型(2-314)與突變型 D265N Rv2029

<400> 21

Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg Ile Ile Thr Leu
 1 5 10 15

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

Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr Asp Pro Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu Gly Gly Cys Ser
 50 55 60

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

Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile Pro Ile Ala Ala
 85 90 95

Ser Thr Arg Glu Ser Phe Thr Val Asn Glu Ser Arg Thr Ala Lys Gln
 100 105 110

Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val Ala Glu Gln Glu
 115 120 125

Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser Ala Ala Phe Val
 130 135 140

Val Ala Ser Gly Ser Leu Pro Pro Gly Val Ala Ala Asp Tyr Tyr Gln
 145 150 155 160

Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro Leu Ile Leu Asp
 165 170 175

Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly Val Phe Leu Leu
 180 185 190

Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly Ser Glu Leu Leu
 195 200 205

Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala Ala His Glu Leu Ile Asp Arg Gly
 210 215 220

Arg Ala Glu Val Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln Gly Ala Leu Leu
 225 230 235 240

Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile Pro Met Thr Ala
 245 250 255

Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asn Ala Met Val Ala Ala Ile Thr Val
 260 265 270

Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val Arg Leu Gly Asn
 275 280 285

Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr Ala Ala Cys Asn
 290 295 300

Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu
 305 310

<210> 22
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 催化結構域 RpfD

<400> 22

Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala
 1 5 10 15

Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala
 20 25 30

Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln
 35 40 45

Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly
 50 55 60

Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly
 65 70 75 80

Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly
 85 90 95

<210> 23
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C端截斷型 Rv3407 (2-66)

<400> 23

Arg Ala Thr Val Gly Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Arg Glu Leu Arg
 1 5 10 15

Gln His Ala Ser Arg Tyr Leu Ala Arg Val Glu Ala Gly Glu Glu Leu
 20 25 30

Gly Val Thr Asn Lys Gly Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile Pro Val Gln
 35 40 45

Ala Ala Glu Arg Ser Arg Glu Ala Leu Ile Glu Ser Gly Val Leu Ile
 50 55 60

Pro
65

<210> 24
<211> 352
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C端截斷型 Rv3478 (2-353)

<400> 24

Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr
1 5 10 15

Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp Asp
20 25 30

Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val
35 40 45

Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu
50 55 60

Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala
65 70 75 80

Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala
85 90 95

Tyr Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu
100 105 110

Asn Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln
115 120 125

Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met Trp
130 135 140

Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Thr
145 150 155 160

Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr Asn
165 170 175

Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp
 180 185 190

Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln
 195 200 205

Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly
 210 215 220

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

Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val Ser
 245 250 255

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

Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met Ser
 275 280 285

Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly
 290 295 300

Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala
 325 330 335

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

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FLAG 標籤

<400> 25

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> MYC 標籤

<400> 26

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10

<210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> His 標籤

<400> 27

His His His His His His
 1 5

<210> 28
 <211> 589
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物"SS-Flag-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His 標籤"

<400> 28

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
 20 25 30

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro
 35 40 45

Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn
 50 55 60

Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr
 65 70 75 80

Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser
 85 90 95

Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser
100 105 110

Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys
115 120 125

Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn
130 135 140

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

Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile
165 170 175

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

Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala
195 200 205

Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp
210 215 220

Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp
225 230 235 240

Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile
245 250 255

Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe
260 265 270

Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe
275 280 285

Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn
290 295 300

Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile
305 310 315 320

Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly
325 330 335

Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln
 340 345 350

Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln
 355 360 365

Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala
 370 375 380

Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met
 385 390 400

Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln
 405 410 415

Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn
 420 425 430

Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr
 435 440 445

Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly
 450 455 460

Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu
 465 470 475 480

Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser
 485 490 495

Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 500 505 510

Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala
 515 520 525

Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg
 530 535 540

Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser
 545 550 555 560

Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys
 565 570 575

Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu His His His His His His
 580 585

<210> 29
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物"Flag-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-His 標籤"

<400> 29

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

Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile
 20 25 30

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

Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn
 50 55 60

Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met
 65 70 75 80

Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala
 85 90 95

Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr
 100 105 110

Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr
 115 120 125

Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile
 130 135 140

Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser
 145 150 155 160

Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu
 165 170 175

Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro
 180 185 190

Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro
 195 200 205

Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly
 210 215 220

Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu
 225 230 235 240

Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala
 245 250 255

Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His
 260 265 270

Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu
 275 280 285

Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala
 290 295 300

Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln
 305 310 315 320

Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala
 325 330 335

Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp
 340 345 350

Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser
 355 360 365

Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu
 370 375 380

Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser
 405 410 415

Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp
 420 425 430

Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp
 435 440 445

Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr
 450 455 460

Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr
 465 470 475 480

Gly Met Phe Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His
 485 490 495

His His His His
 500

<210> 30
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物"SS-Flag-RPFB-Dhyb-Myc-TM-His 標籤"

<400> 30

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Ser Leu
 1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr
 20 25 30

Val Asp Gly Thr Ala Met Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile
 35 40 45

Asp Ile Val Glu Glu Asn Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp Leu
 50 55 60

Tyr Pro Ala Ala Gly Val Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu
 65 70 75 80

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

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

Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro
 340 345 350

Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr
 355 360 365

His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Glu Gln Lys Leu
 370 375 380

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu
 385 390 395 400

Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val
 405 410 415

Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn
 420 425 430

Val Ser Val Thr Ser Gln Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser
 435 440 445

His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu His His His His His His
 450 455 460

<210> 31
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物"Flag-RPFB-Dhyb-Myc-His 標籤"

<400> 31

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr Val Asp Gly Thr Ala Met
 1 5 10 15

Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile Asp Ile Val Glu Glu Asn
 20 25 30

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

Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu Arg Arg Ser Arg Pro Leu
 50 55 60

Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys Gln Val Trp Thr Thr Ala
 65 70 75 80

Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu Ala Met Thr Asp Thr Ala
 85 90 95

Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val Pro Leu Ser Gly Met Ala
 100 105 110

Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln Leu Asn Asp Gly Gly Leu
 115 120 125

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

Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp His Val Val Pro Ala Ala
 145 150 155 160

Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val Thr Arg Asn Arg
 165 170 175

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

Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val Val Glu Asp Pro
 195 200 205

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

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

Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro Gly Thr Glu Val
 245 250 255

Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Lys
 260 265 270

Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly
 275 280 285

Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser
 290 295 300

Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile
305 310 315 320

Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser
325 330 335

Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu
340 345 350

Ala Ala Glu Thr Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
355 360 365

His His His His His His
370

<210> 32
<211> 938
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合物"SS-Flag-RFPB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His 標籤"

<400> 32

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Ser Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr
20 25 30

Val Asp Gly Thr Ala Met Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile
35 40 45

Asp Ile Val Glu Glu Asn Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp Leu
50 55 60

Tyr Pro Ala Ala Gly Val Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu
65 70 75 80

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

Gln Val Trp Thr Thr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu
100 105 110

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

Pro Leu Ser Gly Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln
 130 135 140

Leu Asn Asp Gly Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn
 145 150 155 160

Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp
 165 170 175

His Val Val Pro Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile
 180 185 190

Gln Val Thr Arg Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu
 195 200 205

Pro Pro Asn Ala Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg
 210 215 220

Glu Val Val Glu Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe
 225 230 235 240

Ala Val Ala Glu Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala
 245 250 255

Asn Val Val Val Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr
 260 265 270

Lys Pro Gly Thr Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp
 275 280 285

Ala Ile Ala Gln Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly
 290 295 300

Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser
 305 310 315 320

Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile
 325 330 335

Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro
 340 345 350

Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr
 355 360 365

His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Ala Phe Ser Arg
 370 375 380

Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly
 385 390 395 400

Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala
 405 410 415

Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp
 420 425 430

Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser
 435 440 445

Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr
 450 455 460

Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr
 465 470 475 480

Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val
 485 490 495

Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser
 500 505 510

Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly
 515 520 525

Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu
 530 535 540

Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met
 545 550 555 560

Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln
 565 570 575

Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys
 580 585 590

Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu
 595 600 605

Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala
 610 615 620

Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn
 625 630 635 640

Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys
 645 650 655

Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile Met Tyr Asn
 660 665 670

Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly
 675 680 685

Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu
 690 695 700

Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln
 705 710 715 720

Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala
 725 730 735

Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp
 740 745 750

Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe
 755 760 765

Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser
 770 775 780

Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala
 785 790 795 800

Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln
 805 810 815

Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu
 820 825 830

Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly
835 840 845

Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
850 855 860

Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met Leu
865 870 875 880

Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu Ser
885 890 895

Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr Ser
900 905 910

Gln Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly
915 920 925

Glu Thr Arg Leu His His His His His His
930 935

<210> 33
<211> 849
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合物"Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-His 標籤"

<400> 33

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr Val Asp Gly Thr Ala Met
1 5 10 15

Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile Asp Ile Val Glu Glu Asn
20 25 30

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

Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu Arg Arg Ser Arg Pro Leu
50 55 60

Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys Gln Val Trp Thr Thr Ala
65 70 75 80

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

Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser
 325 330 335

Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu
 340 345 350

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

Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln
 370 375 380

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

Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala
 405 410 415

Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly
 420 425 430

Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys
 435 440 445

Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu
 450 455 460

Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala
 465 470 475 480

Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala
 485 490 495

Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu
 500 505 510

Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly
 515 520 525

Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp
 530 535 540

Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val
 545 550 555 560

Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn
 565 570 575
 Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val
 580 585 590
 Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly
 595 600 605
 His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu
 610 615 620
 Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser
 625 630 635 640
 Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly
 645 650 655
 His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly
 660 665 670
 Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly
 675 680 685
 Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala
 690 695 700
 Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu
 705 710 715 720
 Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys
 725 730 735
 Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala
 740 745 750
 Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp
 755 760 765
 Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser
 770 775 780
 Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala
 785 790 795 800

Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu
805 810 815

Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe
820 825 830

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His
835 840 845

His

<210> 34
<211> 1198
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合物"SS-Flag-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-TM-His
標籤"

<400> 34

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys
20 25 30

Ala Lys Val Gly Asp Trp Leu Val Ile Lys Gly Ala Thr Ile Asp Gln
35 40 45

Pro Asp His Arg Gly Leu Ile Ile Glu Val Arg Ser Ser Asp Gly Ser
50 55 60

Pro Pro Tyr Val Val Arg Trp Leu Glu Thr Asp His Val Ala Thr Val
65 70 75 80

Ile Pro Gly Pro Asp Ala Val Val Val Thr Ala Glu Glu Gln Asn Ala
85 90 95

Ala Asp Glu Arg Ala Gln His Arg Phe Gly Ala Val Gln Ser Ala Ile
100 105 110

Leu His Ala Arg Gly Thr Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met
115 120 125

Ser Glu Ile Ala Gly Leu Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala
 130 135 140

Ile Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg
 145 150 155 160

Thr Pro Ala Arg Ala Glu Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys
 165 170 175

Thr Cys Lys Val Val Ser Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr
 180 185 190

Asn Gly Ser Lys Tyr Gln Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala
 195 200 205

Glu Asp Asp Ala Val Asn Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp
 210 215 220

Ala Cys Asn Arg Ala Thr Val Gly Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Arg
 225 230 235 240

Glu Leu Arg Gln His Ala Ser Arg Tyr Leu Ala Arg Val Glu Ala Gly
 245 250 255

Glu Glu Leu Gly Val Thr Asn Lys Gly Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile
 260 265 270

Pro Val Gln Ala Ala Glu Arg Ser Arg Glu Ala Leu Ile Glu Ser Gly
 275 280 285

Val Leu Ile Pro Ala Arg Arg Pro Gln Asn Leu Leu Asp Val Thr Ala
 290 295 300

Glu Pro Ala Arg Gly Arg Lys Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Asn Glu
 305 310 315 320

Met Arg Asp Glu Gln Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn
 325 330 335

Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala
 340 345 350

Ala Lys Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser
 355 360 365

Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly
 370 375 380

Ser Ser Ala Gly Leu Met Ala Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp
 385 390 395 400

Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg
 405 410 415

Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro
 420 425 430

Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr
 435 440 445

Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn Gln Ala Ala
 450 455 460

Tyr Ser Gln Met Trp Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala
 465 470 475 480

Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala
 485 490 495

Pro Leu Ile Thr Asn Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val
 500 505 510

Glu Glu Ala Ile Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val
 515 520 525

Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro
 530 535 540

Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Thr Ala Val Ser Pro His Leu Ser
 545 550 555 560

Pro Leu Ser Asn Val Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met
 565 570 575

Gly Thr Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu His Ser Met Leu Lys Gly
 580 585 590

Leu Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly
 595 600 605

Val Trp Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 610 615 620

Ser Ser Gly Leu Gly Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 625 630 635 640

Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 645 650 655

Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 660 665 670

Ala Ala Gln Thr Ala Pro Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly
 675 680 685

His Ser Val Asn Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro
 690 695 700

Ala Arg Ala Tyr Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly Asp Phe Ala
 705 710 715 720

Thr Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ser Gly Ala Gly
 725 730 735

Ser Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp His Gly Leu Ser Ala
 740 745 750

Glu Leu Arg Ala Ser Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Val Leu Ser Thr Leu
 755 760 765

Thr Gly Glu Glu Trp His Gly Pro Ala Ser Ala Ser Met Thr Ala Ala
 770 775 780

Ala Ala Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Val Arg Ala Glu
 785 790 795 800

Gln Ala Gly Ala Gln Ala Glu Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Ala Ala
 805 810 815

Phe Ala Ala Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Glu Ala Asn Arg Ala Gln
 820 825 830

Leu Met Ala Leu Ile Ala Thr Asn Val Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala
 835 840 845

Ile Ala Ala Thr Glu Ala Gln Tyr Ala Glu Met Trp Ser Gln Asp Ala
 850 855 860

Met Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Thr Gln Leu
 865 870 875 880

Thr Pro Phe Thr Glu Pro Val Gln Thr Thr Asn Ala Ser Gly Leu Ala
 885 890 895

Ala Gln Ser Ala Ala Ile Ala His Ala Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ala
 900 905 910

Gln Gln Thr Thr Leu Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ile Pro Ser Val Leu
 915 920 925

Gln Gly Leu Ser Ser Ser Thr Ala Ala Thr Phe Ala Ser Gly Pro Ser
 930 935 940

Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Ser Trp Leu Asp Lys Leu
 945 950 955 960

Trp Ala Leu Leu Asp Pro Asn Ser Asn Phe Trp Asn Thr Ile Ala Ser
 965 970 975

Ser Gly Leu Phe Leu Pro Ser Asn Thr Ile Ala Pro Phe Leu Gly Leu
 980 985 990

Leu Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gly Asp Val Leu Gly Glu
 995 1000 1005

Ala Thr Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Leu Val Ala Pro Leu Gly
 1010 1015 1020

Ser Ala Gly Gly Leu Gly Gly Thr Val Ala Ala Gly Leu Gly Asn
 1025 1030 1035

Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr Ala
 1040 1045 1050

Ala Ala Pro Leu Ala Ser Pro Leu Gly Ser Ala Leu Gly Gly Thr
 1055 1060 1065

Pro Met Val Ala Pro Pro Pro Ala Val Ala Ala Gly Met Pro Gly
 1070 1075 1080

Met Pro Phe Gly Thr Met Gly Gly Gln Gly Phe Gly Arg Ala Val
 1085 1090 1095

Pro Gln Tyr Gly Phe Arg Pro Asn Phe Val Ala Arg Pro Pro Ala
 1100 1105 1110

Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val
 1115 1120 1125

Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe
 1130 1135 1140

Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln
 1145 1150 1155

Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr Ser Gln
 1160 1165 1170

Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly
 1175 1180 1185

Glu Thr Arg Leu His His His His His His
 1190 1195

<210> 35
 <211> 1109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物"Flag-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-His 標籤"

<400> 35

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Ala Lys Val Gly Asp Trp
 1 5 10 15

Leu Val Ile Lys Gly Ala Thr Ile Asp Gln Pro Asp His Arg Gly Leu
 20 25 30

Ile Ile Glu Val Arg Ser Ser Asp Gly Ser Pro Pro Tyr Val Val Arg
 35 40 45

Trp Leu Glu Thr Asp His Val Ala Thr Val Ile Pro Gly Pro Asp Ala
 50 55 60

Val Val Val Thr Ala Glu Glu Gln Asn Ala Ala Asp Glu Arg Ala Gln
 65 70 75 80
 His Arg Phe Gly Ala Val Gln Ser Ala Ile Leu His Ala Arg Gly Thr
 85 90 95
 Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met Ser Glu Ile Ala Gly Leu
 100 105 110
 Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala Pro Ser
 115 120 125
 Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg Ala Glu
 130 135 140
 Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val Val Ser
 145 150 155 160
 Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys Tyr Gln
 165 170 175
 Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala Glu Asp Asp Ala Val Asn
 180 185 190
 Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn Arg Ala Thr
 195 200 205
 Val Gly Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Arg Glu Leu Arg Gln His Ala
 210 215 220
 Ser Arg Tyr Leu Ala Arg Val Glu Ala Gly Glu Glu Leu Gly Val Thr
 225 230 235 240
 Asn Lys Gly Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile Pro Val Gln Ala Ala Glu
 245 250 255
 Arg Ser Arg Glu Ala Leu Ile Glu Ser Gly Val Leu Ile Pro Ala Arg
 260 265 270
 Arg Pro Gln Asn Leu Leu Asp Val Thr Ala Glu Pro Ala Arg Gly Arg
 275 280 285
 Lys Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Asn Glu Met Arg Asp Glu Gln Val
 290 295 300

Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala
 305 310 315 320
 Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp Asp Ser
 325 330 335
 Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val
 340 345 350
 Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met
 355 360 365
 Ala Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly
 370 375 380
 Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr
 385 390 395 400
 Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn
 405 410 415
 Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn
 420 425 430
 Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met Trp Gly
 435 440 445
 Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala
 450 455 460
 Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr Asn Pro
 465 470 475 480
 Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp Thr
 485 490 495
 Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln
 500 505 510
 Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly
 515 520 525
 Leu Trp Thr Ala Val Ser Pro His Leu Ser Pro Leu Ser Asn Val Ser
 530 535 540

Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val Ser Met
 545 550 555 560
 Thr Asn Thr Leu His Ser Met Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Ala Ala
 565 570 575
 Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met Ser Ser
 580 585 590
 Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Ala
 595 600 605
 Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser
 610 615 620
 Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala
 625 630 635 640
 Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr Ala Pro
 645 650 655
 Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly His Ser Val Asn Ala Gly
 660 665 670
 Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ala Ile
 675 680 685
 Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly Asp Phe Ala Thr Leu Pro Pro Glu Ile
 690 695 700
 Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Ala Pro Met Leu Ala
 705 710 715 720
 Ala Ala Ser Ala Trp His Gly Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ala Ser Ala
 725 730 735
 Leu Ser Tyr Ser Ser Val Leu Ser Thr Leu Thr Gly Glu Glu Trp His
 740 745 750
 Gly Pro Ala Ser Ala Ser Met Thr Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Val Ala
 755 760 765
 Trp Met Ser Val Thr Ala Val Arg Ala Glu Gln Ala Gly Ala Gln Ala
 770 775 780

Glu Ala Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Ala Thr Val Pro
785 790 795 800

Pro Pro Val Ile Glu Ala Asn Arg Ala Gln Leu Met Ala Leu Ile Ala
805 810 815

Thr Asn Val Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Thr Glu Ala
820 825 830

Gln Tyr Ala Glu Met Trp Ser Gln Asp Ala Met Ala Met Tyr Gly Tyr
835 840 845

Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Thr Gln Leu Thr Pro Phe Thr Glu Pro
850 855 860

Val Gln Thr Thr Asn Ala Ser Gly Leu Ala Ala Gln Ser Ala Ala Ile
865 870 875 880

Ala His Ala Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ala Gln Gln Thr Thr Leu Ser
885 890 895

Gln Leu Ile Ala Ala Ile Pro Ser Val Leu Gln Gly Leu Ser Ser Ser
900 905 910

Thr Ala Ala Thr Phe Ala Ser Gly Pro Ser Gly Leu Leu Gly Ile Val
915 920 925

Gly Ser Gly Ser Ser Trp Leu Asp Lys Leu Trp Ala Leu Leu Asp Pro
930 935 940

Asn Ser Asn Phe Trp Asn Thr Ile Ala Ser Ser Gly Leu Phe Leu Pro
945 950 955 960

Ser Asn Thr Ile Ala Pro Phe Leu Gly Leu Leu Gly Gly Val Ala Ala
965 970 975

Ala Asp Ala Ala Gly Asp Val Leu Gly Glu Ala Thr Ser Gly Gly Leu
980 985 990

Gly Gly Ala Leu Val Ala Pro Leu Gly Ser Ala Gly Gly Leu Gly Gly
995 1000 1005

Thr Val Ala Ala Gly Leu Gly Asn Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu
1010 1015 1020

Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr Ala Ala Ala Pro Leu Ala Ser Pro
 1025 1030 1035

Leu Gly Ser Ala Leu Gly Gly Thr Pro Met Val Ala Pro Pro Pro
 1040 1045 1050

Ala Val Ala Ala Gly Met Pro Gly Met Pro Phe Gly Thr Met Gly
 1055 1060 1065

Gly Gln Gly Phe Gly Arg Ala Val Pro Gln Tyr Gly Phe Arg Pro
 1070 1075 1080

Asn Phe Val Ala Arg Pro Pro Ala Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile
 1085 1090 1095

Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
 1100 1105

<210> 36
 <211> 973
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物"SS-Flag-Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733*-Myc-His 標籤"

<400> 36

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
 20 25 30

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro
 35 40 45

Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn
 50 55 60

Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr
 65 70 75 80

Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser
 85 90 95

Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser
 100 105 110

Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys
 115 120 125

Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn
 130 135 140

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

Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile
 165 170 175

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

Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala
 195 200 205

Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp
 210 215 220

Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp
 225 230 235 240

Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile
 245 250 255

Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe
 260 265 270

Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe
 275 280 285

Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn
 290 295 300

Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Thr Thr Ala
 305 310 315 320

Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly Glu His Glu Thr
 325 330 335

Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu
 340 345 350

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

Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala
 370 375 380

Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn
 385 390 395 400

Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg
 405 410 415

Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu
 420 425 430

Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val
 435 440 445

Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Thr Val Asp Gly Thr
 450 455 460

Ala Met Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile Asp Ile Val Glu
 465 470 475 480

Glu Asn Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp Leu Tyr Pro Ala Ala
 485 490 495

Gly Val Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu Arg Arg Ser Arg
 500 505 510

Pro Leu Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys Gln Val Trp Thr
 515 520 525

Thr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu Ala Met Thr Asp
 530 535 540

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

Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln Leu Asn Asp Gly
 565 570 575

Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn Val Ala Gly Leu
 580 585 590

Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp His Val Val Pro
 595 600 605

Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val Thr Arg
 610 615 620

Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu Pro Pro Asn Ala
 625 630 635 640

Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val Val Glu
 645 650 655

Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe Ala Val Ala Glu
 660 665 670

Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala Asn Val Val Val
 675 680 685

Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro Gly Thr
 690 695 700

Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln
 705 710 715 720

Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr
 725 730 735

Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val
 740 745 750

Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp
 755 760 765

Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser
 770 775 780

Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr
 785 790 795 800

Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Ala Gly Thr Ala Val Gln Asp Ser
 805 810 815

Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His Pro Ala Thr
 820 825 830

Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn Thr Thr Ala
 835 840 845

Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala Arg Trp Val
 850 855 860

Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys Pro Gly Thr
 865 870 875 880

Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala Gly Gln Leu
 885 890 895

Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp Ala Ala Leu
 900 905 910

Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala Gly Ala Leu
 915 920 925

Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn Ala Ser Trp
 930 935 940

Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu Gln Lys Leu
 945 950 955 960

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His His His His His His
 965 970

<210> 37
 <211> 624
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物"SS-Flag-Ag85B*-Rv2626-Rv1733*-Myc-His 標籤"

<400> 37

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
 20 25 30

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro
 35 40 45

Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn
 50 55 60

Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr
 65 70 75 80

Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser
 85 90 95

Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser
 100 105 110

Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys
 115 120 125

Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn
 130 135 140

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

Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile
 165 170 175

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

Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala
 195 200 205

Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp
 210 215 220

Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp
 225 230 235 240

Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile
 245 250 255

Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe
 260 265 270

Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe
 275 280 285

Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn
 290 295 300

Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Thr Thr Ala
 305 310 315 320

Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly Glu His Glu Thr
 325 330 335

Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu
 340 345 350

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

Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala
 370 375 380

Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn
 385 390 395 400

Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg
 405 410 415

Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu
 420 425 430

Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val
 435 440 445

Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Ala Gly Thr Ala Val
 450 455 460

Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His
 465 470 475 480

Pro Ala Thr Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn
 485 490 495

Thr Thr Ala Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala
 500 505 510

Arg Trp Val Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys
515 520 525

Pro Gly Thr Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala
530 535 540

Gly Gln Leu Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp
545 550 555 560

Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala
565 570 575

Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn
580 585 590

Ala Ser Trp Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu
595 600 605

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His His His His His His
610 615 620

<210> 38
<211> 949
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合物"SS-Flag-Rv2029*-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*-Myc-His 標籤"

<400> 38

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asp Tyr Lys Asp
20 25 30

Asp Asp Asp Lys Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg
35 40 45

Ile Ile Thr Leu Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val
50 55 60

Asp Val Val Arg Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr
65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu
85 90 95

Gly Gly Cys Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ala Gly Gly Ser Thr Gly Ser
100 105 110

Leu Leu Met Ala Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile
115 120 125

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

Thr Ala Lys Gln Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val
145 150 155 160

Ala Glu Gln Glu Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser
165 170 175

Ala Ala Phe Val Val Ala Ser Gly Ser Leu Pro Pro Gly Val Ala Ala
180 185 190

Asp Tyr Tyr Gln Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro
195 200 205

Leu Ile Leu Asp Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly
210 215 220

Val Phe Leu Leu Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly
225 230 235 240

Ser Glu Leu Leu Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala Ala His Glu Leu
245 250 255

Ile Asp Arg Gly Arg Ala Glu Val Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln
260 265 270

Gly Ala Leu Leu Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile
275 280 285

Pro Met Thr Ala Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asn Ala Met Val Ala
290 295 300

Ala Ile Thr Val Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val
305 310 315 320

Arg Leu Gly Asn Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr
 325 330 335
 Ala Ala Cys Asn Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu Thr Thr Ala
 340 345 350
 Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly Glu His Glu Thr
 355 360 365
 Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu
 370 375 380
 Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met Leu Thr Asp Arg
 385 390 395 400
 Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala
 405 410 415
 Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn
 420 425 430
 Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg
 435 440 445
 Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu
 450 455 460
 Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val
 465 470 475 480
 Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Ala Gly Thr Ala Val
 485 490 495
 Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His
 500 505 510
 Pro Ala Thr Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn
 515 520 525
 Thr Thr Ala Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala
 530 535 540
 Arg Trp Val Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys
 545 550 555 560

Pro Gly Thr Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala
 565 570 575
 Gly Gln Leu Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp
 580 585 590
 Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala
 595 600 605
 Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn
 610 615 620
 Ala Ser Trp Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu
 625 630 635 640
 Gln Pro Ile Arg Arg Trp Arg Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu
 645 650 655
 Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val Val
 660 665 670
 Pro Val Gly Ala Gly Pro Gly Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro Gly
 675 680 685
 Val Ser Ala Val Ala Ala Val Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser Gln
 690 695 700
 Pro Ala Pro Gly Pro Arg Asp Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser Val
 705 710 715 720
 Phe Gly Asp Ser Ile Gly Trp Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro Thr
 725 730 735
 Pro Gly Phe Arg Phe Ile Asp His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu Val
 740 745 750
 Arg Gly Thr Pro Tyr Arg Tyr Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg Ala
 755 760 765
 Glu Cys Asp Gly Trp Pro Ala Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg Asp
 770 775 780
 Gln Pro Asp Val Ala Leu Leu Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val Asp
 785 790 795 800

Arg Val Asn Glu Gly Arg Trp Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe Asp
805 810 815

Ala Tyr Leu Asn Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser Ile Val Gly Ser
820 825 830

Thr Gly Val Arg Val Met Val Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly Gly
835 840 845

Glu Lys Pro Asp Gly Arg Leu Tyr Pro Glu Asp Gln Pro Glu Arg Val
850 855 860

Asn Lys Trp Asn Ala Met Leu His Asn Ala Ile Ser Gln His Ser Asn
865 870 875 880

Val Gly Met Ile Asp Leu Asn Lys Lys Leu Cys Pro Asp Gly Val Tyr
885 890 895

Thr Ala Lys Val Asp Gly Ile Lys Val Arg Ser Asp Gly Val His Leu
900 905 910

Thr Gln Glu Gly Val Lys Trp Leu Ile Pro Trp Leu Glu Asp Ser Val
915 920 925

Arg Val Ala Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His
930 935 940

His His His His His
945

<210> 39
<211> 848
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合物"SS-Flag-Rv2029*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*-Myc-His 標籤"

<400> 39

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asp Tyr Lys Asp
20 25 30

Asp Asp Asp Lys Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg
 35 40 45

Ile Ile Thr Leu Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val
 50 55 60

Asp Val Val Arg Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr
 65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu
 85 90 95

Gly Gly Cys Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ala Gly Gly Ser Thr Gly Ser
 100 105 110

Leu Leu Met Ala Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile
 115 120 125

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

Thr Ala Lys Gln Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val
 145 150 155 160

Ala Glu Gln Glu Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser
 165 170 175

Ala Ala Phe Val Val Ala Ser Gly Ser Leu Pro Pro Gly Val Ala Ala
 180 185 190

Asp Tyr Tyr Gln Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro
 195 200 205

Leu Ile Leu Asp Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly
 210 215 220

Val Phe Leu Leu Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly
 225 230 235 240

Ser Glu Leu Leu Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala Ala His Glu Leu
 245 250 255

Ile Asp Arg Gly Arg Ala Glu Val Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln
 260 265 270

Gly Ala Leu Leu Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile
 275 280 285

Pro Met Thr Ala Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asn Ala Met Val Ala
 290 300

Ala Ile Thr Val Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val
 305 310 315 320

Arg Leu Gly Asn Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr
 325 330 335

Ala Ala Cys Asn Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu Ser Gln Ile
 340 345 350

Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly
 355 360 365

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

Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln
 385 390 395 400

Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala
 405 410 415

Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met
 420 425 430

Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln
 435 440 445

Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn
 450 455 460

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

Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly
 485 490 495

Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu
 500 505 510

Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser
 515 520 525
 Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Glu Gln Pro Ile Arg Arg
 530 535 540
 Trp Arg Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu Ala Ala Ala Thr Val
 545 550 555 560
 Ala Ser Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val Val Pro Val Gly Ala Gly
 565 570 575
 Pro Gly Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro Gly Val Ser Ala Val Ala
 580 585 590
 Ala Val Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser Gln Pro Ala Pro Gly Pro
 595 600 605
 Arg Asp Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser Val Phe Gly Asp Ser Ile
 610 615 620
 Gly Trp Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro Thr Pro Gly Phe Arg Phe
 625 630 635 640
 Ile Asp His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu Val Arg Gly Thr Pro Tyr
 645 650 655
 Arg Tyr Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg Ala Glu Cys Asp Gly Trp
 660 665 670
 Pro Ala Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg Asp Gln Pro Asp Val Ala
 675 680 685
 Leu Leu Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val Asp Arg Val Asn Glu Gly
 690 695 700
 Arg Trp Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe Asp Ala Tyr Leu Asn Ala
 705 710 715 720
 Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser Ile Val Gly Ser Thr Gly Val Arg Val
 725 730 735
 Met Val Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly Gly Glu Lys Pro Asp Gly
 740 745 750

Arg Leu Tyr Pro Glu Asp Gln Pro Glu Arg Val Asn Lys Trp Asn Ala
 755 760 765

Met Leu His Asn Ala Ile Ser Gln His Ser Asn Val Gly Met Ile Asp
 770 775 780

Leu Asn Lys Lys Leu Cys Pro Asp Gly Val Tyr Thr Ala Lys Val Asp
 785 790 795 800

Gly Ile Lys Val Arg Ser Asp Gly Val His Leu Thr Gln Glu Gly Val
 805 810 815

Lys Trp Leu Ile Pro Trp Leu Glu Asp Ser Val Arg Val Ala Ser Glu
 820 825 830

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His His His His His His
 835 840 845

- <210> 40
- <211> 1770
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"SS-Flag-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His 標籤"
 (pTG18266)之編碼核苷酸序列

<400> 40
 atggttcctc aggctctcct gtttgtacctt cttctggttt ttccattgtg ttttgggaaa 60
 ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggccttct ctagacctgg cctgcccgtg 120
 gaatacctgc aggtcccaag cccagcatg ggccgggata tcaaggtgca gtttcagagc 180
 ggccggcaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagccca ggacgactac 240
 aacggctggg acatcaaac ccctgccttc gagtgggtact accagagcgg cctgtccatc 300
 gtgatgcctg tgggcccga gagcagcttc tacagcgact ggtacagccc cgctgtggc 360
 aaagccggct gccagacct caagtgggag acattcctga cctccgagct gccccagtgg 420
 ctgagcgcca atagagccgt gaagcctaca ggctctgccg ccatcggact gagcatggcc 480
 ggaagctctg ccatgatcct ggccgcctat caccctcagc agttcatcta cgccggcagc 540
 ctgtctgccc tgctggacct ttctcagggc atgggccctt ctctgatcgg actggctatg 600
 ggcgacgctg gcggatacaa ggccgccgat atgtggggcc ctagcagcga tctgcctgg 660
 gagagaaacg accccaccca gcagatcccc aagctggtgg ccaacaacac ccggctgtgg 720

gtgtactgcg gcaacggcac ccctaatagaa ctgggaggag ccaatatccc cgccgagttc 780
 ctggaaaact tcgtgaggag cagcaacctg aagttccagg atgcctacaa cgccgctggc 840
 ggccacaacg ccgtgttcaa ctcccctccc aatggcacc cagctggga gtactgggga 900
 gcccagctga acgcatgaa gggcgatctg cagtccctc tgggagccgg cagccagatc 960
 atgtacaact accccgcat gctggggcac gccggcgata tggctggata tgccggcaca 1020
 ctgcagagcc tgggtgccga gattgccgtg gaacaggctg ccctccagtc tgccctggcag 1080
 ggcgataccg gcatacaca ccaggcttgg caggcccagt ggaaccaggc catggaagat 1140
 ctcgtgctgg cctaccagc catgagcagc acacacgagg ccaacacat ggccatgatg 1200
 gcccgggata cagccgaggc cgctaagtgg ggaggaaccg agcagcagtg gaacttcgcc 1260
 ggaattgagg ccgtgccag cgccatccag ggcaacgtga catccatcca cagcctgctg 1320
 gacgagggca agcagagcct gacaaaactg gctgctgcct ggggaggctc tggctctgaa 1380
 gcttatcagg gcgtgcagca gaagtgggac gccaccgcca ccgagctgaa caacgccctg 1440
 cagaacctgg cccggacaat ctctgaagcc ggacaggcca tggccagcac cgagggcaat 1500
 gtgaccggca tgtttgccga acaaaaactc atctcagaag aggatctgag ctatgtatta 1560
 ctgagtgcag gggccctgac tgccctgatg ttgataattt tcctgatgac atgtttaga 1620
 agagtcaatc gatcagaacc tacgcaacac aatctcagag ggacaggag ggaggtgtca 1680
 gtcactcccc aaagcgggaa gatcatatct tcatgggaat cacacaagag tgggggtgag 1740
 accagactgc atcatcatca tcatcattga 1770

<210> 41
 <211> 1503
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"Flag-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-His 標籤" (pTG18296)
 之編碼核苷酸序列

<400> 41
 atggattaca aggatgacga cgataaggcc ttctctagac ctggcctgcc cgtggaatac 60
 ctgcaggctc caagccccag catgggcccgg gatatacaagg tgcagtttca gagcggcggc 120
 aacaacagcc ctgccgtgta tctgctggat ggccctgagag cccaggacga ctacaacggc 180
 tgggacatca acaccctgc ctctgagtg tactaccaga gcggcctgtc catcgtgatg 240
 cctgtgggag gccagagcag ctctacagc gactgggtaca gccccgctg tggcaaagcc 300
 ggctgccaga cctacaagtg ggagacattc ctgacctccg agctgccccca gtggctgagc 360

gccaatagag ccgtgaagcc tacaggctct gccgcatcg gactgagcat ggccggaagc 420
 tctgcatga tcttgccgc ctatcacct cagcagttca tctacgccg cagcctgtct 480
 gccctgctgg acccttctca gggcatgggc ctttctctga tcggactggc tatgggagac 540
 gctggcggat acaaggccgc cgatatgtgg ggccctagca gcgatcctgc ctgggagaga 600
 aacgaccca cccagcagat cccaagctg gtggccaaca acaccggct gtgggtgtac 660
 tgcggcaacg gcaccctaa tgaactgggc ggagccaata tccccgccga gttcctggaa 720
 aacttcgtgc ggagcagcaa cctgaagttc caggatgcct acaacgccgc tggcggccac 780
 aacgccgtgt tcaacttccc tcccaatggc acccacagct gggagtactg gggagcccag 840
 ctgaacgcca tgaagggcga tctgcagtcc tctctgggag ccggcagcca gatcatgtac 900
 aactaccccg ccatgctggg ccacgccggc gatatggctg gatatgccgg cacactgcag 960
 agcctgggtg ccgagattgc cgtggaacag gctgccctcc agtctgcctg gcagggcgat 1020
 accggcatca cataccaggc ttggcaggcc cagtggaacc aggccatgga agatctcgtg 1080
 cgggcctacc acgccatgag cagcacacac gaggccaaca ccatggccat gatggcccgg 1140
 gatacagccg aggccgctaa gtggggagga accgagcagc agtgggaactt cgccggaatt 1200
 gaggccgctg ccagcgccat ccagggcaac gtgacatcca tccacagcct gctggacgag 1260
 ggcaagcaga gcctgacaaa actggctgct gcctggggcg gctctggctc tgaagcttat 1320
 cagggcgtgc agcagaagtg ggacgccacc gccaccgagc tgaacaacgc cctgcagaac 1380
 ctggcccgga caatctctga agccggacag gccatggcca gcaccgaggg caatgtgacc 1440
 ggcatgtttg ccgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgcatcatca tcatcatcat 1500
 tga 1503

<210> 42
 <211> 1392
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"SS-Flag-RPFB-Dhyb-Myc-TM-His 標籤"(pTG18267)之
 編碼核苷酸序列

<400> 42
 atggtagcac aagcgtggt acttgctcca ctgcttggt tctctttatg ttttgaaaa 60
 ttccaatag attacaagga tgacgacgat aagaccgtg acggcaccgc catgagagtg 120
 accacatga agtccagagt gatcgacatc gtggaagaga acggcttcag cgtggacgac 180
 cgggacgacc tgtatcctgc tgctggagtg caggtccacg acgccgatac aatcgtgctg 240

cggagaagca gacccctgca gatcagcctg gatggccacg acgccaagca ggtctggacc 300
 acagccagca cagtggatga agccctggcc cagctggcca tgaccgatac agctccagcc 360
 gccgctagca gagctagcag agtgcctctg tctggcatgg ccctgcctgt ggtgtctgcc 420
 aagaccgtgc agctgaacga tggcggcctc gtgcggacag tgcattctgcc tgcctctaata 480
 gtggccggcc tgcctgtctgc agcaggcgtg ccaactgctgc agagcgatca tgtggtgcct 540
 gccgccacag ccctatcgt ggaaggcatg cagatccagg tcacacggaa ccggatcaag 600
 aaagtgaccg agcggctgcc cctgcctccc aacgctagaa gagtggaaga tcccagatg 660
 aacatgagca gagagggtgt cgaggaccct ggcgtgccag gcacacagga tgtgacattc 720
 gccgtggccg aagtgaacgg cgtggaaacc ggcagactgc ccgtggccaa tgtggtggtc 780
 acaccagccc atgaggccgt cgtcagagtg ggcacaaagc ctggcacaga ggtgccacc 840
 gtgatcgacg gcagcatctg ggatgccatt gcccagtgc aagagcggcgg aaactgggcc 900
 gccaataccg gcaatggcct ctatggcggc ctgcagatct ctcaggccgc ctgggattct 960
 aatggcggcg tgggatctcc tggcctgcc tctccacagc agcagatcga ggtggccgac 1020
 aacatcatga agacagccgg acctggcggc tggcccaagt gtagcagttg ttctcagggc 1080
 gacgcccctc tgggcagcct gacacacatc ctgacatttc tggccgccga gacaggcggg 1140
 gaacaaaaac tcattctcaga agaggatctg agctatgttc ttctctctgc tggaaactta 1200
 atagctttaa tgttaataat attcttaata acgtgctgta aaagggtaga ccgtccagag 1260
 tcaactcagc gcagccttag gggactctggg agaaatgttt ccgtgacatc acagagtgga 1320
 aaatttatct cgtcttggga atctcataag agtggaggcg aaacacgtct tcattcatc 1380
 catcatcatt ga 1392

<210> 43
 <211> 1125
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"Flag-RPFB-Dhyb-Myc-His 標籤"(pTG18307)之編碼核苷酸序列

<400> 43
 atggattaca aggatgacga cgataagacc gtggacggca ccgcatgag agtgaccacc 60
 atgaagtcca gagtgatcga catcgtggaa gagaacggct tcagcgtgga cgaccgggac 120
 gacctgtatc ctgctgctgg agtgcaggtc cacgacgccg atacaatcgt gctgcggaga 180
 agcagacccc tgcagatcag cctggatggc cacgacgcc aagcaggtctg gaccacagcc 240

S

agcacagtgg atgaagccct ggcccagctg gccatgaccg atacagctcc agccgccgct 300
 agcagagcta gcagagtgcc tctgtctggc atggccctgc ctgtggtgtc tgccaagacc 360
 gtgcagctga acgatggcgg cctcgtgcgg acagtgcattc tgcctgctcc taatgtggcc 420
 ggccctgctgt ctgcagcagg cgtgccactg ctgcagagcg atcatgtggt gcctgccgcc 480
 acagccccta tcgtggaagg catgcagatc caggtcacac ggaaccggat caagaaagtg 540
 accgagcggc tgcccctgcc tcccacgct agaagagtgg aagatcccga gatgaacatg 600
 agcagagagg tggtcgagga ccctggcgtg ccaggcacac aggatgtgac attcgccgtg 660
 gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga ctgcccgtgg ccaatgtggt ggtcacacca 720
 gcccatgagg ccgtcgtcag agtgggcaca aagcctggca cagaggtgcc acccgtgatc 780
 gacggcagca tctgggatgc cattgccagc tgcaagagcg gcggaaactg ggccccaat 840
 accggcaatg gcctctatgg cggcctgcag atctctcagg ccgcctggga ttctaattggc 900
 ggcggtgggat ctcttcccgc tgcctctcca cagcagcaga tcgaggtggc cgacaacatc 960
 atgaagacag ccggacctgg cgcctggccc aagtgtagca gttgttctca gggcgacgcc 1020
 cctctgggca gcctgacaca catcctgaca tttctggccg ccgagacagg cggagaacaa 1080
 aaactcatct cagaagagga tctgcatcat catcatcatc attga 1125

<210> 44
 <211> 2817
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"SS-Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His
 標籤"(pTG18268)之編碼核苷酸序列

<400> 44
 atgtaccac aagcgtggt acttgtccca ctgcttggtt tctctttatg ttttggaaaa 60
 ttcccaatag attacaagga tgacgacgat aagaccgtgg acggcaccgc catgagagtg 120
 accaccatga agtccagagt gatcgacatc gtggaagaga acggcttcag cgtggacgac 180
 cgggacgacc tgtatcctgc tgctggagtg caggtccacg acgccgatac aatcgtgctg 240
 cggagaagca gaccctgca gatcagcctg gatggccacg acgccaagca ggtctggacc 300
 acagccagca cagtggatga agccctggcc cagctggcca tgaccgatac agctccagcc 360
 gccgctagca gagctagcag agtgccctctg tctggcatgg ccctgcctgt ggtgtctgcc 420
 aagaccgtgc agctgaacga tggcggcctc gtgcggacag tgcattctgc tgctcctaata 480
 gtggccggcc tgctgtctgc agcaggcgtg ccaactgctgc agagcgatca tgtggtgcct 540

gccgccacag cccctatcgt ggaaggcatg cagatccagg tcacacggaa ccggatcaag 600
 aaagtgaccg agcggctgcc cctgcctccc aacgctagaa gagtggaaga tcccgagatg 660
 aacatgagca gagaggctggc cgaggaccct ggctgtccag gcacacagga tgtgacattc 720
 gccgtggccg aagtgaacgg cgtggaaacc ggccagactgc ccgtggccaa tgtggtggtc 780
 acaccagccc atgaggccgt cgtcagagtg ggcaaaaagc ctggcacaga ggtgccaccc 840
 gtgatcgacg gcagcatctg ggatgccatt gcccagtgca agagcggcgg aaactgggcc 900
 gccaataccg gcaatggcct ctatggcggc ctgcagatct ctgaggccgc ctgggattct 960
 aatggcggcg tgggatctcc tgccgtgcc tctccacagc agcagatcga ggtggccgac 1020
 aacatcatga agacagccgg acctggcggc tggcccaagt gtagcagttg ttctcagggc 1080
 gacgccctc tgggcagcct gacacacatc ctgacatttc tggccgccga gacaggcggga 1140
 gccttctcta gacctggcct gcccgtggaa tacctgcagg tcccaagccc cagcatgggc 1200
 cgggatatca aggtgcagtt tcagagcggc ggcaacaaca gccctgccgt gtatctgctg 1260
 gatggcctga gagcccagga cgactacaac ggctgggaca tcaacacccc tgccttcgag 1320
 tggfactacc agagcggcct gtccatcgtg atgcctgtgg gcggccagag cagcttctac 1380
 agcgaactgt acagccccgc ctgtggcaaa gccggctgcc agacctaaa gtgggagaca 1440
 ttctgacct ccgagctgcc ccagtggctg agcgccaata gagccgtgaa gcctacaggc 1500
 tctgccgcca tcggactgag catggccgga agctctgcca tgatcctggc cgcctatcac 1560
 cctcagcagt tcatctacgc cggcagcctg tctgccctgc tggacccttc tcagggcatg 1620
 ggcccttctc tgatcggact ggctatgggc gacgctggcg gatacaaggc cgccgatatg 1680
 tggggcccta gcagcgatcc tgccctgggag agaaacgacc ccaccagca gatcccaag 1740
 ctggtggcca acaacacccg gctgtgggtg tactgcggca acggcacccc taatgaactg 1800
 ggccggagcca atatccccgc cgagttcctg gaaaacttcg tgcggagcag caacctgaag 1860
 ttccaggatg cctacaacgc cgctggcggc cacaacgccg tgttcaactt ccctcccaat 1920
 ggcaccaca gctgggagta ctggggagcc cagctgaacg ccatgaaggg cgatctgcag 1980
 tcctctctgg gagccggcag ccagatcatg tacaactacc ccgcatgct gggccacgcc 2040
 ggcgatatgg ctggatatgc cggcacactg cagagcctgg gtgccgagat tgccgtggaa 2100
 caggctgccc tccagtctgc ctggcagggc gataccggca tcacatacca ggcttggcag 2160
 gccagtgga accagccat ggaagatctc gtgcgggctt accacgccat gagcagcaca 2220
 cacgaggcca acacatggc catgatggcc cgggatacag ccgaggccgc taagtgggga 2280

ggaaccgagc agcagtgga cttcgccgga attgaggccg ctgccagcgc catccagggc 2340
 aacgtgacat ccatccacag cctgctggac gagggcaagc agagcctgac aaaactggct 2400
 gctgcctggg gcggtcttgg ctctgaagct tctcagggcg tgcagcagaa gtgggacgcc 2460
 accgccaccg agctgaacaa cgccctgcag aacctggccc ggacaatctc tgaagccgga 2520
 caggccatgg ccagcaccga gggcaatgtg accggcatgt ttgccgaaca aaaactcatc 2580
 tcagaagagg atctgagcta tgttcttctc tctgctggaa ctttaatagc tttaatgtta 2640
 ataatatctt taataacgtg ctgtaaaagg gtagaccgtc cagagtcaac tcagcgcagc 2700
 cttaggggta ctgggagaaa tgtttccgtg acatcacaga gtggaaaatt tatctcgtct 2760
 tgggaatctc ataagagtgg aggcgaaaca cgtcttcatc atcatcatca tcattga 2817

<210> 45
 <211> 2550
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6-Myc-His 標籤"
 (pTG18297)之編碼核苷酸序列

<400> 45
 atggattaca aggatgacga cgataagacc gtggacggca ccgcatgag agtgaccacc 60
 atgaagtcca gagtgatcga catcgtggaa gagaacggct tcagcgtgga cgaccgggac 120
 gacctgtatc ctgctgctgg agtgcaggtc cacgacgccg atacaatcgt gctgcggaga 180
 agcagacccc tgcagatcag cctggatggc cacgacgcca agcaggtctg gaccacagcc 240
 agcacagtgg atgaagccct ggcccagctg gccatgaccg atacagctcc agccgccgct 300
 agcagagcta gcagagtgcc tctgtctggc atggccctgc ctgtggtgtc tgccaagacc 360
 gtgcagctga acgatggcgg cctcgtgcgg acagtgcate tgcctgctcc taatgtggcc 420
 ggctgctgt ctgcagcagg cgtgccactg ctgcagagcg atcatgtggt gcctgccgcc 480
 acagccccta tcgtggaagg catgcagatc caggtcacac ggaaccgat caagaaagtg 540
 accgagcggc tggccctgcc tcccacgct agaagagtgg aagatcccga gatgaacatg 600
 agcagagagg tggtcgagga ccctggcgtg ccaggcacac aggatgtgac attcgccgtg 660
 gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga ctgcccgtgg ccaatgtggt ggtcacacca 720
 gcccatgagg ccgtcgtcag agtgggcaca aagcctggca cagaggtgcc acccgtgatc 780
 gacggcagca tctgggatgc cattgcccag tgcaagagcg gcggaaactg ggccgccaat 840
 accggcaatg gccctctatgg cggcctgcag atctctcagg ccgcctggga ttctaattggc 900

ggcggtgggat ctctgcccgc tgcctctcca cagcagcaga tcgaggtggc cgacaacatc 960
 atgaagacag ccggacctgg cgcttggccc aagtgtagca gttgtttctca gggcgacgcc 1020
 cctctgggca gcctgacaca catcctgaca tttctggccg ccgagacagg cggagccttc 1080
 tctagacctg gcctgcccgt ggaataacctg caggtcccaa gccccagcat gggccgggat 1140
 atcaaggtgc agtttcagag cggcggcaac aacagccctg ccgtgtatct gctggatggc 1200
 ctgagagccc aggacgacta caacggctgg gacatcaaca cccctgcctt cgagtgttac 1260
 taccagagcg gcctgtccat cgtgatgcct gtgggcgggc agagcagctt ctacagcgac 1320
 tggtagagcc ccgcctgtgg caaagccggc tggcagacct acaagtggga gacattcctg 1380
 acctccgagc tggcccagtg gctgagcgcc aatagagccg tgaagcctac aggcctctgc 1440
 gccatcggac tgagcatggc cggaagctct gccatgatcc tggccgccta tcaccctcag 1500
 cagttcatct acgccggcag cctgtctgcc ctgctggacc ctctcaggg catgggacct 1560
 tctctgatcg gactggctat gggcgacgct ggccgataca aggccgccga tatgtggggc 1620
 cctagcagcg atcctgcctg ggagagaaac gacccccacc agcagatccc caagctggtg 1680
 gccaaacaaca cccggctgtg ggtgtactgc ggcaacggca cccctaata gaactggcgga 1740
 gccaatatcc ccgccgagtt cctggaaaac ttcgtgcgga gcagcaacct gaagtccag 1800
 gatgcctaca acgccgctgg cggccacaac gccgtgttca acttccctcc caatggcacc 1860
 cacagctggg agtactgggg agcccagctg aacgccatga agggcgatct gcagtctct 1920
 ctgggagccg gcagccagat catgtacaac taccgccca tgctgggcca cggcgccgat 1980
 atggctggat atgccggcac actgcagagc ctgggtgccg agattgccgt ggaacaggct 2040
 gccctccagt ctgcctggca gggcgatacc ggcatcacat accaggcttg gcaggcccag 2100
 tggaccagc ccatggaaga tctcgtgcgg gcctaccacg ccatgagcag cacacacgag 2160
 gccaacacca tggccatgat ggcccgggat acagccgagg ccgctaagtg gggaggaacc 2220
 gagcagcagt ggaacttcgc cggaattgag gccgctgcca gcgccatcca gggcaactg 2280
 acatccatcc acagcctgct ggacgagggc aagcagagcc tgacaaaact ggctgctgcc 2340
 tggggcggt ctggctctga agcttatcag ggctgtcagc agaagtggga cggcaccgcc 2400
 accgagctga acaacgccct gcagaacctg gcccggacaa tctctgaagc cggacaggcc 2460
 atggccagca ccgagggcaa tgtgaccggc atgtttgccg aacaaaaact catctcagaa 2520
 gaggatctgc atcatcatca tcatcattga 2550

<210> 46
 <211> 3597

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合物編號"SS-Flag-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-TM-His 標籤"(pTG18269)之編碼核苷酸序列

<400> 46
atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttattggtct ttcccctctg tttcggtaag 60
tttctatag attacaagga tgacgacgat aagaaggcca aagtcggcga ctggctggtc 120
atcaagggcg ccaccatcga ccagcccgat cacagaggcc tgatcatcga agtgcggagc 180
agcgacggca gccctcctta cgtcgtcaga tggctggaaa ccgaccacgt ggccaccgtg 240
atccctggac ctgatgccgt ggtggtcacc gccgaggaac agaatgccgc cgatgagaga 300
gcccagcaca gattcggagc cgtgcagagc gccatcctgc acgccagagg aacagccaac 360
ggcagcatga gcgaagtgat gatgagcgag atcgccggcc tgcccatccc tcccatcatic 420
cactatggcg ccatcgccta cccccctagc ggcgcctctg gaaaagcctg gcaccagaga 480
acaccgcca gagccgaaca ggtggccctg gaaaagtgcg gcgacaagac ctgcaagggtg 540
gtgtcccggc tcaccagatg tggcgccgtg gcctacaacg gctccaagta tcagggcggc 600
accggcctga caagaagggc cgctgaggac gacgccgtga acagactgga aggcggcaga 660
atcgtgaact gggcctgcaa cagagccacc gtgggactgg tggaaagccat cggcatcaga 720
gagctgagac agcacgccag cagatacctg gccagagtgg aagccggcga ggaactgggc 780
gtgaccaaca agggcagact ggtggccaga ctgatccctg tgcaggccgc cgagagaagc 840
agagaggccc tgattgagag cggcgtgctg atccctgcc aacggcctca gaacctgctg 900
gatgtgacag ccgagcccgc cagaggccgg aagagaacct tgagcgacgt gctgaacgag 960
atcggggatg aacaggtgga cttcggcgcc ctgcctcccg agattaatag cgccaggatg 1020
tacgccggcc ctggcagcgc ttctctgggtg gccgctgcc aagatgtggga tagcgtggcc 1080
agcgacctgt tctctgccgc cagcgcattt cagagcgtcg tgtggggact cactgtgggc 1140
tcttggatcg gatcttctgc cggctctgat gccgctgctg cctctcctta tgtggcctgg 1200
atgagcgtga ccgccggaca ggcacagctg acagctgcac aggtccgagt ggctgccgcc 1260
gcttacgaga cagcctacag actgacagtg cctccaccgc tgatcgccga gaatcggacc 1320
gagctcatga cctgaccgc caccaatctg ctggccaga acaccctgc catcgaggcc 1380
aatcaggccg cctactctca aatgtggggc caagatgccg aggctatgta cggctatgca 1440
gccacagccg ccactgctac agaagccctg ctgcccttcg aagatgcccc tctgatcaca 1500
aacctggcg gcctgctgga acaggccgtg gctgtggaag aggccatcga taccgctgcc 1560

gccaaccaac tcataaaca cgtgccacag gccctccagc agctggctca gcctgctcag 1620
ggcgtggtgc cttctagcaa gctcggcgga ctgtggaccg ccgtgtctcc tcattctgagc 1680
cctctgagca acgtgtcctc tctcgccaac aaccacatga gcatgatggg caccggcgtg 1740
tccatgacca acacctgca cagcatgctg aagggactgg cccctgctgc tgcccaggct 1800
gtggaaacag ccgccgaaaa tggcgtgtgg gccatgagca gcctgggctc tcagctggga 1860
agctccctcg gttcttctgg actgggagct ggctgtggccg ccaatctggg aagagctgct 1920
tctgtcggca gcctgtctgt gcctcctgct tgggccgctg ctaaccaggc tgtgacacca 1980
gctgctagag ccctgcctct gaccagcctg acatctgccg ctgagacagc ccctggccac 2040
atgctgggag gactgcctct gggccactct gtgaatgccg gcagcggcat caacaacgcc 2100
ctgagagtgc ctgccagagc ctacgccatc cccagaactc cagccgctgg cgattttgcc 2160
accctcccac ctgagatcaa ttccgctaga atgtatagcg gagccgggtc tgctcctatg 2220
ctggctgctg ctctgcctg gcacggactg tctgccgaac tgagagccag cgccctgagc 2280
tacagcagcg tgctgagtac cctgaccggc gaagagtggc acggacctgc cagcgcctct 2340
atgacagcag ccgctgcccc atatgtcgca tggatgtcag tcaactgcagt gcgggcccga 2400
caggcaggcg ctgaggctga agctgcagca gcagcttatg aagccgcctt tgccgctaca 2460
gtcccacctc ctgtcattga ggccaaccgg gccagctga tggctctgat tgccacaaac 2520
gtgctgggac agaatgcccc agccattgcc gctacagaag cccagtatgc cgagatgtgg 2580
tcccaggacg ctatggcaat gtatgggtat gctggcgcct ccgccgctgc cacacagctg 2640
acaccttca ccgagcccgt gcagaccacc aatgcctctg gactggccgc ccagtctgcc 2700
gccattgctc atgtacagg cgctctgct ggggctcagc agacaacact gtcccagctg 2760
atcgccgcca tccctagcgt gctgcaggga ctgagcagct ctaccgccgc cacatttgcc 2820
tctggcccta gcggactgct gggcatcgtg ggcagtggaa gctcctggct ggataagctg 2880
tgggccctgc tggaccccaa cagcaacttc tggaaacaaa tggccagctc cggcctgttt 2940
ctgcccagca acaccattgc cccatttctg ggctgctgg gcggagtggc tgctgcagat 3000
gctgctgggg atgtgctggg cgaagccaca agcggaggac tgggaggcgc tctggtggca 3060
cctctgggat ctgcaggcgg actcggagga acagtggctg caggactggg caatgctgcc 3120
acagtgggca cactgagcgt gccaccatct tggacagctg ccgcccctct ggcttctct 3180
ctcggatctg ctctgggcgg caccctatg gtggctccac ctctgctgt ggctgccgga 3240
atgcctggca tgcctttcgg cacaatgggc ggacagggct tggcagagc cgtgcctcag 3300

tacggcttcc ggcctaactt cgtggccaga cctcctgcag ctggcgaaca aaaactcatc 3360
 tcagaagagg atctgagcta cgtactgcta tccgcaggca cgttgatcgc actaatgctt 3420
 atcatcttcc taataacctg ctgcaagcgg gttgataggc ccgaaagtac ccaaaggctc 3480
 ttgagaggta ccggacgcaa cgtatcggtta acgtcgcaaa gcggcaagtt cattagcagt 3540
 tgggagtcgc acaaatcagg tggagagacc cgcctgcatc atcatcatca tcattga 3597

<210> 47
 <211> 3330
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"Flag-Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-His
 標籤"(pTG18295)之編碼核苷酸序列

<400> 47
 atggattaca aggatgacga cgataagaag gccaaagtcg gcgactggct ggtcatcaag 60
 ggcgccacca tcgaccagcc cgatcacaga ggctgatca tcgaagtgcg gagcagcgac 120
 ggcagccctc cttacgtcgt cagatggctg gaaaccgacc acgtggccac cgtgatccct 180
 ggacctgatg ccgtgggtgt caccgccgag gaacagaatg ccgccgatga gagagcccag 240
 cacagattcg gagccgtgca gagcgccatc ctgcacgcca gaggaacagc caacggcagc 300
 atgagcgaag tgatgatgag cgagatcgcc ggcttgccca tccctcccat catccactat 360
 ggcgccattg cctacgcccc tagcggcgcc tctggaaaag cctggcacca gagaacaccc 420
 gccagagccg aacaggtggc cctggaaaag tgcggcgaca agacctgcaa ggtggtgtcc 480
 cggttcacca gatgtggcgc cgtggcctac aacggctcca agtatcaggg cggcaccggc 540
 ctgacaagaa gggccgctga ggacgacgcc gtgaacagac tggaaaggcgg cagaatcgtg 600
 aactgggcct gcaacagagc caccgtggga ctggtggaag ccatcgcatc cagagagctg 660
 agacagcacg ccagcagata cctggccaga gtggaagccg gcgaggaact gggcgtgacc 720
 aacaagggca gactggtggc cagactgatc cctgtgcagg ccgccgagag aagcagagag 780
 gccctgattg agagcggcgt gctgatccct gccagacggc ctcagaacct gctggatgtg 840
 acagccgagc ccgccagagg ccggaagaga accctgagcg acgtgctgaa cgagatgcgg 900
 gatgaacagg tggacttcgg cggcctgcct cccgagattt atagcggcag gatgtacgcc 960
 ggccctggca gcgcttctct ggtggccgct gccaaagatgt gggatagcgt ggccagcgac 1020
 ctgttctctg ccgccagcgc atttcagagc gtcgtgtggg gactcactgt gggctcttgg 1080
 atcggatctt ctgccggtct gatggccgct gctgcctctc cttatgtggc ctggatgagc 1140

gtgaccgccg gacaggcaca gctgacagct gcacaggctcc gagtggctgc cgccgcttac 1200
 gagacagcct acagactgac agtgcctcca cccgtgatcg ccgagaatcg gaccgagctc 1260
 atgaccctga ccgccaccaa tctgctcggc cagaacaccc ctgccatcga ggccaatcag 1320
 gccgcctact ctcaaatgtg gggccaagat gccgaggcta tgtacggcta tgcagccaca 1380
 gccgccactg ctacagaagc cctgctgccc ttcgaagatg cccctctgat cacaaacct 1440
 ggcggcctgc tggaacaggc cgtggctgtg gaagaggcca tcgataccgc tgccgccaac 1500
 caactcatga acaacgtgcc acaggccctc cagcagctgg ctcagcctgc tcagggcgtg 1560
 gtgccttcta gcaagctcgg cggactgtgg accgccgtgt ctctcatct gagccctctg 1620
 agcaacgtgt cctctatcgc caacaaccac atgagcatga tgggcaccgg cgtgtccatg 1680
 accaacaccc tgcacagcat gctgaaggga ctggcccctg ctgctgcca ggctgtggaa 1740
 acagccgccg aaaatggcgt gtgggcatg agcagcctgg gctctcagct gggaagctcc 1800
 ctcggttctt ctggactggg agctggcgtg gccgccaatc tgggaagagc tgcttctgtc 1860
 ggcagcctgt ctgtgccctc tgcttgggcc gctgctaacc aggctgtgac accagctgct 1920
 agagccctgc ctctgaccag cctgacatct gccgctcaga cagcccctgg ccacatgctg 1980
 ggaggactgc ctctgggcca ctctgtgaat gccggcagcg gcatcaaaa cgccctgaga 2040
 gtgcctgcca gagcctacgc catccccaga actccagccg ctggcgattt tgccaccctc 2100
 ccacctgaga tcaattccgc tagaatgtat agcggagccg ggtctgctcc tatgctggct 2160
 gctgcttctg cctggcacgg actgtctgcc gaactgagag ccagcgcctt gagctacagc 2220
 agcgtgctga gtacctgac cggcgaagag tggcacggac ctgccagcgc ctctatgaca 2280
 gcagccgctg ccccataatgt cgcatggatg tcagtactg cagtgcgggc cgaacaggca 2340
 ggcgctcagg ctgaagctgc agcagcagct tatgaagccg cctttgccgc tacagtccca 2400
 cctcctgtca ttgaggccaa ccgggcccag ctgatggctc tgattgccac aaacgtgctg 2460
 ggacagaatg ccccagccat tgccgctaca gaagcccagt atgccgagat gtggtcccag 2520
 gacgctatgg caatgtatgg gtatgtggc gcctccgccg ctgccacaca gctgacacct 2580
 ttaccgagc ccgtgcagac caccaatgcc tctggactgg ccgcccagtc tgccgccatt 2640
 gctcatgcta caggcgctc tgctggggct cagcagacaa cactgtccca gctgatcgcc 2700
 gccatcccta gcgtgctgca gggactgagc agctctaccg ccgccacatt tgctctggc 2760
 cctagcggac tgctgggcat cgtgggcagt ggaagctcct ggctggataa gctgtgggcc 2820
 ctgctggacc ccaacagcaa ctcttggaac acaatcgcca gctccggcct gtttctgccc 2880
 agcaacacca ttgccccatt tctgggcctg ctgggcggag tggctgctgc agatgctgct 2940

ggggatgtgc tgggcgaagc cacaagcggg ggactgggag gcgctctggt ggcacctctg 3000
 ggatctgcag gcggactcgg aggaacagtg gctgcaggac tgggcaatgc tgccacagtg 3060
 ggcacactga gcgtgccacc atcttggaca gctgccgccc ctctggcttc tcctctcgga 3120
 tctgctctgg gcggcacccc tatggtggct ccacctctg ctgtggctgc cggaatgcct 3180
 ggcatgcctt tcggcacaat gggcggacag ggcttcggca gagccgtgcc tcagtacggc 3240
 ttccggccta acttcgtggc cagacctct gcagctggcg acaaaaact catctcagaa 3300
 gaggatctgc atcatcatca tcatcattga 3330

<210> 48
 <211> 2922
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"SS-Flag-Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733*-Myc-His
 標籤"(pTG18270)之編碼核苷酸序列

<400> 48
 atggttcctc aggcctctct gtttgtacct ctcttggttt ttccattgtg ttttgggaaa 60
 ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggccttct ctagacctgg cctgcccgtg 120
 gaataacctgc aggtcccaag ccccagcatg ggccgggata tcaaggtgca gtttcagagc 180
 ggccggcaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagccca ggacgactac 240
 aacggctggg acatcaacac ccctgccttc gagtgggtact accagagcgg cctgtccatc 300
 gtgatgcctg tgggcggcca gagcagcttc tacagcgact ggtacagccc cgctgtggc 360
 aaagccggct gccagacct caagtgggag acattcctga cctccgagct gccccagtgg 420
 ctgagcgcca atagagccgt gaagcctaca ggctctgccg ccatcggact gagcatggcc 480
 ggaagctctg ccatgatcct ggccgcctat caccctcagc agttcatcta cgccggcagc 540
 ctgtctgccc tgctggacct ttctcagggc atgggccctt ctctgatcgg actggctatg 600
 ggcgacgctg gcggatacaa ggccgccgat atgtggggcc ctagcagcga tcctgcctgg 660
 gagagaaacg accccaccca gcagatcccc aagctggtgg ccaacaacac ccggctgtgg 720
 gtgtactgcg gcaacggcac ccctaataaa ctgggcggag ccaatatccc cgccgagttc 780
 ctggaaaact tcgtgcggag cagcaacctg aagtccagg atgcctaaa cgccgctggc 840
 ggccacaacg ccgtgttcaa ctccctccc aatggcacc acagctggga gtactgggga 900
 gcccagctga acgcatgaa gggcgatctg cagtcctctc tgggagccgg cacaaccgcc 960
 agagacatca tgaacgccgg cgtgacctgt gtgggcgagc acgagacact gacagccgcc 1020

gctcagtaca tgagagagca cgacatcggc gccctgcccc tctgcggcga cgatgataga 1080
ctgcacggca tgctgaccga ccgggacatc gtgatcaagg gcctggctgc tggcctggac 1140
cccaatactg ctacagctgg cgagctggca agagacagca tctactacgt ggacgccaac 1200
gccagcatcc aggaaatgct gaacgtgatg gaagaacacc aggtccgacg ggtgccctg 1260
atcagcgaac acagactcgt gggcatcgtg accgaggccg atatcgccag acatctgcc 1320
gagcacgcca tcgtgcagtt cgtgaaggcc atctgcagcc ccatggcctt ggcctctacc 1380
gtggacggca ccgcatgag agtgaccacc atgaagtcca gagtgatcga catcgtggaa 1440
gagaacggct tcagcgtgga cgaccgggac gacctgtatc ctgctgctgg agtgcaggtc 1500
cacgacgccg atacaatcgt gctgcggaga agcagacccc tgcagatcag cctggatggc 1560
cacgacgcca agcaggtctg gaccacagcc agcacagtgg atgaagccct ggcccagctg 1620
gccatgaccg atacagctcc agccgccgt agcagagcta gcagagtgcc tctgtctggc 1680
atggccctgc ctgtggtgtc tgccaagacc gtgcagctga acgatggcgg cctcgtgcgg 1740
acagtgcac tgcctgtctc taatgtggcc ggctgtctgt ctgcagcagg cgtgccactg 1800
ctgcagagcg atcatgtggt gcctgccgcc acagccccta tcgtggaagg catgcagatc 1860
caggtcacac ggaaccgat caagaaagtg accgagcggc tgcccctgcc tcccaacgt 1920
agaagagtgg aagatcccga gatgaacatg agcagagagg tggtcgagga ccctggcgtg 1980
ccaggcacac aggatgtgac attcgccgtg gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga 2040
ctgcccgtgg ccaatgtggt ggtcacacca gcccatgagg ccgtcgtcag agtgggcaca 2100
aagcctggca cagaggtgcc acccgtgatc gacggcagca tctgggatgc cattgcccag 2160
tgcaagagcg gcggaaactg ggccgccaat accggcaatg gcctctatgg cggcctgcag 2220
atctctcagg ccgcctggga ttctaattgg ggctgtggat ctcttccgc tgcctctcca 2280
cagcagcaga tcgaggtggc cgacaacatc atgaagacag ccggacctgg cgcctggccc 2340
aagtgtagca gttgttctca gggcgacgcc cctctgggca gcctgacaca catcctgaca 2400
tttctggccg ccgagacagg cggagctgga acagccgtgc aggatagccg gtcccacgtg 2460
tacgctcacc aggcccagac aagacaccct gccacagcca ccgtgatcga ccacgagggc 2520
gtgatcgaca gcaacaccac cgccacatct gccccacccc ggaccaagat cacagtgcct 2580
gctagatggg tggtaacgg catcgagcgg agcggcgaag tgaatgccaa gcccggcacc 2640
aagagcggcg acagagtggg aatctgggtg gactctgccg gccagctggt ggatgaacct 2700
gcccctcctg ccagagccat tgccgatgct gctctggctg cactgggcct gtggctgtct 2760

gtggcagctg tggctggcgc actgctggct ctgacaagag ccatcctgat cagagtgcgg 2820
aacgccagt tggcagcacga tatcgacagc ctgttctgca cccagcggga acaaaaactc 2880
atctcagaag aggatctgag ccatcatcat catcatcatt ga 2922

<210> 49
<211> 1875
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合物編號"SS-Flag-Ag85B*-Rv2626-Rv1733*-Myc-His 標籤"
(pTG18272)之編碼核苷酸序列

<400> 49
atggttccctc aggctctcct gtttgtaccc cttctggttt ttccatttg ttttgggaaa 60
ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggccttct ctagacctgg cctgcccgtg 120
gaatacctgc aggtcccaag cccagcatg ggccgggata tcaaggtgca gtttcagagc 180
ggcggcaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagcca ggacgactac 240
aacggctggg acatcaacac ccctgccttc gagtggfact accagagcgg cctgtccatc 300
gtgatgcctg tgggcggcca gagcagcttc tacagcgact ggtacagccc cgctgtggc 360
aaagccggct gccagacct caagtgggag acattcctga cctccgagct gcccagtg 420
ctgagcgcca atagagccgt gaagcctaca ggctctgccg ccatcggact gagcatggcc 480
ggaagctctg ccatgatcct ggccgcctat caccctcagc agttcatcta cgccggcagc 540
ctgtctgccc tgctggacct ttctcagggc atgggccctt ctctgatcgg actggctatg 600
ggcgacgctg gcggatacaa ggccgccgat atgtggggcc ctagcagcga tctgcctgg 660
gagagaaacg accccacca gcagatcccc aagctggtgg ccaacaacac ccggctgtgg 720
gtgtactgcg gcaacggcac ccctaataa ctgggcggag ccaatatccc cgccgagttc 780
ctggaaaact tcgtgcggag cagcaacctg aagtccagg atgcctaaa cgccgctggc 840
ggccacaacg ccgtgttcaa ctccctccc aatggcacc acagctggga gtactgggga 900
gcccagctga acgcatgaa gggcgatctg cagtcctctc tgggagccgg cacaaccgcc 960
agagacatca tgaacgccgg cgtgacctgt gtgggcgagc acgagacact gacagccgcc 1020
gctcagtaca tgagagagca cgacatcggc gccctgcccc tctgcggcga cgatgataga 1080
ctgcacggca tgctgaccga ccgggacatc gtgatcaagg gcctggctgc tggcctggac 1140
cccaatactg ctacagctgg cgagctggca agagacagca tctactacgt ggacgccaac 1200
gccagcatcc aggaaatgct gaacgtgatg gaagaacacc aggtccgacg ggtgcccgtg 1260

atcagcgaac acagactcgt gggcatcgtg accgaggccg atatcgccag acatctgccc 1320
 gagcacgcca tcgtgcagtt cgtgaaggcc atctgcagcc ccatggccct ggccctctgt 1380
 gaacagccg tgcaggatag ccggtcccac gtgtacgctc accaggccca gacaagacac 1440
 cctgccacag ccaccgtgat cgaccacgag ggcgtgatcg acagcaacac caccgccaca 1500
 tctgccccac cccggaccaa gatcacagtg cctgctagat ggggtggtaa cggcatcgag 1560
 cggagcggcg aagtgaatgc caagcccggc accaagagcg gcgacagagt gggaatctgg 1620
 gtggactctg ccggccagct ggtggatgaa cctgcccctc ctgccagagc cattgccgat 1680
 gctgctctgg ctgcactggg cctgtggctg tctgtggcag ctgtggctgg cgcaactgctg 1740
 gctctgacaa gagccatcct gatcagagtg cggaacgcca gttggcagca cgatatcgac 1800
 agcctgttct gcaccagcg ggaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gagccatcat 1860
 catcatcacc attga 1875

<210> 50
 <211> 2845
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"SS-Flag-Rv2029*-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*-Myc-His
 標籤"(pTG18323)之編碼核苷酸序列

<400> 50
 atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcatggcag tactgttaac tctccaaaca 60
 cccaccggtc aaatccattg gggcgattac aaggatgacg acgataagac cgagcctgcc 120
 gcctgggatg agggcaagcc cagaatcacc accctgacca tgaaccccgc cctggacatc 180
 accaccagcg tggacgtcgt gcggcccacc gagaagatga gatgtggcgc ccctagatac 240
 gaccctggcg gcggaggaat caacgtggcc agaatcgtgc acgtgctggg cggctgtagc 300
 accgccctgt ttccagctgg cggctctaca ggctctctgc tgatggccct gctgggagat 360
 gccggcgtgc ccttcagagt gatccctatc gccgccagca cccgcgagag cttaccctg 420
 aatgagagcc ggaccgcaa gcagtacaga ttctgtctgc ctggccccag cctgacagtg 480
 gccgaacagg aacagtgcct ggacgagctg agaggcgccg ctgcctctgc tgcctttgtg 540
 gtggcctctg gctctctgcc tectggcgtg gccgccgact actatcagag agtggccgac 600
 atctgccggc ggagcagcac acctctgac ctggatacaa gcggcggagg cctgcagcat 660
 atcagcagcg gagtgttctt gctgaaggcc agcgtccgag agctgaggga atgtgtggga 720
 agcgagctgc tgaccgagcc cgaacagctg gccgctgccc acgagctgat cgatagaggc 780

agagccgagg	tggtggtggt	gtctctggga	tctcagggcg	ctctgctggc	cacaagacac	840
gccagccacc	ggttcagcag	catccctatg	acagccgtgt	ctggcgtggg	agccggcaat	900
gctatggtgg	ccgccatcac	agtgggcctg	tctagaggct	ggtccctgat	caagtctgtg	960
cggctgggca	atgccgctgg	cgctgctatg	ctgctgacac	ctggaaccgc	cgctgcaac	1020
agggacgacg	tggaacggtt	cttcgagaca	accgccagag	acatcatgaa	cgccggcgtg	1080
acctgtgtgg	gcgagcacga	gacactgaca	gccgccgctc	agtacatgag	agagcacgac	1140
atcggcgccc	tgccccatctg	cggcgacgat	gatagactgc	acggcatgct	gaccgaccgg	1200
gacatcgtga	tcaagggcct	ggctgctggc	ctggacccca	atactgctac	agctggcgag	1260
ctggcaagag	acagcatcta	ctacgtggac	gccaacgcca	gcatccagga	aatgctgaac	1320
gtgatggaag	aacaccagggt	ccgacgggtg	cccgtgatca	gcgaacacag	actcgtgggc	1380
atcgtgaccg	aggccgatat	cgccagacat	ctgcccgagc	acgccatcgt	gcagttcgtg	1440
aaggccatct	gcagcccat	ggccctggcc	tctgctggaa	cagccgtgca	ggatagccgg	1500
tcccacgtgt	acgctcacca	ggcccagaca	agacaccctg	ccacagccac	cgtgatcgac	1560
cacgagggcg	tgatcgacag	caacaccacc	gccacatctg	ccccaccccg	gaccaagatc	1620
acagtgcctg	ctagatgggt	ggtcaacggc	atcgagcgga	gcggcgaagt	gaatgccaaag	1680
cccggcacca	agagcggcga	cagagtggga	atctgggtgg	actctgccgg	ccagctggtg	1740
gatgaacctg	ccccctctgc	cagagccatt	gccgatgctg	ctctggctgc	actgggcctg	1800
tggctgtctg	tggcagctgt	ggctggcgca	ctgctggctc	tgacaagagc	catcctgatc	1860
agagtgcgga	acgccagttg	gcagcacgat	atcgacagcc	tgttctgcac	ccagcgggag	1920
cagcccatca	gaagatggcg	gcctgccaga	gtgccactgc	tgccactggc	tgttctaca	1980
gtggcttctg	ccgccgtgt	gaccatgctg	gtgggtgcctg	tgggagctgg	acctggcctg	2040
agagagatcg	gactgccacc	aggcgtgtca	gccgtggctg	ctgtgtctcc	tagccctcct	2100
gaagcctctc	agcctgcccc	tggcccaaga	gatcccaaca	gacccttcac	cgtgtccgtg	2160
ttcggcgaca	gcatcggctg	gaccctgatg	cactacctgc	ctcccacccc	tggcttccgg	2220
ttcatcgacc	acacagtgat	cggctgcagt	ctcgtgcggg	gcaccctta	cagatatatc	2280
ggccagacct	tggaacagcg	ggccgagtgt	gatggatggc	ctgctaggtg	gtccgcccag	2340
gtcaacagag	atcagcccga	ctggcactg	ctgatcgtgg	gcagatggga	gacagtggac	2400
agagtgaacg	agggccggtg	gaccacatc	ggcgacccta	cctttgacgc	ctacctgaac	2460
gccgagctgc	agcgggcccct	gtctatcgtg	ggaagcacag	gcgtcagagt	gatggtcacc	2520
accgtgccct	acagcagagg	cggcgagaag	cctgacggca	gactgtacc	tgaggaccag	2580

cccgagcgcg tgaacaagtg gaacgccatg ctgcacaacg ccatcagcca gcacagcaac 2640
 gtgggcatga tgcacctgaa caagaagctg tgccccgacg gcgtgtacac cgccaaggtg 2700
 gacggaatca aagtgcggag cgacggcgtg cacctgaccc aggaaggcgt gaagtggctg 2760
 atcccctggc tggaagatag cgtgcgggtg gccctcgaac aaaaactcat ctcagaagag 2820
 gatctgagcc atcatcatca tcatc 2845

<210> 51
 <211> 2547
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合物編號"SS-Flag-Rv2029*-TB10.4-ESAT6-Rv0111*-Myc-His
 標籤" (pTG18324)之編碼核苷酸序列

<400> 51
 atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcattggcag tactgttaac tctccaaaca 60
 cccaccggtc aatccattg gggcgattac aaggatgacg acgataagac cgagcctgcc 120
 gcctgggatg agggcaagcc cagaatcatc accctgacca tgaaccccgc cctggacatc 180
 accaccagcg tggacgtcgt gcggcccacc gagaagatga gatgtggcgc ccctagatac 240
 gaccctggcg gcggaggaat caacgtggcc agaatcgtgc acgtgctggg cggctgtagc 300
 accgccctgt tccagctgg cggctctaca ggctctctgc tgatggccct gctgggagat 360
 gccggcgtgc ccttcagagt gatccctatc gccgccagca cccgcgagag cttaccctg 420
 aatgagagcc ggaccgcaa gcagtacaga ttcgtgctgc ctggccccag cctgacagt 480
 gccgaacagg aacagtgcct ggacgagctg agaggcgccg ctgcctctgc tgcttttgtg 540
 gtggcctctg gctctctgcc tcctggcgtg gccgccgact actatcagag agtggccgac 600
 atctgccggc ggagcagcac acctctgac ctggatacaa gcggcggagg cctgcagcat 660
 atcagcagcg gagtgttct gctgaaggcc agcgtccgcg agctgaggga atgtgtggga 720
 agcgagctgc tgaccgagcc cgaacagctg gccgctgccc acgagctgat cgatagaggc 780
 agagccgagg tgggtgtgtt gtcctctggga tctcagggcg ctctgctggc cacaagacac 840
 gccagccacc gggtcagcag catccctatg acagccgtgt ctggcgtggg agccggcaat 900
 gctatggtgg ccgccatcac agtgggctg tctagaggct ggtccctgat caagtctgtg 960
 cggctgggca atgccgctgg cgtctctatg ctgctgacac ctggaaccgc cgcctgcaac 1020
 agggacgacg tggaacggtt cttcgagagc cagatcatgt acaactacc cgccatgctg 1080
 ggccacgccg gcgatatggc tggatatgcc ggcacactgc agagcctggg tgccgagatt 1140

gccgtggaac aggctgccct ccagtctgcc tggcagggcg ataccggcat cacataccag 1200
 gcttggcagg cccagtggaa ccaggccatg gaagatctcg tgcgggcta ccacccatg 1260
 agcagcacac acgaggccaa caccatggcc atgatggccc gggatacagc cgaggccgct 1320
 aagtggggag gaaccgagca gcagtggaac ttcgccggaa ttgaggccgc tgccagcgcc 1380
 atccagggca acgtgacatc catccacagc ctgctggacg agggcaagca gagcctgaca 1440
 aaactggctg ctgccctgggg cggctctggc tctgaagctt atcagggcgt gcagcagaag 1500
 tgggacgcca ccgccaccga gctgaacaac gccctgcaga acctggcccg gacaatctct 1560
 gaagccggac aggccatggc cagcaccgag ggcaatgtga ccggcatgtt tgccgagcag 1620
 cccatcagaa gatggcggcc tgccagagtg ccaactgctgc cactggctgc tgctacagtg 1680
 gcttctgccg ccgctgtgac catgctggtg gtgcctgtgg gagctggacc tggcctgaga 1740
 gagatcggac tgccaccagg cgtgtcagcc gtggctgctg tgtctcctag ccctcctgaa 1800
 gcctctcagc ctgcccctgg cccaagagat cccaacagac ccttcaccgt gtccgtgttc 1860
 ggcgacagca tcggctggac cctgatgcac tacctgcctc ccaccctgg ctcccggttc 1920
 atcgaccaca cagtgatcgg ctgcagtctc gtgcggggca ccccttacag atatatcggc 1980
 cagaccctgg aacagcgggc cgagtgtgat ggatggcctg ctaggtggtc cgcccaggtc 2040
 aacagagatc agcccgacgt ggcactgctg atcgtgggca gatgggagac agtggacaga 2100
 gtgaacgagg gccggtggac ccacatcggc gaccctacct ttgacgccta cctgaacgcc 2160
 gagctgcagc gggccctgtc tatcgtggga agcacaggcg tcagagtgat ggtcaccacc 2220
 gtgccctaca gcagaggcgg cgagaagcct gacggcagac tgtaccctga ggaccagccc 2280
 gagcgcgtga acaagtggaa cgccatgctg cacaacgcca tcagccagca cagcaacgtg 2340
 ggcatgatcg acctgaacaa gaagctgtgc cccgacggcg tgtacaccgc caaggtggac 2400
 ggaatcaaag tgcggagcga cggcgtgcac ctgaccagg aaggcgtgaa gtggctgatc 2460
 ccctggctgg aagatagcgt gcgggtggcc tctgaacaaa aactcatctc agaagaggat 2520
 ctgagccatc atcatcatca tcattga 2547

<210> 52
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 52

cgcgggccgca ccatggatta caaggatgac gacg 34

<210> 53
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 53
 cgtcgtcatc cttgtaatcc atggtgcggc cgcg 34

<210> 54
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 54
 catctcagaa gaggatctgc atcatcatca tcatcattg 39

<210> 55
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 55
 caatgatgat gatgatgatg cagatcctct tctgagatg 39

<210> 56
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 56
 gatgacgacg ataaggctag cagagccacc gtgggactgg 40

<210> 57
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

- <400> 57
gatgagtttt tgttcgctag cctgttcac cgcacatctcg t 41
- <210> 58
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引子
- <400> 58
gatgacgacg ataaggctag caaggccaaa gtcggcg 37
- <210> 59
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引子
- <400> 59
gatgagtttt tgttcgctag ctgttcctct ggcgtgc 37
- <210> 60
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引子
- <400> 60
gatgacgacg ataaggctag cgattttgcc accctcccac c 41
- <210> 61
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引子
- <400> 61
gagatgagtt ttgttcgct agcgccagct gcaggaggtc tgg 43
- <210> 62
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 引子

<400> 62
 gatgacgacg ataaggctag cgccaacggc agcatgagcg 40

<210> 63
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 63
 gagatgagtt tttgttcgct agcgttgcag gcccgattca cga 43

<210> 64
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 64
 gatgacgacg ataaggctag cgtggacttc ggcgccctgc 40

<210> 65
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 65
 gagatgagtt tttgttcgct agcggccagcg gctggagttc tgg 43

<210> 66
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 66
 gatgacgacg ataaggctag cacaaccgcc agagacatca tg 42

<210> 67
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 67

gatgagtttt tgttcgctag cagaggccag ggccatgggg

40

<210> 68

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 68

gttttggaaa attccaata accgtggacg gcacc

35

<210> 69

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 69

ggtgccgtcc acggttatig ggaattttcc aaaac

35

<210> 70

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 70

gaccggcatg ttigccagct atgttcttct ctctg

35

<210> 71

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 71

cagagagaag aacatagctg gcaaacaatgc cggtc

35

<210> 72

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 72

gtttcggtaa gtttcctata aaggccaaag tcggcgac

38

<210> 73

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 73

gtcgccgact ttggccttta taggaaactt accgaaac

38

<210> 74

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 74

cctcctgcag ctggcagcta cgtactgcta tc

32

<210> 75

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 75

gatagcagta cgtagctgcc agctgcagga gg

32

<210> 76

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 76

gttttgggaa attccctatt gccttctcta gacctg

36

<210> 77

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

5

<220>		
<223>	引子	
<400>	77	
	caggtctaga gaaggcaata gggaatttcc caaac	36
<210>	78	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	78	
	gatcagatat cgcggccgcc gtacgacat ggtaccacaa gcgc	44
<210>	79	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	79	
	ggcggcaggc tcggtgcccc aatggatttg ac	32
<210>	80	
<211>	124	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	促進子 p7.5K	
<400>	80	
	ccaccactt tttatagtaa gtttttcacc cataaataat aatacaata attaatttct	60
	cgtaaaagta gaaaatatat tctaatttat tgcacggtaa ggaagtagaa tcataaagaa	120
	cagt	124
<210>	81	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	81	
	gctgtagat ctcccaccca ctttttatag	30

<210> 82
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 82
 ccttgagacc catggtggac tgttctttat gattctactt cc 42

<210> 83
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 83
 gtagaatcat aaagaacagt ccacccatggg tctcaagggtg aac 43

<210> 84
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 84
 gagtcattct cgacttgcgg ccgcacaaaa atcaagaggc caccgcacg ctatc 55

<210> 85
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 促進子 pHSR

<400> 85
 tttattctat acttaaaaaa tgaaaataaa tacaaagggtt cttgagggtt gtgttaaatt 60

gaaagcgaga aataatcata aattatttca ttatcgcgat atccgttaag ttg 114

<210> 86
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子

<400> 86 cctcttgatt tttgtgcggc cgctttattc tatacttaaa aaatgaaaat aaatac	56
<210> 87 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引子	
<400> 87 ggacattaat taacaaactt aacggatatac gcgataatg	39
<210> 88 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引子	
<400> 88 ggcacttaat taaccacat ggtaccacaa gcgctg	36
<210> 89 <211> 48 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引子	
<400> 89 gttaacgcta gcctcgagac aaaaatcaaa gacgtgtttc gcctccac	48
<210> 90 <211> 42 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引子	
<400> 90 ggcacttaat taaccacat gaccgtggac ggcaccgcca tg	42
<210> 91 <211> 51 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引子	

<400> 91
gttaacgcta gcctcgagac aaaaatcagg caaacatgcc ggtcacattg c 51

<210> 92
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 促進子 B2R

<400> 92
tatattatta agtgtggtgt ttggtcgatg taaaatTTTT gtcgataaaa attaaaaaat 60
aacttaattt attattgatc tcgtgtgtac aaccgaaatc 100

<210> 93
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 93
ggatcctcga gtatattatt aagtgtggtg tttgg 35

<210> 94
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 94
cttgcggtac catggtgggc tagcgatttc ggttgtacac acgagatc 48

<210> 95
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 95
gtgtgtacaa ccgaaatcgc tagcccacca tggtagcgca agccc 45

<210> 96
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

- <220>
 <223> 引子
 <400> 96
 ctttccggat ccacaaaaat cacaggcggg tctc 34
- <210> 97
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 引子
 <400> 97
 gtgtgtacaa ccgaaatcgc tagcccacca tgaaggccaa agtcggcgac tg 52
- <210> 98
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 引子
 <400> 98
 gagtccgatc cacaaaaatc agccagctgc agg 33
- <210> 99
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 引子
 <400> 99
 gagtattct cgacttgcgg ccgcacaaaa atcaagaggc cacccgcac 49
- <210> 100
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 引子
 <400> 100
 gctggtggat cccaccact ttttatagta agtttttcac 40
- <210> 101
 <211> 37
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 101

ggcacttaat taaccacat ggttcctcag gctctcc

37

<210> 102

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<400> 102

gttaacgcta gcctcgagac aaaaatcacc gctgggtgca gaac

44

發明摘要

※ 申請案號： 102124693

※ 申請日： 102/07/10

※IPC 分類：

C07K 14/35 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

分枝桿菌抗原疫苗

MYCOBACTERIAL ANTIGEN VACCINE

【中文】

本發明一般相關於免疫性組合物，其包含分枝桿菌菌株之至少五種抗原及其融合體，以及編碼此類經組合抗原與融合體之核酸分子。本發明亦有關於核酸分子、載體、宿主細胞，以及包含或編碼該分枝桿菌抗原組合物與融合多胜肽之組成物，以及其重組性製造方法。本發明亦有關於使用該分枝桿菌抗原組合物、融合多胜肽、載體、宿主細胞、組成物之方法，特別用以誘發或刺激免疫反應，以對抗分枝桿菌感染或分枝桿菌感染導致或相關之任何疾病。本發明亦有關於針對此類分枝桿菌抗原與融合多胜肽之抗體，用於診斷分枝桿菌感染，及偵測方法，以及一試劑套組，其包含該分枝桿菌抗原組合物、融合多胜肽、載體、宿主細胞、組成物或抗體。

【英文】

The present invention relates generally to immunogenic combinations comprising at least five antigens of a Mycobacterium species as well as fusion thereof and nucleic acid molecules encoding such combined antigens and fusion. The present invention also relates to nucleic acid molecules, vectors, host cells and compositions comprising or encoding said combinations of mycobacterial antigens and fusion polypeptides as well as to methods for recombinantly producing them. The present invention also relates to methods of using said combinations of mycobacterial antigens, fusion polypeptides, vectors, host cells, compositions particularly for inducing or stimulating an immune response against a Mycobacterium infection or any disease caused by or associated with a Mycobacterium infection. The present invention also concerns antibodies directed to such mycobacterial antigens and fusion polypeptides that can be used in the diagnosis of a Mycobacterium infection and method of detection as well as kits of reagent comprising said combinations of mycobacterial antigens, fusion polypeptides, vectors, host cells, compositions or antibodies.

圖式

1/16

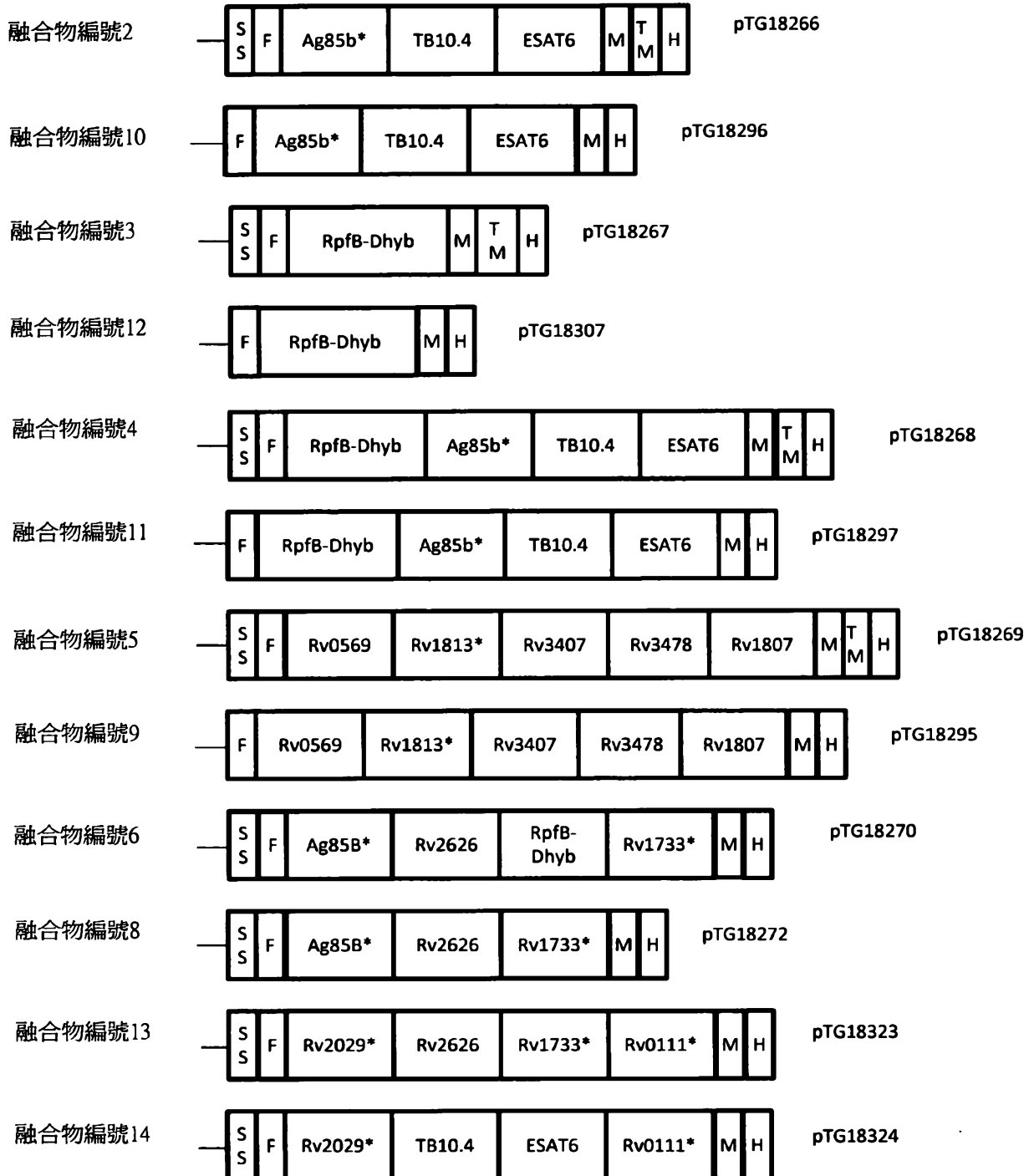


圖 1

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

[0176]本發明抗體可使用本領域之傳統技術生產，例如，投予(例如，兔、馬等)一有效量之本文所述之任何分枝桿菌抗原、融合蛋白質及/或其胜片段、藉由顯現(例如，噬菌體、酵母菌或核糖體顯現)或融合瘤技術。製造單株抗體之一般方法為本領域所習知。

[0177]本發明抗體可以經分離形式、溶於液體(例如，動物血清)或位於宿主細胞(例如，融合瘤)等方式提供。此外，其可接合適當之標籤(可偵測型或功能型)，包括放射性(^{131}I 或 ^{99}Tc 等)、酵素性(辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶等)與化學性(例如，生物素等)標籤。

[0178]本發明抗體具有多種潛在用途，皆屬於本發明之範疇。舉例而言，此類抗體可作為(a)試驗用試劑，以偵測本發明所用之分枝桿菌抗原，(b)試驗用試劑，以偵測生物樣本中分枝桿菌之存在，及/或(c)工具，以偵測及/或自蛋白質與其他雜質之混合物中，回收依據本發明方法重組產生之分枝桿菌抗原與融合多胜肽(例如，藉由親合層析法與免疫沈澱法自經培養之宿主細胞純化)。其亦可作為治療用途，例如，用於治療暴露於分枝桿菌後之個體(例如，被動免疫治療)。

[0179]在一實施例中，本發明係有關於一方法，其使用本發明之抗體，偵測及/或量化取自感染或易受感染分枝桿菌個體之生物樣本(例如，血漿、血清、痰液等)之分枝桿菌抗原，所包含之步驟為：以該生物樣本與本發明之抗體試劑接觸，並於特定條件下使分枝桿菌抗原與抗體試劑之間

是， Rv0569於18°C下培養之經轉形B121細胞生產時為可溶性，但於37°C下之B121細胞培養時卻是可溶性與不溶性材料並存(於裂解後之上清液與沈澱物)。

8.2 *Mtb* 抗原之純化

[0350]如材料與方法中所述，於鎳管柱上以IMAC層析法純化*Mtb*抗原，最後再通過凝膠過濾管柱。

[0351]具代表性之純化試驗如Rv2626 (純化自C41 (DE3)細胞於37°C下產生之可溶性材料)·RPFb-D融合物(經變性之RpfB-D係純化自B121 (DE3)於37°C下產生且經溶解之包涵體)，與TB10.4 (純化自C41 (DE3)細胞於37°C下產生之可溶性與不溶性材料)所示。經沖提出之分液於SDS-PAGE分析，分別如圖9 A、B與C。

[0352]如圖9A所示，Rv2626之經純化匯集池未出現任何可見之雜質。可看到預期分子量之Rv2626主要層帶，以及一次要層帶(即所謂層帶B)，其經由MS確認為Rv2626。Rv2626已知可形成雙體，其可部分對抗變性與還原。因此，據推測，該次要層帶B相符於雙體形式之Rv2626。

[0353]當以SDS-PAGE觀察時(列1至8代表中間純化分液，而列9至11代表5、10與15 μ L之經純化匯集池)，RPFb-Dhyb之經純化匯集池未出現任何可見之雜質(請見圖9B)。

[0354]TB10-4於變性條件下純化，接著於原始條件下進行最終步驟。如圖9C所示，經純化匯集池之凝膠分析未出現任何可見之雜質(列2至6代表中間純化分液，而列7 至9

申請專利範圍

1. 一種免疫性組合物，包含至少5種不同抗原，或編碼該至少5種抗原之核酸分子，其中該等抗原係獨立地取自分枝桿菌菌種，其中該至少5種分枝桿菌抗原係選自於由 ESAT-6 (Rv3875)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85B (Rv1886)、RpfB、RpfD、Rv0111、Rv0569、Rv1733c、Rv1807、Rv1813、Rv2029c、Rv2626、Rv3407及Rv3478所組成之族群，其中該免疫性組合物為多期性，其包含或編碼至少一源自活躍感染期之抗原、至少一源自復甦感染期之抗原，以及至少一源自潛伏感染期之抗原，且其中該免疫性組合物包含或表達至少RpfB以及RpfD。
2. 如請求項1之免疫性組合物，其中該分枝桿菌抗原係取自結核之分枝桿菌群，其選自於由結核分枝桿菌(*M. tuberculosis*; *Mtb*)、牛分枝桿菌(*M. bovis*)、牛分枝桿菌BCG (*M. bovis* BCG)、非洲分枝桿菌(*M. africanum*)、卡氏分枝桿菌(*M. canetti*)、山羊分枝桿菌(*M. caprae*)，以及田鼠分枝桿菌(*M. microti*)組成之族群。
3. 如請求項1之免疫性組合物，其中該活躍期之抗原係選自於由 ESAT-6 (Rv3875)、TB10.4 (Rv0288)、Ag85B (Rv1886)及PPE家族蛋白質Rv3478所組成之族群。
4. 如請求項3之免疫性組合物，其中該免疫性組合物包含或表達至少ESAT-6 (Rv3875)、Ag85B (Rv1886)，以及TB10.4 (Rv0288)。

5. 如請求項1或2之免疫性組合物，其中該潛伏期之抗原係選自於由Rv0111、Rv0569、Rv1733c、Rv1807、Rv1813、Rv2029c、Rv2626及Rv3407所組成之族群。
6. 如請求項1之免疫性組合物，其中該至少5種分枝桿菌抗原係選自於由含有至少80%同源或等同於SEQ ID NO: 1-10及12-24任一者之胺基酸序列的多胜肽所組成之族群。
7. 如請求項1或2之免疫性組合物，其中該免疫性組合物包含額外之分枝桿菌抗原。
8. 如請求項1或2之免疫性組合物，其中該免疫性組合物包含或編碼個別多胜肽形式，或一或多個融合多胜肽形式，或個別抗原與融合多胜肽二者皆有之形式之分枝桿菌抗原。
9. 如請求項8之免疫性組合物，其中該免疫性組合物包含或編碼一或多個融合多胜肽形式之分枝桿菌抗原。
10. 如請求項9之免疫性組合物，其中該一或多個融合多胜肽是選自：
 - (i) 一融合多胜肽，其包含結核分枝桿菌抗原RpfB與RpfD；
 - (ii) 一融合多胜肽，其包含結核分枝桿菌抗原RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT6；及
 - (iii) 一融合多胜肽，其包含結核分枝桿菌抗原Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD與Rv1733c。
11. 如請求項10之免疫性組合物，其中該一或多個融合多胜

肽是選自：

- (i) 一融合多胜肽，其包含一顯示至少80%等同於SEQ ID NO: 30或SEQ ID NO:31之胺基酸序列，其中該胺基酸序列進一步包含起始子Met；
- (ii) 一融合多胜肽，其包含一顯示至少80%等同於SEQ ID NO: 32或SEQ ID NO:33之胺基酸序列，其中該胺基酸序列進一步包含起始子Met；及
- (iii) 一融合多胜肽，其包含一顯示至少80%等同於SEQ ID NO: 36之胺基酸序列，其中該胺基酸序列進一步包含起始子Met。

12. 一種融合多胜肽，其包含如請求項1至10中任一項之免疫性組合物所包含或編碼之二或多個分枝桿菌抗原，其中該融合多胜肽包含結核分枝桿菌抗原RpfB及RpfD。

13. 如請求項12之融合多胜肽，其中該融合多胜肽包含：
相同感染期之分枝桿菌抗原；
源自兩個不同感染期之分枝桿菌抗原；或是
源自活躍、復甦與潛伏期之分枝桿菌抗原。

14. 如請求項13之融合多胜肽，其中該融合多胜肽選自於由下列組成之族群：

- (i) 一融合多胜肽，其包含結核分枝桿菌抗原RpfB與RpfD；
- (ii) 一融合多胜肽，其包含結核分枝桿菌抗原RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT6；及
- (iii) 一融合多胜肽，其包含結核分枝桿菌抗原Ag85B、

Rv2626、RpfB、RpfD與Rv1733c。

15. 如請求項14之融合多胜肽，其中該融合多胜肽選自於由下列組成之族群：
- (i) 一融合多胜肽，其包含一顯示至少80%等同於SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO:31之胺基酸序列，其中該胺基酸序列進一步包含起始子Met；
 - (ii) 一融合多胜肽，其包含一顯示至少80%等同於SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO:33之胺基酸序列，其中該胺基酸序列進一步包含起始子Met；及
 - (iii) 一融合多胜肽，其包含一顯示至少80%等同於SEQ ID NO: 36之胺基酸序列，其中該胺基酸序列進一步包含起始子Met。
16. 如請求項14之融合多胜肽，其中該融合多胜肽更包含選自於訊息及/或穿膜胜肽的適當標的胜肽。
17. 一種核酸分子，其編碼如請求項1至11中任一項之免疫性組合物、或如請求項12至16中任一項之融合多胜肽所包含之該等至少5種分枝桿菌抗原。
18. 一種載體，其包含如請求項17之一或多個核酸分子。
19. 如請求項18之載體，其中該載體為：
- 一質體載體；
 - 一病毒載體，其係選自於由反轉錄病毒、腺病毒，腺病毒相關之病毒(AAV)、痘病毒、疱疹病毒、麻疹病毒、泡沫病毒、甲病毒、水皰性口炎病毒所組成之族群；或
 - 一細菌細胞，其係選自於由牛分枝桿菌BCG、乳酸桿菌

(Lactobacillus)、李斯特菌(Listeria)、沙門氏菌(Salmonella)與假單胞菌(Pseudomonas)所組成之族群。

20. 如請求項19之載體，其中該載體為

一E1缺陷型腺病毒載體；或

一痘病毒載體，其係選自於由雞痘、金絲雀痘以及牛痘病毒載體所組成之族群，較佳地該牛痘病毒載體為哥本哈根(Copenhagen)、惠氏(Wyeth)、NYVAC及經改良之安卡拉(MVA)品系。

21. 如請求項19至20中任一項之載體，其選自於由下列組成之族群：

- i. 一載體，其編碼一包含Rv2029c、Rv2626、Rv1733c與Rv0111之融合多胜肽，以及一包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6之融合多胜肽；
- ii. 一載體，其編碼一包含Rv2029c、Rv2626、Rv1733c與Rv0111之融合多胜肽；一包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6之融合多胜肽；以及一包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807之融合多胜肽；
- iii. 一載體，其編碼一包含Rv2029c、Rv2626、Rv1733c與Rv0111之融合多胜肽；一包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6之融合多胜肽；以及一包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807之融合多胜肽；
- iv. 一載體，其編碼一包含Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD

- 與Rv1733c之融合多胜肽，以及一包含Rv2029c、TB10.4、ESAT-6與Rv0111之融合多胜肽；
- v. 一載體，其編碼一包含Ag85B、Rv2626、RpfB、RpfD與Rv1733c之融合多胜肽；一包含Rv2029c、TB10.4、ESAT-6與Rv0111之融合多胜肽；以及一包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807之融合多胜肽；以及
- vi. 一載體，其編碼一包含RpfB、RpfD、Ag85B、TB10.4與ESAT-6之融合多胜肽，以及一包含Rv0569、Rv1813、Rv3407、Rv3478與Rv1807之融合多胜肽。
22. 如請求項19或20之載體，其為感染性病毒顆粒形式。
23. 一種生產感染性病毒顆粒之方法，其包含下列步驟：(i) 將如請求項20至22中任一項之病毒載體，引入適用之細胞株，(ii)於適當條件下培養該細胞株，以允許生產該感染性病毒顆粒，(iii)由該細胞株培養物中回收生產出之病毒顆粒，以及(iv)任擇地純化該經回收之病毒顆粒。
24. 一種宿主細胞，其包含如請求項1至11中任一項之免疫性組合物、如請求項12至16中任一項之融合多胜肽、如請求項17之核酸分子，或如請求項18至22中任一項之載體。
25. 一種用於重組性生產分枝桿菌抗原之方法，該分枝桿菌抗原係如請求項1至11中任一項之免疫性組合物或如請求項12至16中任一項之融合多胜肽中所包含或編碼之分枝桿菌抗原，該方法包含下列步驟：(i)將載體引入適

用之宿主細胞，以產生經轉染或經感染之宿主細胞，(ii) 於適合該宿主細胞生長之條件下，活體外培養該經轉染或經感染之宿主細胞，(iii)回收細胞培養物，以及(iv)任擇地，由經回收之細胞及/或培養物上清液中，純化出該(等)分枝桿菌抗原或該融合多胜肽，其中該適用之宿主細胞較佳為大腸桿菌(*E coli*)宿主細胞，且特別為其基因組攜帶D13原噬菌體之大腸桿菌株。

26. 一種組成物，其包含如請求項1至11中任一項之免疫性組合物、如請求項12至16中任一項之融合多胜肽、如請求項17之核酸分子、如請求項18至22中任一項之載體，或如請求項24之宿主細胞，或其等之任何組合之至少一者，其中該組成物較佳地進一步包含醫藥上可接受之載劑。

27. 一種如請求項1至11中任一項之免疫性組合物、如請求項12至16中任一項之融合多胜肽、如請求項17之核酸分子、如請求項18至22中任一項之載體、如請求項24之宿主細胞，或如請求項26之組成物於製備一藥物之用途，該藥物係：

用於預防或治療分枝桿菌感染或此類分枝桿菌感染導致或相關之任何疾病及病理狀況；

用於預防有需求之個體受到分枝桿菌感染，或延遲其感染風險，尤其是針對與已發展為活動性病症之感染者密切接觸之個體；

用於治療經分枝桿菌菌種，尤其是結核分枝桿菌感

染之個體之活動性病症；

用於預防或治療經分枝桿菌菌種，尤其是結核分枝桿菌潛伏感染之個體之再激活；

作為BCG追加劑(booster)；

用於與一或多個化療藥物結合，以有效對抗分枝桿菌感染，尤其是一或多個抗生素化療；

用於誘發或增強經投藥個體之免疫反應，其中該經誘發或經刺激之免疫反應較佳為針對分枝桿菌抗原/表位之CD4+及/或CD8+媒介之T細胞反應。