



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2015.11.30

(21) Номер заявки
201100071

(22) Дата подачи заявки
2009.07.24

(51) Int. Cl. **A61K 39/04** (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ
ТУБЕРКУЛЁЗА**

(31) **61/083,692**

(32) **2008.07.25**

(33) **US**

(43) **2011.10.31**

(86) **PCT/EP2009/059586**

(87) **WO 2010/010180 2010.01.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А. (ВЕ);
ГЛАКСО ГРУП ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Браун Джеймс (US), Меттенс Паскаль
(ВЕ), Мерфи Деннис (US)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Борисова Е.Н. (RU)

(56) US-A1-2003236393
WO-A-2005076010
DATABASE UniProt [Online], 10 July 2007
(2007-07-10), "SubName: Full=PPE family protein";
XP002552250, retrieved from EBI accession
no. UNIPROT:A5U3B3, Database accession no.
A5U3B3, abstract

DATABASE UniProt [Online], 1 December
2001 (2001-12-01), "SubName: Full=PPE Rv1753c;
Flags: Fragment"; XP002552251, retrieved from EBI
accession no. NIPROT:Q93M49, Database accession
no. Q93M49, abstract

DATABASE UniProt [Online], 20 March 2007
(2007-03-20), "SubName: Full=PPE family protein";
XP002552252, retrieved from EBI accession. no.
UNIPROT:A2VIN4, Database accession no. A2VIN4,
abstract

DATABASE UniProt [Online], 6 February
2007 (2007-02-06), "SubName: Full=PPE family

protein"; XP002552262, retrieved from EBI,
accession no. UNIPROT:A1KJHO, Database
accession no. AIKJHO, abstract

CHAITRA M. G. ET AL.: "Defining putative
T cellepitopes from PE and PPE families of
proteins of Mycobacterium tuberculosis with vaccine
potential", VACCINE, vol. 23, no. 10, 26 January
2005 (2005-01-26), pages 1265-1272, XP004714023,
ISSN: 0264-410X, the whole document

CHAITRA M.G. ET AL.: "HLA-A*0201-
restricted cytotoxic T-cellepitopes in three PE/PPE
family proteins of Mycobacterium tuberculosis",
SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY,
vol. 67, no. 4, April 2008 (2008-04), pages 411-417,
XP002552248, ISSN: 0300-9475, the whole document

SKUCE ROBIN A. ET AL.: "Discrimination
of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria
using novel VNTR-PCR targets." MICROBIOLOGY
(READING, ENGLAND), FEB. 2002, vol. 148,
no. Pt 2, February 2002 (2002-02), pages 519-528,
XP002552249, ISSN: 1350-0872, abstract; table 2

GEY VAN PITTIUS NICOLAAS C. ET AL.:
"Evolution and expansion of the Mycobacterium
tuberculosis PE and PPE multigene families and
their association with the duplication of the ESAT-6
(esx) genecluster regions", BMC EVOLUTIONARY
BIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON,
GB, vol. 6, no. 1, 15 November 2006 (2006-11-15),
page 95, XP021022074, ISSN: 1471-2148, figure 10;
table 5

WO-A-2008107370

ROMANO M. ET AL.: "Immunogenicity
and protective efficacy of tuberculosis subunit
vaccines expressing PPE44 (Rv2770c)", VACCINE,
BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB,
vol. 26, no. 48, 11 November 2008 (2008-11-11),
pages 6053-6063, XP026034575, ISSN: 0264-410X
[retrieved on 2008-09-24], abstract

(57) Настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему: (1) последовательность белка Rv1753c; (2) вариант последовательности белка Rv1753c или (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c. В других аспектах изобретение относится к ассоциированным полинуклеотидам, слитым белкам и способам лечения или предупреждения туберкулеза.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептидам и полинуклеотидам для применения в лечении или предупреждении туберкулеза, в частности для применения в лечении или предупреждении латентного туберкулеза и в предупреждении или замедлении реактивации туберкулеза (и также к родственным способам). Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим и иммуногенным композициям, содержащим указанные полипептиды и полинуклеотиды, и к способам диагностики туберкулеза (в частности, латентного туберкулеза).

Предшествующий уровень техники

Туберкулез (ТВ) представляет собой хроническое инфекционное заболевание, вызываемое инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* и другими видами *Mycobacterium*. Это заболевание является основным заболеванием в развивающихся странах, а также представляет собой нарастающую проблему в развитых частях света. Считается, что более 2 миллиардов людей инфицированы бациллами ТВ, примерно с 9,2 млн новых случаев ТВ и 1,7 млн смертей ежегодно. У 10% инфицированных бациллами ТВ развивается активный ТВ, при этом каждый человек с активным ТВ в течение года заражает в среднем 10-15 других людей. Несмотря на то, что ежегодные показатели коэффициентов заболеваемости достигли своего пика во всем мире, количество смертельных исходов и случаев туберкулеза по-прежнему растет ввиду роста численности населения (Всемирная организация здравоохранения, Tuberculosis Facts, 2008).

Mycobacterium tuberculosis инфицирует людей через дыхательные пути. Альвеолярные макрофаги осуществляют захват этой бактерии, однако она способна выживать и пролиферировать благодаря ингибированию слияния фагосом с содержащими кислую среду лизосомами. Результатом является комплексный иммунный ответ, вовлекающий CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, в конечном итоге приводящий к образованию гранулёмы. Важным для успешного действия *Mycobacterium tuberculosis* как патогена является тот факт, что изолированные, но не искорененные бактерии могут сохраняться в течение длительных периодов времени, в результате чего индивидуум остается восприимчивым к развитию впоследствии активного ТВ.

Менее чем у 5% инфицированных индивидуумов активный ТВ развивается в первые годы после инфекции. Гранулёма может сохраняться десятилетиями, и предполагают, что она содержит живые *Mycobacterium tuberculosis* в состоянии покоя, без кислорода и питательных веществ. Однако недавно выдвинуто предположение, что большая часть бактерий в состоянии покоя локализована в типах клеток, не являющихся макрофагами, распределенных по всему организму (Locht et al., Expert Opin. Biol. Ther. 2007, 7(11): 1665-1677). Развитие активного ТВ происходит, когда баланс между природным иммунитетом хозяина и патогенным микроорганизмом изменяется, например, в результате иммуносупрессорного события (Anderson P., Trends in Microbiology, 2007, 15(1): 7-13; Ehlers S., Infection, 2009, 37(2): 87-95).

Также предложена динамическая гипотеза, описывающая баланс между латентным ТВ и активным ТВ (Cardana P. J., Inflammation & Allergy - Drug Targets, 2006, 6:27-39; Cardana P. J., Infection, 2009, 37(2): 80-86).

Несмотря на то, что инфекция может быть бессимптомной в течение значительного периода времени, активное заболевание в подавляющем большинстве случаев проявляется как острое воспаление легких, приводящее к повышенной утомляемости, потере массы, лихорадке и непрекращающемуся кашлю. При отсутствии лечения типичным результатом являются серьёзные осложнения и смерть.

Обычно туберкулез можно контролировать с использованием длительной терапии антибиотиками, хотя такое лечение не является достаточным для предупреждения распространения заболевания. Инфицированные индивидуумы могут в течение некоторого периода времени не проявлять симптомов, но быть заразными. Кроме того, несмотря на то, что соблюдение схемы лечения является критическим, поведение пациента трудно контролировать. Некоторые пациенты не завершают курс лечения, что может приводить к неэффективности лечения и развитию лекарственной устойчивости.

Мультирезистентный ТВ (MDR-TB) представляет собой форму, которая не отвечает на лекарственные средства первой линии. 5% всех случаев ТВ представляют собой MDR-TB, при этом в течение каждого года возникает приблизительно 490000 новых случаев MDR-TB. ТВ с широкой лекарственной устойчивостью (XDR-TB) возникает, когда помимо MDR-TB развивается резистентность к лекарственным средствам второй линии. По оценкам ежегодно возникает 40000 новых случаев фактически неизлечимого XDR-TB (Всемирная организация здравоохранения, Tuberculosis Facts, 2008).

Даже если полный курс лечения антибиотиками пройден, инфекция *M. tuberculosis* может не быть искоренена в инфицированном индивидууме, а может оставаться в виде латентной инфекции, которая может реактивироваться.

Для того чтобы контролировать распространение туберкулеза, крайне важным являются эффективная вакцинация и точный ранний диагноз заболевания.

Диагностику латентной ТВ инфекции обычно выполняют, применяя туберкулиновую кожную пробу, которая включает внутрикожное введение очищенного от белков туберкулина (PPD). Антиген-специфические Т-клеточные ответы приводят к измеряемому уплотнению в месте инъекции через 48-72 ч после инъекции, что указывает на контакт с микобактериальными антигенами. Однако проблемой этого теста является чувствительность и специфичность, и индивидуумов, вакцинированных БЦЖ, не всегда

можно легко отличить от инфицированных индивидуумов (это особенно важно в свете того факта, что БЦЖ не защищает от латентной инфекции). В общем, индивидуумы, получившие БЦЖ, но не инфицированные *M. tuberculosis*, демонстрируют реакцию на PPD менее 10 мм в диаметре, в то время как люди с реакцией на PPD более 10 мм в диаметре считаются инфицированными *M. tuberculosis*. Однако это правило не применимо к индивидуумам с иммуносупрессией вследствие ВИЧ-инфекции, которая может приводить к реакции на PPD менее 10 мм в диаметре; или в эндемичных странах, где люди, инфицированные нетуберкулезными микобактериями, могут демонстрировать реакцию на PPD более 10 мм в диаметре.

В последние годы наблюдается прогресс в разработке анализов *in vitro* с использованием Т-клеток, основанных на высвобождении интерферона-гамма и использовании антигенов, которые более специфичны к *M. tuberculosis*, чем PPD, а именно ESAT-6 (6 кДа ранний секреторный антиген) и CFP-10 (10 кДа белок культурального фильтрата). По-видимому, эти высокоспецифичные тесты имеют по меньшей мере такую же чувствительность, как и туберкулиновая кожная проба, и, кроме того, демонстрируют меньшую перекрестную реактивность, обусловленную вакцинацией БЦЖ. В качестве последнего обзора диагностики латентного TB см. Pai M. et al., Expert Rev. Mol. Diagn. 2006 6(3): 413-422. Однако, поскольку ESAT-6/CFP-10 являются антигенами ранней стадии, анализы, основанные на ESAT-6/CFP-10, оптимально можно выполнить только на недавно инфицированных людях. Следовательно идентификация новых антигенов, специфически ассоциированных с латентным туберкулезом, может помочь разработке более чувствительных методов анализа, с помощью которых можно было бы обнаружить долгосрочные латентные инфекции.

Сохраняется потребность в эффективных стратегиях для лечения и предупреждения туберкулеза, в частности лечения и предупреждения латентного TB и предупреждения реактивации TB.

Краткое изложение сущности изобретения

В целом настоящее изобретение относится к идентификации Rv1753c в качестве антигена TB (в частности, антигена, ассоциированного с латентным TB) и к родственным способам и применениям в предупреждении и лечении TB, особенно в предупреждении и лечении латентного TB и в предупреждении или замедлении реактивации TB.

Согласно настоящему изобретению предложен выделенный полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c.

Согласно настоящему изобретению также предложен полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c или

(3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c для применения в качестве лекарственного средства.

Следующий аспект изобретения относится к способу лечения или предупреждения TB, включающий введение безопасного и эффективного количества полипептида, содержащего:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c; или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c;

субъекту, нуждающемуся в этом, где указанный полипептид вызывает иммунный ответ, в частности иммунный ответ против *Mycobacterium tuberculosis*.

Применение полипептида, содержащего:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c;

в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения TB представляет собой другой аспект изобретения.

Согласно настоящему изобретению предложен выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c; или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c. Также предложен полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c или

(3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c для применения в качестве лекарственного средства.

Следующий аспект изобретения относится к способу лечения или предупреждения TB, включающему введение безопасного и эффективного количества полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий:

(1) последовательность белка Rv1753c;
 (2) вариант последовательности белка Rv1753c или
 (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c; субъекту, нуждающемуся в этом, где указанный полинуклеотид вызывает иммунный ответ, в частности иммунный ответ против *Mycobacterium tuberculosis*.

Применение полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c;

в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения ТБ представляет собой другой аспект изобретения.

В дополнение к этому предложена фармацевтическая композиция, содержащая:

(а) полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c; или

(б) полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид из (а); и

(в) фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Кроме того, предложена иммуногенная композиция, содержащая:

(а) полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c; или

(б) полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид из (а); и

(в) неспецифический усилитель иммунного ответа.

Также предложен экспрессирующий вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c; или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c.

Клетки хозяина, трансформированные указанным экспрессирующим вектором, образуют следующий аспект изобретения. Дополнительно предложена клетка-хозяин, которая рекомбинантно экспрессирует полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c; или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c.

Кроме того, предложен способ получения полипептида, содержащего:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c; или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c; причем указанный способ включает стадию рекомбинантной экспрессии указанного полипептида в клетке хозяина.

Дополнительно предложено антитело или его фрагмент, которые специфично связываются с полипептидом, содержащим:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c; или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c.

Также предложено применение указанных антител в диагностике (как например, в способах диагностики туберкулеза, включающих определение присутствия антитела или его фрагмента, которые специфично связываются с полипептидами по изобретению в биологическом образце, взятом у тестируемого субъекта).

Также предложены диагностические наборы, содержащие:

(а) полипептид по настоящему изобретению;

(б) устройство, обеспечивающее приведение указанного полипептида в контакт с образцом (например, с цельной кровью или более удобно с РВМС (моноклеарные клетки периферической крови)), взятым у индивидуума; и

(в) средства для количественного определения Т-клеточного ответа образца.

Другой аспект изобретения относится к диагностическому набору, содержащему:

(а) полипептид по настоящему изобретению; и

(б) устройство, обеспечивающее приведение указанного полипептида в контакт с клетками кожи

пациента.

В одном воплощении субъект, получающий полипептид, полинуклеотид или композицию по изобретению, может иметь активный туберкулез (например, активную инфекцию *M. tuberculosis*). Во втором воплощении субъект может иметь латентный туберкулез (например, скрытую инфекцию *M. tuberculosis*). В третьем воплощении субъект может не иметь туберкулеза (например, не иметь инфекции *M. tuberculosis*).

Субъект, получающий полипептид, полинуклеотид или композицию по изобретению, может быть предварительно вакцинированным от туберкулеза (например, вакцинированным против инфекции *M. tuberculosis*), например, вакцинированным бациллой Кальметта-Герена (БЦЖ). Альтернативно, субъект, получающий полипептид, полинуклеотид или композицию по изобретению, может быть не вакцинированным предварительно от туберкулеза (например, не вакцинированным против инфекции *M. tuberculosis*), например, не вакцинированным бациллой Кальметта-Герена (БЦЖ).

Описание графических материалов

Фиг. 1. Процент CD4 и CD8 клеток от иммунизированных СВ6F1 мышей, экспрессирующих цитокины IFN-гамма и/или IL-2, и/или TNF-альфа, на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации).

Фиг. 2. Цитокиновый профиль на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) антиген-специфического CD4-ответа у иммунизированных СВ6F1 мышей.

Фиг. 3. Цитокиновый профиль на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) антиген-специфического CD8-ответа у иммунизированных СВ6F1 мышей.

Фиг. 4. Процент CD4 и CD8 клеток от иммунизированных СВ6F1 мышей, экспрессирующих цитокины IFN-гамма и/или IL-2, и/или TNF-альфа на 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации).

Фиг. 5. Цитокиновый профиль на 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации) антиген-специфического CD4-ответа у иммунизированных СВ6F1 мышей.

Фиг. 6. Цитокиновый профиль на 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации) антиген-специфического CD8-ответа у иммунизированных СВ6F1 мышей.

Фиг. 7. Процент CD4 и CD8 клеток от иммунизированных C57BL/6 мышей, экспрессирующих цитокины IFN-гамма и/или IL-2, и/или TNF-альфа на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации).

Фиг. 8. Цитокиновый профиль на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) антиген-специфического CD4-ответа у иммунизированных C57BL/6 мышей.

Фиг. 9. Цитокиновый профиль на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) антиген-специфического CD8-ответа у иммунизированных C57BL/6 мышей.

Фиг. 10. Антиген-специфические CD4-Т-клеточные ответы у ранее не подвергавшихся инфекции людей и людей с латентной инфекцией.

Описание списка последовательностей

SEQ ID No: 1: полипептидная последовательность Rv1753c из штамма H37Rv *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 2: полинуклеотидная последовательность Rv1753c из штамма H37Rv *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 3: полипептидная последовательность Rv1753c из штамма CDC1551 *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 4: полипептидная последовательность Rv1753c из штамма F11 *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 5: полипептидная последовательность Rv1753c из штамма Haarlem A *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 6: полипептидная последовательность Rv1753c из штамма C *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 7: полипептидная последовательность Rv1753c из БЦЖ.

SEQ ID No: 8: полипептидная последовательность Mtb8.4.

SEQ ID No: 9: полипептидная последовательность Mtb9.8.

SEQ ID No: 10: полипептидная последовательность Mtb9.9.

SEQ ID No: 11: полипептидная последовательность Ra12.

SEQ ID No: 12: полипептидная последовательность Ra35.

SEQ ID No: 13: полипептидная последовательность TbH9.

SEQ ID No: 14: полипептидная последовательность Mtb40.

SEQ ID No: 15: полипептидная последовательность Mtb41.

SEQ ID No: 16: полипептидная последовательность ESAT-6.

SEQ ID No: 17: полипептидная последовательность Ag85A.

SEQ ID No: 18: полипептидная последовательность Ag85B.

SEQ ID No: 19: полипептидная последовательность альфа-кристаллина.

SEQ ID No: 20: полипептидная последовательность MPT64.

SEQ ID No: 21: полипептидная последовательность Mtb32A.

SEQ ID No: 22: полипептидная последовательность Ser/Ala-мутантного зрелого Mtb32A.

SEQ ID No: 23: полипептидная последовательность TB10.4.

SEQ ID No: 24: полипептидная последовательность Mtb72f.

SEQ ID No: 25: полипептидная последовательность M72.

SEQ ID No: 26: полипептидная последовательность Mtb71f.

SEQ ID No: 27: полипептидная последовательность слитой конструкции M92.

SEQ ID No: 28: полипептидная последовательность слитой конструкции M103.

SEQ ID No: 29: полипептидная последовательность слитой конструкции M114.

SEQ ID No: 30: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 1 человека.
 SEQ ID No: 31: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 2 человека.
 SEQ ID No: 32: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 3 человека.
 SEQ ID No: 33: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 4 человека.
 SEQ ID No: 34: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 5 человека.
 SEQ ID No: 35: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 6 человека.
 SEQ ID No: 36: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 7 человека.
 SEQ ID No: 37: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 8 человека.
 SEQ ID No: 38: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 9 человека.
 SEQ ID No: 39: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 10 человека.
 SEQ ID No: 40: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 11 человека.
 SEQ ID No: 41: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 12 человека.
 SEQ ID No: 42: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 13 человека.
 SEQ ID No: 43: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 14 человека.
 SEQ ID No: 44: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 15 человека.
 SEQ ID No: 45: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 16 человека.
 SEQ ID No: 46: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 17 человека.
 SEQ ID No: 47: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 18 человека.
 SEQ ID No: 48: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 19 человека.
 SEQ ID No: 49: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 20 человека.
 SEQ ID No: 50: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 21 человека.
 SEQ ID No: 51: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 22 человека.
 SEQ ID No: 52: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 23 человека.
 SEQ ID No: 53: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 24 человека.
 SEQ ID No: 54: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 25 человека.
 SEQ ID No: 55: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 26 человека.
 SEQ ID No: 56: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 27 человека.
 SEQ ID No: 57: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 28 человека.
 SEQ ID No: 58: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 29 человека.
 SEQ ID No: 59: предсказанный CD4 клеточный эпитоп 30 человека.
 SEQ ID No: 60: предсказанный CD8 клеточный эпитоп 1 человека.

[illegible]

SEQ ID No: 226:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 167 человека.
SEQ ID No: 227:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 168 человека.
SEQ ID No: 228:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 169 человека.
SEQ ID No: 229:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 170 человека.
SEQ ID No: 230:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 171 человека.
SEQ ID No: 231:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 172 человека.
SEQ ID No: 232:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 173 человека.
SEQ ID No: 233:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 174 человека.
SEQ ID No: 234:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 175 человека.
SEQ ID No: 235:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 176 человека.
SEQ ID No: 236:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 177 человека.
SEQ ID No: 237:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 178 человека.
SEQ ID No: 238:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 179 человека.
SEQ ID No: 239:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 180 человека.
SEQ ID No: 240:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 181 человека.
SEQ ID No: 241:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 182 человека.
SEQ ID No: 242:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 183 человека.
SEQ ID No: 243:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 184 человека.
SEQ ID No: 244:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 185 человека.
SEQ ID No: 245:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 186 человека.
SEQ ID No: 246:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 187 человека.
SEQ ID No: 247:	предсказанный CD8 клеточный эпитоп 188 человека.
SEQ ID No: 248:	полипептидная последовательность Rv2386c из штамма H37Rv <i>M. tuberculosis</i> .
SEQ ID No: 249:	полипептидная последовательность Rv2707c из штамма H37Rv <i>M. tuberculosis</i> .

Подробное описание

В настоящее время вакцинация живыми бактериями является наиболее эффективным способом индукции защитного иммунитета. Наиболее часто используемой для этой цели микобактерией является бацилла Кальметта-Герена (БЦЖ), авирулентный штамм *M. bovis*, который был разработан более 60 лет назад. Однако безопасность и эффективность БЦЖ являются предметом дискуссии: защищая от тяжелого проявления болезни у детей, БЦЖ не предотвращает возникновение латентного ТБ или реактивацию болезни легких во взрослой жизни. Кроме того, в некоторых странах, таких как Соединенные Штаты, широкую вакцинацию населения этим агентом не проводят.

Почти все вакцины против ТБ нового поколения, которые в настоящее время находятся в стадии клинической разработки, были разработаны как вакцины прединфекционной профилактики. Они включают субъединичные вакцины, которые особенно эффективны в повышении иммунитета, индуцируемого предшествующей вакцинацией БЦЖ, и усовершенствованные живые микобактериальные вакцины, которые предназначены для того, чтобы заменить БЦЖ на более эффективные и/или безопасные штаммы. Несмотря на то, что эти вакцины предназначены для улучшения устойчивости к инфекции, по всей вероятности они менее эффективны в качестве постинфекционных или терапевтических вакцин в случаях латентного ТБ (Lin M.Y. et al., *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 2008, 8: 15-29).

Показано, что некоторые белки, которые интенсивно экспрессируются на ранних стадиях микобактериальной инфекции, обеспечивают высокую защитную эффективность в моделях вакцинации на животных. Тем не менее, вакцинация антигенами, которые интенсивно экспрессируются на ранних стадиях инфекции, не может обеспечить оптимальный иммунный ответ на более поздних стадиях инфекции. Для адекватного контроля на более поздних стадиях инфекции могут потребоваться Т-клетки, которые являются специфичными к определенным антигенам, которые экспрессируются на тот момент времени.

Постинфекционные вакцины, которые нацелены непосредственно на находящиеся в состоянии покоя персистирующие бактерии, могут оказывать содействие в защите от реактивации ТБ, тем самым усиливая контроль над ТБ или даже давая возможность устранения инфекции. Поэтому вакцина, нацеленная на латентный ТБ, могла бы значительно и экономично снизить общие уровни зараженности ТБ.

Субъединичные вакцины на основе антигенов поздних стадий также могут быть использованы в комбинации с антигенами ранних стадий для приготовления мультифазной вакцины. Альтернативно, антигены поздних стадий могли бы быть использованы для дополнения и улучшения вакцинации БЦЖ (либо путём усиления ответа на БЦЖ, либо путём разработки усовершенствованных рекомбинантных штаммов БЦЖ).

Недавно на основании биоинформационного анализа полного генома *M. tuberculosis* (Zvi et al., BMC Medical Genetics, 2008, 1:18) и тестирования дифференциально экспрессируемых белков у индивидуумов, пораженных активной и латентной инфекцией (Schuck S.D. et al., PLoS ONE, 2009, 4(5): e5590), была предложена группа вакцин-кандидатов против *M. tuberculosis*.

В то время как макрофаги, как было показано, действуют в качестве главных эффекторов иммунитета к *Mycobacterium*, Т-клетки являются преобладающими индукторами такого иммунитета. Существенную роль Т-клеток в защите против туберкулеза иллюстрирует повышенная частота реактивации ТВ у индивидуумов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, вследствие связанного с этим истощения CD4⁺ Т-клеток. Более того, показано, что адаптивный перенос CD4⁺ Т-клеток, полученных на пике первичного иммунного ответа на *M. tuberculosis*, предоставляет защиту против *M. tuberculosis* дефицитным по Т-клеткам мышам (Orme et al., J. Exp. Med, 1983, 158:74-83).

Показано, что *Mycobacterium*-реактивные CD4⁺ Т-клетки являются мощными продуцентами γ -интерферона (IFN- γ), для которого, в свою очередь, показано, что он запускает антимикобактериальные эффекты макрофагов у мышей (Flynn et al., J. Exp. Med., 1993, 178: 2249-2254). В то время как роль IFN- γ у людей менее понятна, исследования показали, что 1,25-дигидроксивитамин D3, либо сам по себе, либо в комбинации с IFN- γ или фактором некроза опухоли-альфа, активирует макрофаги человека для ингибирования инфекции *M. tuberculosis*. Кроме того, известно, что IFN- γ стимулирует макрофаги человека к продукции 1,25-дигидроксивитамина D3. Аналогично показано, что интерлейкин-12 (IL-12) играет роль в стимуляции устойчивости к инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*. Для обзора иммунологии инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*, см. Chan & Kaufmann, Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control (Bloom ed., 1994), Tuberculosis (2-е изд., Rom and Garay, eds., 2003) и Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16-е изд., Braunwald, et al., eds., 2005).

В целом настоящее изобретение относится к идентификации Rv1753c в качестве антигена ТВ (в частности, антигена, ассоциированного с латентным ТВ) и к родственным способам и применениям в предупреждении и лечении ТВ, особенно в предупреждении и лечении латентного ТВ и в предупреждении или замедлении реактивации ТВ.

Таким образом, согласно изобретению предложен белок Rv1753c, его вариант или его иммуногенный фрагмент, либо полинуклеотид, кодирующий указанный белок, вариант или фрагмент, для применения в лечении или предупреждении ТВ. Удобно, когда применение может быть специфично в предупреждении и лечении латентного ТВ (особенно лечении латентного ТВ). Альтернативно, применение может заключаться в предупреждении или замедлении реактивации ТВ (особенно замедлении реактивации ТВ, например, на период времени в несколько месяцев, лет или даже на неограниченный период времени).

Термин "виды *Mycobacterium* туберкулезного комплекса" включает такие виды, которые традиционно считаются вызывающими заболевание туберкулез, а также присутствующие в окружающей среде и условно-патогенные виды *Mycobacterium*, которые вызывают туберкулез и болезнь легких у иммунологически скомпрометированных (immune compromised) пациентов, таких как пациенты со СПИДом, например, *M. tuberculosis*, *M. bovis* или *M. africanum*, БЦЖ, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. celatum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. vaccae*, *M. fortuitum* и *M. scrofulaceum* (см., например, Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16-е изд., Braunwald, et al., eds., 2005)). Настоящее изобретение относится особенно к инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*.

Термин "активная инфекция" относится к инфекции (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*) с проявляющимися симптомами заболевания и/или поражениями (соответственно с проявляющимися симптомами заболевания).

Термины "неактивная инфекция", "скрытая инфекция" или "латентная инфекция" относятся к инфекции (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*) без проявляющихся симптомов заболевания и/или поражений (соответственно без проявляющихся симптомов заболевания).

Термин "первичный туберкулез" относится к клинической форме заболевания (проявлению симптомов заболевания), следующей непосредственно за инфекцией (например, инфекцией, вызываемой *M. tuberculosis*). См. Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16-е изд., Braunwald, et al., eds., 2005).

Термины "вторичный туберкулез" или "постпервичный туберкулез" относятся к реактивации скрытой, неактивной или латентной инфекции (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*). См. Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16-е изд., Braunwald, et al., eds., 2005).

Термин "реактивация туберкулеза" относится к более позднему проявлению симптомов заболевания у индивидуума, который имеет положительные результаты в тесте на инфекцию (например, в туберкулиновой кожной пробе, подходящим образом в анализе *in vitro*, основанном на использовании Т-

клеток), но не имеет очевидных симптомов заболевания. Положительный результат диагностического теста указывает на то, что индивидуум инфицирован, однако этот индивидуум может иметь или может не иметь ранее проявлявшихся активных симптомов заболевания, которые были подвергнуты лечению в достаточной степени для того, чтобы перевести туберкулез в неактивное или латентное состояние. Общепризнано, что способы предупреждения, замедления или лечения реактивации туберкулеза могут быть иницированы у индивидуума, демонстрирующего активные симптомы заболевания.

Термин туберкулез "устойчивый к лекарственным средствам" относится к инфекции (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*), при которой инфицирующий штамм не останавливается в развитии или не убивается (то есть является устойчивым к) одним или более чем одним так называемым химиотерапевтическим агентом "первой линии", эффективным в лечении туберкулеза (например, изониазидом, рифампином, этамбутолом, стрептомицином и пипразинамидом).

Термин "мультирезистентный" туберкулез относится к инфекции (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*), при которой инфицирующий штамм устойчив к двум или более химиотерапевтическим агентам "первой линии", эффективным в лечении туберкулеза.

"Химиотерапевтический агент" относится к фармакологическому агенту, который известен и используется в данной области для лечения туберкулеза (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*). Типичные фармакологические агенты, используемые для лечения туберкулеза, включают амикацин, аminosалициловую кислоту, капреомицин, циклосерин, этамбутол, этионамид, изониазид, канамицин, пипразинамид, рифамицины (то есть рифампин, рифапентин и рифабутин), стрептомицин, офлоксацин, ципрофлоксацин, кларитромицин, азитромицин и фторхинолоны, но этим не ограничиваются. Химиотерапевтические агенты "первой линии" или "передовой линии", используемые для лечения туберкулеза, не обладающего лекарственной устойчивостью, включают изониазид, рифампин, этамбутол, стрептомицин и пипразинамид. Химиотерапевтические агенты "второй линии", используемые для лечения туберкулеза, демонстрирующего лекарственную устойчивость к одному или более чем одному лекарственному средству "первой линии", включают офлоксацин, ципрофлоксацин, этионамид, аminosалициловую кислоту, циклосерин, амикацин, канамицин и капреомицин. Обзор таких фармакологических агентов приведен в главе 48 Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman and Limbird eds., 2001.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Данные термины также применяются к аминокислотным полимерам, в которых один или более чем один аминокислотный остаток представляет собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, а также к природным полимерам аминокислот и неприродным полимерам аминокислот. Удобно, когда полипептид по настоящему изобретению будет состоять только из природных аминокислотных остатков, особенно таких аминокислот, которые кодируются генетическим кодом.

Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, которые подвергаются более поздним модификациям, например гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Термин "аналоги аминокислот" относится к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, то есть α -углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и группой R, например гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, как у природной аминокислоты. Термин "миметики аминокислот" относится к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно природной аминокислоте. Удобно, когда аминокислота представляет собой природную аминокислоту или аналог аминокислоты, особенно природную аминокислоту и, в частности, те аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом.

"Нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи в остове, которые являются синтетическими, природными и неприродными, которые имеют связывающие свойства, подобные связывающим свойствам эталонной нуклеиновой кислоты, и которые метаболизируются аналогично эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК). Соответственно, термин "нуклеиновая кислота" относится к природным дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам.

Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также полностью охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и

комплементарные последовательности, а также подробно указанную последовательность (удобно, когда это относится к подробно указанной последовательности). Конкретно, замены вырожденных кодонов могут быть получены путем создания последовательностей, в которых третье положение в одном или более выбранных (или всех) кодонов содержит замены на остатки смешанных оснований и/или дезоксиинозина (Batzereff et al., *Nucleic Acid Res.*, 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8: 91-98 (1994)). Термин "нуклеиновая кислота" используется взаимозаменяемо с терминами "ген", "кДНК", "мРНК", "олигонуклеотид" и "полинуклеотид".

Аминокислоты здесь могут быть обозначены либо в соответствии с их общеизвестными трехбуквенными символами, либо в соответствии с однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре Международного союза по теоретической и прикладной химии/Международного биохимического союза (IUPAC-IUB). Аналогично, нуклеотиды могут быть обозначены в соответствии с их общепринятыми однобуквенными кодами.

Под термином "последовательность белка Rv1753c", как он использован здесь, понимается полипептидная последовательность, приведенная в SEQ ID No: 1, или её гомолог из вида *Mycobacterium tuberculosis* комплекс, например такого вида, как *M. tuberculosis*, *M. bovis* или *M. africanum*, или вида *Mycobacterium*, который присутствует в окружающей среде или является условно-патогенным и который вызывает оппортунистические инфекции, такие как легочные инфекции, у хозяев с ослабленным иммунитетом (например, у пациентов со СПИДом), например, БЦЖ, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. celatum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. vaccae*, *M. fortuitum* и *M. scrofulaceum* (см., например, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Chapter 150, pp. 953-966 (16-е изд., Braunwald, et al, eds., 2005)).

Для обеспечения высокого показателя эффективности среди вакцинируемых реципиентов компоненты вакцины должны быть высоко консервативными среди штаммов клинической значимости. Подходящим образом белок Rv1753c происходит из H37Rv *M. tuberculosis* (то есть полипептидной последовательности, приведенной в SEQ ID No: 1) или является его гомологом из другого штамма *M. tuberculosis* (такого как штаммы CDC1551, F11, Haarlem A и C). Штаммы *M. tuberculosis*, которые ассоциированы с лекарственной устойчивостью, представляют собой особенно важную основу для последовательности белка Rv1753c. Представляющие интерес штаммы включают:

CDC1551 - трансмиссивный и вирулентный штамм;

семейство Haarlem (как например, Haarlem A) - штаммы с лекарственной устойчивостью, обнаруженные в местах проживания большого количества людей. Члены семейства Haarlem из штаммов *M. tuberculosis* обнаружены во многих частях мира. Первый представитель данного семейства был открыт в Харлеме (Haarlem, The Netherlands);

KZN4207 - чувствительный к лекарственным средствам изолят, полученный от пациентов Квазулу-Натал (Южная Африка);

KZN1435 - мультирезистентный (MDR) изолят, полученный от пациентов Квазулу-Натал (Южная Африка);

KZN605 - изолят с широкой лекарственной устойчивостью (XDR), полученной от пациентов Квазулу-Натал (Южная Африка);

C - широко распространенный в Нью-Йорке. В одном исследовании было обнаружено, что этот штамм наиболее часто встречается среди принимающих инъекционные препараты, и что он устойчив к химически активным промежуточным соединениям азота (Friedman et al. *J. Infect. Dis.* 1997 176(2):478-84);

94_M4241A - выделенный в Сан-Франциско в 1994 г. от пациента, рожденного в Китае. Этот штамм ранее был изучен с использованием делеционного анализа генома (Gagneux et al., *PNAS*, 2006, 103(8): 2869-2873);

02_1987 - выделенный в Сан-Франциско в 2002 г. от пациента, рожденного в Южной Корее. Этот штамм ранее был изучен с использованием анализа делеционного анализа генома (Gagneux et al., *PNAS*, 2006, 103(8): 2869-2873);

T92 - выделенный в Сан-Франциско в 1999 г. от пациента, рожденного на Филиппинах. Данные об этом штамме опубликованы в Hirsh et al. *PNAS*, 2004, 101:4871-4876;

T85 - выделенный в Сан-Франциско в 1998 г. от пациента, рожденного в Китае. Данные об этом штамме опубликованы в Hirsh et al. *PNAS*, 2004, 101: 4871-4876;

EAS054 - выделенный в Сан-Франциско в 1993 г. от пациента, рожденного в Индии. Этот штамм ранее был изучен с использованием делеционного анализа генома (Gagneux et al., *PNAS*, 2006, 103(8): 2869-2873).

Gagneux et al., *PNAS*, 2006, 103(8): 2869-2873 и Herbert et al. *Infect. Immun.*, 2007, 75(12): 5798-5805 обеспечивают полезные знания в отношении группы известных существующих штаммов *M. tuberculosis*.

Наиболее удобно, когда белок Rv1753c выбран из полипептидных последовательностей, приведенных в SEQ ID No: 1 и 3-7, в частности SEQ ID No: 1 и 3-6, например SEQ ID No: 1.

Представляющими особый интерес полинуклеотидами являются полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую (как например, состоящую из последовательности, кодирующей):

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c; или
- (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c. Полинуклеотиды соответствующим образом будут содержать (например, состоять из) вариант(а) SEQ ID NO: 2 или фрагмент(а) SEQ ID NO: 2, который кодирует иммуногенный фрагмент белка Rv1753c.

Комбинации

Rv1753c-родственные полипептиды по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие компоненты, сконструированные для усиления их иммуногенности или для улучшения этих антигенов в других отношениях. Например, улучшенному выделению полипептидных антигенов может способствовать добавление последовательности из остатков гистидина (широко известный как his-метка) к одному концу антигена.

Термин "his-метка" относится к последовательности из остатков гистидина, в типичном случае из шести остатков, которые встроены в эталонную последовательность. Чтобы свести к минимуму нарушение активности, связанной с эталонной последовательностью, his-метку обычно встраивают на N-конце, обычно сразу же после иницирующего остатка метионина, или же на C-конце. Они обычно являются гетерологичными в отношении нативной последовательности, но их вводят, поскольку они облегчают выделение путем улучшения связывания белка со смолами для аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC). Вообще, наличие или отсутствие his-метки не существенно с точки зрения индукции желаемого иммунного ответа против эталонного белка. Однако, чтобы избежать риска неблагоприятной реакции против самой his-метки, считается, что лучше всего свести к минимуму длину his-метки, например до четырех или менее чем четырех остатков, в частности, до двух остатков (или полностью исключить применение his-метки).

Для того чтобы улучшить величину и/или широту охвата вызываемого иммунного ответа, композиции, полипептиды и нуклеиновые кислоты по изобретению могут содержать многочисленные копии антигена по изобретению и/или дополнительных гетерологичных полипептидов (или полинуклеотидов, кодирующих их) из вида *Mycobacterium* (в частности, *M. tuberculosis*).

Специалисту в данной области техники будет понятно, что если в комбинации используют несколько компонентов, то точная форма представления может быть различной. Например, компонент Rv1753c и дополнительная копия антигена по изобретению или дополнительный гетерологичный антигенный компонент могут быть представлены:

- (1) в виде двух индивидуальных полипептидных компонентов;
- (2) в виде слитого белка, содержащего оба полипептидных компонента;
- (3) в виде одного полипептидного и одного полинуклеотидного компонента;
- (4) в виде двух индивидуальных полинуклеотидных компонентов;
- (5) в виде единого полинуклеотида, кодирующего два отдельных полипептидных компонента; или
- (6) в виде единого полинуклеотида, кодирующего слитый белок, содержащий оба полипептидных компонента.

Такая гибкость применима в равной мере к ситуациям, когда в комбинации используют три или более чем три компонента. Однако для удобства часто желательно, чтобы в случае, если присутствует несколько компонентов, они содержались в едином слитом белке или полинуклеотиде, кодирующем единый слитый белок. В одном воплощении изобретения все антигенные компоненты предложены в виде полипептидов (например, в едином слитом белке). В альтернативном воплощении изобретения все антигенные компоненты предложены в виде полинуклеотидов (например, единого полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего единый слитый белок).

Термин "гетерологичный", когда он используется в отношении участков нуклеиновой кислоты, означает, что нуклеиновая кислота содержит две или более чем две подпоследовательности, которые не обнаруживаются в таком же взаимном расположении относительно друг друга в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают с помощью технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот, таким образом, что она имеет две или более последовательностей из неродственных генов, расположенных так, чтобы создать новую функциональную нуклеиновую кислоту, например, промотор из одного источника, а кодирующая область из другого источника. Аналогично, термин "гетерологичный белок" означает, что белок содержит две или более чем две подпоследовательности, которые не обнаруживаются в таком же взаимном расположении относительно друг друга в природе (например, слитый белок).

Термин "слитый полипептид" или "слитый белок" относится к белку, имеющему по меньшей мере два гетерологичных полипептида (например, по меньшей мере два полипептида из *Mycobacterium* sp.), связанных ковалентно либо непосредственно, либо через аминокислотный линкер. Полипептиды, образующие слитый белок, обычно связаны С-концом к N-концу, хотя они также могут быть связаны С-концом к С-концу, N-концом к N-концу или N-концом к С-концу. Полипептиды слитого белка могут располагаться в любом порядке. Этот термин также относится к консервативно модифицированным вариантам, полиморфным вариантам, аллелям, мутантам, иммуногенным фрагментам и межвидовым гомологам антигенов, из которых составлен слитый белок. Антигены *Mycobacterium tuberculosis* описаны в Cole et al., *Nature*, 393: 537 (1998), в которой полностью раскрыт геном *Mycobacterium tuberculosis*. Анти-

гены из другого вида *Mycobacterium*, соответствующие антигенам *M. tuberculosis*, можно идентифицировать, например, используя алгоритмы сравнения последовательностей, как изложено здесь, или другие методы, известные специалистам в данной области техники, например, гибридизационные анализы и анализы связывания антител.

Термин "слитый" относится к ковалентной связи между двумя полипептидами в слитом белке. Обычно полипептиды соединены посредством пептидной связи либо непосредственно друг с другом, либо через аминокислотный линкер. Возможно, пептиды могут быть соединены посредством непептидных ковалентных связей, известных специалистам в данной области.

Типичные антигены *M. tuberculosis*, которые можно комбинировать с Rv1753c, включают один или более чем один (например, 1-5, как например, 1-3, в частности 1) антиген из следующих (например, один или более чем один из (1)-(12)):

(1) Mtb8.4 (также известный как DPV и Rv1174c), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 102 в WO 97/09428 (кДНК в SEQ ID No: 101) и в Coler et al., *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2356-2364. Особый интерес представляет последовательность зрелого Mtb8.4, у которого отсутствует лидерный сигнальный пептид (то есть аминокислотные остатки 15-96 из SEQ ID No: 102 в WO97/09428). Полноразмерная полипептидная последовательность Mtb8.4 показана в SEQ ID No: 8;

(2) Mtb9.8 (также известный как MSL и Rv0287), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 109 в WO 98/53075 (фрагменты MSL описаны в SEQ ID No: 110-124 в WO98/53075, причём SEQ ID No: 119 и 120 представляют особый интерес) и также в Coler et al., *Vaccine*, 2009, 27: 223-233 (в частности, активные фрагменты показаны здесь на фиг. 2). Полноразмерная полипептидная последовательность Mtb9.8 показана в SEQ ID No: 9;

(3) Mtb9.9 (также известный как Mtb9.9A, MTI, MTI-A и Rv1793), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 19 в WO 98/53075 и в Alderson et al., *Journal of Experimental Medicine*, 2000, 7: 551-559 (фрагменты MTI описаны в SEQ ID No: 17 и 51-66 в WO 98/53075, причём SEQ ID No: 17, 51, 52, 53, 56 и 62-65 представляют особый интерес). Несколько полипептидных вариантов MTI описаны в SEQ ID No: 21, 23, 25, 27, 29 и 31 в WO98/53075 и в Alderson et al., *Journal of Experimental Medicine*, 2000, 7: 551-559. Полноразмерная полипептидная последовательность Mtb9.9 показана в SEQ ID No: 10;

(4) Ra12 (также известный как С-концевой антиген Mtb32A), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 10 в WO 01/98460 и в Skeiky et al., *Journal of Immunology*, 2004, 172: 7618-7682. Полноразмерная полипептидная последовательность Ra12 показана в SEQ ID No: 11;

(5) Ra35 (также известный как N-концевой антиген Mtb32A), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 8 в WO 01/98460 и в Skeiky et al., *Journal of Immunology*, 2004, 172: 7618-7682. Полноразмерная полипептидная последовательность Ra35 показана в SEQ ID No: 12;

(6) TbH9 (также известный как Mtb39, Mtb39A, TbH9FL и Rv1196), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 107 в WO 97/09428, а также в Dillon et al., *Infection and Immunity*, 1999, 67(6): 2941-2950 и Skeiky et al., *Journal of Immunology*, 2004, 172: 7618-7682. Полноразмерная (FL) полипептидная последовательность TbH9 показана в SEQ ID No: 13;

(7) Mtb40 (также известный как HTCC1 и Rv3616c), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 138 в WO 98/53075 (кДНК в SEQ ID No: 137). Полноразмерная полипептидная последовательность Mtb40 показана в SEQ ID No: 14;

(8) Mtb41 (также известный как MTCC2 и Rv0915c), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 142 в WO 98/53075 (кДНК в SEQ ID No: 140) и в Skeiky et al., *Journal of Immunology*, 2000, 165: 7140-7149. Полноразмерная полипептидная последовательность Mtb41 показана в SEQ ID No: 15;

(9) ESAT-6 (также известный как esxA и Rv3875), полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 103 в WO 97/09428 (кДНК в SEQ ID No: 104) и в Sorensen et al., *Infection and Immunity*, 1995, 63(5): 1710-1717. Полноразмерная полипептидная последовательность ESAT-6 показана в SEQ ID No: 16;

(10) антигены комплекса Ag85 (например, Ag85A, также известного как fbpA и Rv3804c; или Ag85B, также известного как fbpB и Rv1886c), обсуждение которых приведено, например, в Content et al., *Infection and Immunity*, 1991, 59: 3205-3212 и в Huygen et al., *Nature Medicine*, 1996, 2(8): 893-898. Полноразмерная полипептидная последовательность для Ag85A показана в SEQ ID No: 17 (зрелый белок с остатками 43-338, то есть не имеющий сигнального пептида, представляющий особый интерес). Полноразмерная полипептидная последовательность для Ag85B показана в SEQ ID No: 18 (зрелый белок с остатками 41-325, то есть не имеющий сигнального пептида, представляющий особый интерес);

(11) альфа-кристаллин (также известный как hspX (белок теплового шока X) и Rv2031c), который описан в Verbon et al., *Journal of Bacteriology*, 1992, 174: 1352-1359 и Friscia et al., *Clinical and Experimental Immunology*, 1995, 102: 53-57 (представляющими особый интерес являются фрагменты, соответствующие остаткам 71-91, 21-40, 91-110 и 111-130). Полноразмерная полипептидная последовательность альфа-кристаллина показана в SEQ ID No: 19;

(12) Mpt64 (также известный как Rv1980c), который описан в Roche et al., *Scandinavian Journal of*

Immunology, 1996, 43: 662-670. Полноразмерная полипептидная последовательность MPT64 показана в SEQ ID No: 20 (зрелый белок с остатками 24-228, то есть не имеющий сигнального пептида, представляющий особый интерес);

(13) Mtb32A, полипептидная последовательность которого описана в SEQ ID No: 2 (полноразмерная), а остатки 8-330 в SEQ ID No: 4 (зрелая форма) в WO 01/98460, особенно варианты, имеющие мутацию по меньшей мере в одной каталитической триаде (например, каталитический остаток серина, который может быть, например мутирован в аланин). Полноразмерная полипептидная последовательность для Mtb32A показана в SEQ ID No: 21. Зрелая форма Mtb32A имеющая мутацию Ser/Ala показана в SEQ ID No: 22;

(14) TB10.4, полноразмерная полипептидная последовательность для TB10.4 показана в SEQ ID No: 23;

(15) Rv2386c, полноразмерная полипептидная последовательность для Rv2386c из *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv показана в SEQ ID No: 248; и/или

(16) Rv2707c, полноразмерная полипептидная последовательность Rv2707c из *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv показана в SEQ ID No: 249;

или их комбинаций, таких как (например, таких комбинаций, как (а)-(ж)):

(а) комбинация компонентов Ra12, TbH9 и Ra35, например в форме слитого белка, такого как Mtb72f. Полипептидная последовательность Mtb72f описана в SEQ ID No: 6 в WO 2006/117240 (кДНК в SEQ ID No: 5) и в Skeiky et al., *Journal of Immunology*, 2004, 172: 7618-7682 (где она включает возможную His-метку для облегчения очистки; при использовании в настоящем изобретении Mtb72f подходящим образом не содержит дополнительных остатков гистидина). Полипептидная последовательность для Mtb72f показана в SEQ ID No: 24;

(б) комбинация компонентов Ra12, TbH9 и Ra35 с мутацией Ser/Ala (то есть где каталитический остаток серина заменен на аланин), например в форме слитого белка, такого как M72. Полипептидная последовательность M72 описана в SEQ ID No: 4 в WO 2006/117240 (кДНК в SEQ ID No: 3) где она возможно включает два рядом расположенных гистидина для облегчения получения; при использовании в настоящем изобретении M72 также может включать два рядом расположенных гистидина, хотя подходящим образом M72 может не содержать двух рядом расположенных гистидинов (то есть остатки 4-725 в SEQ ID No: 4 в WO 2006/117240 представляют особый интерес). Полипептидная последовательность M72 показана в SEQ ID No: 25;

(в) комбинация компонентов Mtb8.4, Mtb9.8, Mtb9.9 и Mtb41, например в форме слитого белка, такого как Mtb71f. Полипептидная последовательность Mtb71f описана в SEQ ID No: 16 в WO 99/051748 (кДНК в SEQ ID No: 15), где она включает возможную His-метку для облегчения очистки; при использовании в настоящем изобретении Mtb71f подходящим образом соответствует аминокислотным остаткам 9-710 в SEQ ID No: 16 из WO 99/051748. Полипептидная последовательность для Mtb71f показана в SEQ ID No: 26;

(г) комбинация Mtb72f или M72 (подходящим образом без дополнительных остатков гистидина для облегчения экспрессии) с Mtb9.8 и Mtb9.9, например в слитом белке. Полипептидная последовательность для слитой конструкции M72-Mtb9.9-Mtb9.8 показана в SEQ ID No: 27 (слитая конструкция M92); при использовании в настоящем изобретении слитая конструкция M72-Mtb9.9-Mtb9.8 может дополнительно включать два рядом расположенных гистидина после иницирующего остатка метионина для облегчения получения;

(д) комбинация Mtb72f или M72 (подходящим образом без дополнительных остатков гистидина для облегчения экспрессии) с Ag85B, например в слитом белке, таком как Mtb103f. Полипептидная последовательность Mtb103f описана в SEQ ID No: 18 в WO 03/070187 (кДНК в SEQ ID No: 10), где она включает возможную His-метку для облегчения очистки; при использовании в настоящем изобретении Mtb103f подходящим образом соответствует аминокислотным остаткам 8-1016 в SEQ ID No: 18 из WO 03/070187. Также особый интерес представляет M103, то есть Mtb103f, включающий мутацию Ser/Ala в компоненте Ra35; при использовании в настоящем изобретении M103 подходящим образом соответствует аминокислотным остаткам 8-1016 в SEQ ID No: 18 из WO 03/070187, где остаток Ser в положении 710 заменен на Ala. Полипептидная последовательность M103 показана в SEQ ID No: 28, при использовании в настоящем изобретении слитая конструкция M72-Mtb9.9-Mtb9.8 может дополнительно включать два рядом расположенных гистидина после иницирующего остатка метионина для облегчения получения;

(е) комбинация Mtb72f или M72 (подходящим образом без возможных остатков гистидина для облегчения экспрессии) с Mtb41, например в слитом белке, таком как Mtb114f. Полипептидная последовательность Mtb114f описана в SEQ ID No: 16 в WO 03/070187 (кДНК в SEQ ID No: 9), где она включает возможную His-метку для облегчения очистки; при использовании в настоящем изобретении Mtb114f подходящим образом соответствует аминокислотным остаткам 8-1154 в SEQ ID No: 16 из WO 03/070187. Также особый интерес представляет M114, то есть Mtb114f, включающий мутацию Ser/Ala в компоненте Ra35; при использовании в настоящем изобретении M114 подходящим образом соответствует аминокислотным остаткам 8-1154 в SEQ ID No: 16 из WO 03/070187, где остаток Ser в положении 710 заменен на Ala. Полипептидная последовательность M114 показана в SEQ ID No: 29, при использовании в настоя-

шем изобретении слитая конструкция M72-Mtb9.9-Mtb9.8 возможно может включать два рядом расположенных гистидина после иницирующего остатка метионина для облегчения получения;

(ж) комбинация компонентов Ag85B и ESAT-6, как например, в слитой конструкции, описанной в Doherty et al., *Journal of Infectious Diseases*, 2004, 190: 2146-2153; и/или

(з) комбинация компонентов Ag85B и TB10.4, как например, в слитой конструкции, описанной в Dietrich et al., *Journal of Immunology*, 2005, 174(10): 6332-6339 190:2146-2153.

Комбинации компонента Rv1753c и компонента Mtb40 представляют особый интерес. Очевидно, такие комбинации возможно могут содержать другие дополнительные антигенные компоненты (например, компонент M72).

Другая представляющая интерес комбинация содержит компонент Rv1753c и компонент M72.

Следующая представляющая интерес комбинация содержит компонент Rv1753c и компонент Rv2386c.

Другие представляющие интерес комбинации включают комбинации, содержащие компонент Rv1753c и компонент Rv2707c.

Дополнительная представляющая интерес комбинация содержит компонент Rv1753c и компонент альфа-кристаллин.

Специалисту будет понятно, что комбинации не обязательно должны основываться на специфических последовательностях, описанных выше в (1)-(16) и (а)-(з), и что для получения такого же практического эффекта можно использовать консервативно модифицированные варианты (например, с идентичностью по меньшей мере 70%, как например, с идентичностью по меньшей мере 80%, в частности с идентичностью по меньшей мере 90% и особенно с идентичностью по меньшей мере 95%) или иммунные фрагменты (например, по меньшей мере 20% полноразмерного антигена, как, например, по меньшей мере 50% антигена, в частности по меньшей мере 70% и особенно по меньшей мере 80%) описанных последовательностей.

Каждая из вышеупомянутых индивидуальных антигенных последовательностей также раскрыта в Cole et al. *Nature*, 1998, 393: 537-544 и Camus, *Microbiology*, 2002, 148: 2967-2973. Геном H37Rv *M. tuberculosis* находится в открытом доступе, например на веб-сайте Wellcome Trust Sanger Institute (www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/) и в других местах.

Многие из упомянутых выше антигенов также раскрыты в заявках на патент США №№ 08/523435, 08/523436, 08/658800, 08/659683, 08/818111, 08/818112, 08/942341, 08/942578, 08/858998, 08/859381, 09/056556, 09/072596, 09/072967, 09/073009, 09/073010, 09/223040, 09/287849 и в патентных заявках PCT PCT/US98/10407, PCT/US98/10514, PCT/US99/03265, PCT/US99/03268, PCT/US99/07717, WO 97/09428 и WO 97/09429, WO 98/16645, WO 98/16646, каждая из которых здесь включена посредством ссылки.

Композиции, полипептиды и нуклеиновые кислоты по изобретению также могут содержать дополнительные полипептиды из других источников. Например, композиции и слитые белки по изобретению могут включать полипептиды или нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, где данный полипептид усиливает экспрессию антигена, например, NS1 белка вируса гриппа (см., например, WO 99/40188 и WO 93/04175). Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть сконструированы на основе предпочтения кодонов у выбранного вида, например у человека (в случае экспрессии *in vivo*) или у конкретной бактерии (в случае продуцирования полипептидов).

Компонент Rv1753c также может быть введен с одним или более чем одним химиотерапевтическим агентом, эффективным против туберкулеза (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*). Примеры таких химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются этим, амикацин, аminosалициловую кислоту, капреомицин, циклосерин, этамбутол, этионамид, изониазид, канамицин, пипразинамид, рифамицины (то есть рифампин, рифапентин и рифабутин), стрептомицин, офлоксацин, ципрофлоксацин, кларитромицин, азитромицин и фторхинолоны. Такая химиотерапия определяется решением лечащего врача, использующего предпочтительные комбинации лекарственных средств. Химиотерапевтические агенты "первой линии", используемые для лечения туберкулеза (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*), не обладающего лекарственной устойчивостью, включают изониазид, рифампин, этамбутол, стрептомицин и пипразинамид. Химиотерапевтические агенты "второй линии", используемые для лечения туберкулеза (например, инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*), демонстрирующего лекарственную устойчивость к одному или более чем одному лекарственному средству "первой линии", включают офлоксацин, ципрофлоксацин, этионамид, аminosалициловую кислоту, циклосерин, амикацин, канамицин и капреомицин.

Традиционные химиотерапевтические агенты обычно вводят в течение относительно длительного периода времени (приблизительно 9 месяцев). Сочетание применения традиционных химиотерапевтических агентов с введением компонента Rv1753c по настоящему изобретению может способствовать уменьшению продолжительности химиотерапевтического лечения (например, до 8 месяцев, 7 месяцев, 6 месяцев, 5 месяцев, 4 месяцев, 3 месяцев или меньше) без уменьшения эффективности.

Особый интерес представляет применение компонента Rv1753c вместе с бациллой Кальметта-Герена (БЦЖ). Например, в форме модифицированной БЦЖ, которая рекомбинантно экспрессирует Rv1753c (или его вариант или фрагмент, как изложено здесь). Альтернативно, компонент Rv1753c может

быть использован для усиления ответа субъекта на вакцинацию БЦЖ либо путём совместного введения, либо путём повторной иммунизации после предыдущей вакцинации БЦЖ. Очевидно, что компонент Rv1753с, когда его используют для усиления ответа субъекта на вакцинацию БЦЖ, может быть представлен в форме полипептида или полинуклеотида (возможно вместе с дополнительными антигенными компонентами как описано выше).

Специалисту будет понятно, что комбинации компонентов не обязательно вводят совместно и что они могут быть применены: по отдельности или в комбинации; одновременно, последовательно или в пределах короткого периода времени; и введены одинаковыми или разными путями. Тем не менее, для удобства обычно желательно (там где режимы введения совместимы) вводить комбинацию компонентов в виде единой композиции.

Полипептиды, полинуклеотиды и композиции по настоящему изобретению в общем случае будут введены людям, но они эффективны и для других млекопитающих, включая домашних животных (например, собак, кошек, кроликов, крыс, мышей, морских свинок, хомячков, шиншиллы) и сельскохозяйственных млекопитающих (например, коров, свиней, овец, коз, лошадей).

Иммуногенные фрагменты

Т-клеточные эпитопы представляют собой короткие непрерывные отрезки из аминокислот, которые распознаются Т-клетками (например, CD4+ или CD8+ Т-клетками). Идентификация Т-клеточных эпитопов может быть достигнута с помощью экспериментов по эпитопному картированию, которые хорошо известны специалисту в данной области техники (см., например, Paul, *Fundamental Immunology*, 3-е изд., 243-247 (1993); BeiBbarth et al., *Bioinformatics*, 2005, 21(Suppl. 1): i29-i37).

Альтернативно, эпитопы можно предсказать, используя подходы, обсуждаемые в разделе примеры.

Исходя из решающего значения Т-клеточного ответа при туберкулезе очевидно, что фрагменты полноразмерного полипептида Rv1753с, содержащие по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, будут иммуногенными и могут вносить вклад в иммунологическую защиту. Такие фрагменты называются здесь иммуногенными фрагментами.

Иммуногенные фрагменты по настоящему изобретению обычно будут содержать по меньшей мере 9 следующих друг за другом аминокислот из полноразмерной полипептидной последовательности (например, по меньшей мере 10), как например, по меньшей мере 12 следующих друг за другом аминокислот (например, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20 следующих друг за другом аминокислот), в частности по меньшей мере 50 следующих друг за другом аминокислот, как например, по меньшей мере 100 следующих друг за другом аминокислот (например, по меньшей мере 200 следующих друг за другом аминокислот). Соответственно, иммуногенные фрагменты будут составлять по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% длины полноразмерной полипептидной последовательности.

Понятно, что в разнотипной аутобредной популяции, такой как люди, наличие различных типов HLA (антигенов тканевой совместимости человека) означает, что специфические эпитопы могут не распознаваться всеми членами популяции. Следовательно, чтобы максимизировать уровень распознавания и величину иммунного ответа на полипептид, как правило желательно, чтобы иммуногенный фрагмент содержал множество эпитопов из полноразмерной последовательности (соответствующим образом все эпитопы).

Конкретные фрагменты белка Rv1753с, которые могут быть использованы, включают фрагменты, содержащие по меньшей мере один CD4+ эпитоп, соответственно по меньшей мере два CD4+ эпитопа и в особенности все CD4+ эпитопы (как например, эпитопы, описанные в разделе Примеры и в SEQ ID No: 30-59, в частности эпитопы, ассоциированные с большинством HLA-аллелей, например, эпитопы, ассоциированные с 2, 3, 4, 5 или более аллелями).

Другие фрагменты белка Rv1753с, которые могут быть использованы, включают фрагменты, содержащие по меньшей мере один CD8 эпитоп, соответственно по меньшей мере два CD8 эпитопа и в особенности все CD8 эпитопы (как например, эпитопы, описанные в разделе примеры и в SEQ ID No: 60-247, в частности эпитопы, ассоциированные с множеством HLA-аллелей, например эпитопы, ассоциированные с 2, 3, 4, 5 или более аллелями).

Когда используют индивидуальный фрагмент полноразмерного полипептида, такой фрагмент считают иммуногенным, если он вызывает ответ, составляющий по меньшей мере 20%, подходящим образом по меньшей мере 50% и в особенности по меньшей мере 75% (как например, по меньшей мере 90%) активности эталонной последовательности в анализе *in vitro* рестимуляции РВМС или цельной крови специфическими антигенами (например, рестимуляции в течение периода времени от нескольких часов до двух недель, как например, до одних суток, от 1 суток до 1 недели или 1-2 недель), в котором измеряют активацию клеток посредством измерения лимфопрлиферации, продукции цитокинов в супернатанте культуры (измеряемых с помощью ELISA, CBA (Cytometric bead array) и так далее) или определения параметров Т- и В-клеточных ответов с помощью внутри- и внеклеточного окрашивания (например, с применением антител, специфичных к иммунным маркерам, таким как CD3, CD4, CD8, IL2 (интерлейкин-2), TNFα (фактор некроза опухоли-α), IFNγ (γ-интерферон), CD40L, CD69 и так далее) с последующим анализом на проточном цитометре. Соответствующим образом, фрагмент считается иммуногенным,

если он вызывает ответ, составляющий по меньшей мере 20%, подходящим образом по меньшей мере 50% и в особенности по меньшей мере 75% (как например, по меньшей мере 90%) активности эталонной последовательности в анализе Т-клеточной пролиферации и/или продукции IFN-гамма.

В некоторых случаях для получения эквивалентного биологического ответа на саму полноразмерную последовательность можно использовать множество фрагментов полноразмерного полипептида (которые могут перекрываться или не перекрываться и могут охватывать или не охватывать полноразмерную последовательность целиком). Например, по меньшей мере два иммуногенных фрагмента (например, три, четыре или пять), как описано выше, которые в комбинации обеспечивают по меньшей мере 50%, соответственно по меньшей мере 75% и в особенности по меньшей мере 90% активности эталонной последовательности в анализе *in vitro* рестимуляции PBMC или цельной крови (например, в анализе Т-клеточной пролиферации и/или продукции IFN-гамма).

Варианты

Термин "варианты" или "консервативно модифицированные варианты" применяется как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновой кислоты. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты, то термин "консервативно модифицированные варианты" относится к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или когда нуклеиновая кислота не кодирует какую-либо аминокислотную последовательность, по существу, к идентичным последовательностям.

Вследствие вырожденности генетического кода любой заданный белок кодируется большим числом функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в любом положении, где аланин задается кодоном, данный кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов, не вызывая изменений в кодируемом полипептиде. Такие варианты нуклеиновых кислот приводят к "молчащим" или "вырожденным" вариантам, которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариантов. Каждая приведенная здесь последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно представляет собой единственный кодон для метионина, и TGG, который обычно представляет собой единственный кодон для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

Полинуклеотид по изобретению может содержать несколько молчащих вариантов (например, могут быть изменены 1-50, как например, 1-25, в частности 1-5 кодонов и в особенности 1 кодон) по сравнению с эталонной последовательностью. Полинуклеотид по изобретению может содержать несколько не являющихся молчащими консервативных вариантов (например, могут быть изменены 1-50, как например, 1-25, в частности 1-5 кодонов и в особенности 1 кодон) по сравнению с эталонной последовательностью. Не молчащими вариантами являются такие, которые вызывают изменение в кодируемой аминокислотной последовательности (либо путём замены, либо делеции, либо вставки аминокислотных остатков). Специалистам в данной области будет понятно, что конкретная полинуклеотидная последовательность может содержать как молчащие, так и не молчащие консервативные варианты.

Что касается вариантов белковой последовательности, то специалисту будет понятно, что индивидуальные замены, делеции или вставки в полипептиде, приводящие к изменению, добавлению или делеции одной аминокислоты или небольшого процента аминокислот, представляют собой "консервативно модифицированный вариант", когда данное изменение(я) приводит к замене аминокислоты функционально аналогичной аминокислотой или к замене/делеции/вставке остатков, которые, по существу, не затрагивают биологической функции данного варианта.

Таблицы консервативных замен, обеспечивающих функционально аналогичные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты присутствуют в дополнение к полиморфным вариантам, межвидовым гомологам и аллелям по изобретению и не исключают их.

Полипептид по изобретению может содержать ряд консервативных замен (например, могут быть изменены 1-50, как например 1-25, в частности 1-10 аминокислотных остатков и в особенности 1 аминокислотный остаток) по сравнению с эталонной последовательностью. В общем случае, такие консервативные замены будут попадать в пределы одной из групп аминокислот, определенных ниже, хотя в некоторых случаях могут быть возможны и другие замены без существенного воздействия на иммуногенные свойства антигена. Каждая из следующих ниже восьми групп содержит аминокислоты, которые являются типично консервативными заменами друг для друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);

- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T) и
- 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins, 1984).

Соответственно, такие замены не присутствуют в участке эпитопа и поэтому не оказывают существенного воздействия на иммуногенные свойства антигена.

Варианты белков также могут включать такие варианты, где дополнительные аминокислоты вставлены по сравнению с эталонной последовательностью, например, такие вставки могут присутствовать в 1-10 местах локализации (как например, 1-5 местах локализации, подходящим образом в 1 или 2 местах локализации, в частности в 1 месте локализации) и могут, например, включать добавление 50 или меньшего количества аминокислот в каждом месте локализации (как например, 20 или меньше, в частности, 10 или меньше, в особенности 5 или меньше). Соответственно, такие вставки не присутствуют в участке эпитопа и поэтому не оказывают существенного воздействия на иммуногенные свойства антигена. Один из примеров вставок включает короткий участок остатков гистидина (например, 2-6 остатков) для облегчения экспрессии и/или очистки рассматриваемого антигена.

Варианты белков включают такие варианты, где аминокислоты делетированы по сравнению с эталонной последовательностью, например, такие делеции могут присутствовать в 1-10 местах локализации (как например, в 1-5 местах локализации, удобно, если в 1 или 2 местах локализации, в частности в 1 месте локализации) и могут, например, включать делецию из 50 или меньшего количества аминокислот в каждом месте локализации (как например, 20 или меньше, в частности, 10 или меньше, в особенности 5 или меньше). Соответственно, такие делеции не присутствуют в участке эпитопа и поэтому не оказывают существенного воздействия на иммуногенные свойства антигена.

Специалисту будет понятно, что конкретный варианты белка может содержать замены, делеции и вставки (или любую их комбинацию).

Способы определения эпитопных участков антигена описаны и проиллюстрированы в разделе примеры.

Варианты предпочтительно демонстрируют по меньшей мере примерно 70% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере примерно 80% идентичности и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 90% идентичности (как например, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99%) с соответствующей эталонной последовательностью.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более чем двум последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов (то есть идентичны на 70%, возможно идентичны на 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% в определенной области), при сравнении и выравнивании на максимальное соответствие в окне сравнения или внутри указанной области, что измеряется с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или посредством выравнивания вручную и визуального просмотра. О таких последовательностях далее говорится, что они "по существу идентичны". Это определение также относится к комплементу тестируемой последовательности.

Возможно, идентичность существует в области, длина которой составляет по меньшей мере от примерно 25 до примерно 50 аминокислот или нуклеотидов, или возможно в области длиной 75-100 аминокислот или нуклеотидов. Подходящим образом сравнение выполняют в окне, соответствующем полной длине эталонной последовательности.

Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность выступает в роли эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости указывают координаты подпоследовательностей и задают параметры программы алгоритма сравнения последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию или можно задать альтернативные параметры. Далее с использованием алгоритма сравнения последовательностей, на основании параметров программы, рассчитывают процент идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности.

Термин "окно сравнения", как он используется здесь, содержит ссылку на сегмент, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью с тем же числом следующих один за другим положений, после того, как эти две последовательности оптимально выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), с помощью алгоритма гомологичного выравнивания по Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), с помощью поиска (вариантов) согласно методу подобия по Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85: 2444 (1988), с помощью компьютеризированных воплощений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или с помощью выравнивания вручную и визуального просмотра (см., например, Current Protocols in Molecular Biology

(приложение к Ausubel et al., eds. 1995)).

Одним примером полезного алгоритма является PILEUP. PILEUP формирует множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей с использованием прогрессивного, попарного выравнивания с целью выявления взаимосвязи и процента идентичности последовательностей. Он также производит построение дерева или дендрограммы, показывающего(ей) соотношения между кластерами, используемые для выравнивания. PILEUP использует упрощение метода прогрессивного выравнивания по Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35: 351-360 (1987). Используемый метод аналогичен методу, описанному Higgins & Sharp, *CABIOS*, 5: 151-153 (1989). Данная программа может выравнивать вплоть до 300 последовательностей, каждая с максимальной длиной 5000 нуклеотидов или аминокислот. Процедура множественного выравнивания начинается с попарного выравнивания двух наиболее похожих последовательностей с образованием кластера из двух выровненных последовательностей. Затем этот кластер выравнивают со следующей наиболее родственной последовательностью или кластером выровненных последовательностей. Два кластера последовательностей выравнивают путем простого удлинения попарного выравнивания двух индивидуальных последовательностей. Окончательное выравнивание достигается в результате серии прогрессивных попарных выравниваний. Программа действует путем определения специфических последовательностей и их аминокислотных или нуклеотидных координат для сравнения участков последовательностей и путем указания программных параметров. Используя PILEUP, сравнивают эталонную последовательность с другими тестируемыми последовательностями с целью определения соотношения процента идентичности последовательностей, используя следующие параметры: вес бреши по умолчанию (3.00), вес длины бреши по умолчанию (0.10) и взвешенные концевые бреши. PILEUP можно взять из пакета программ для анализа последовательности GCG, например, версии 7.0 (Devereaux et al., *Nuc. Acids Res.*, 12: 387-395 (1984)).

Другим примером алгоритма, который является подходящим для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997) и Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990) соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа с использованием BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) (вебсайт www.ncbi.nlm.nih.gov/). Этот алгоритм включает прежде всего идентификацию пар последовательностей с высоким баллом (HSP) посредством идентификации коротких "слов" длиной W в анализируемой последовательности, которые или соответствуют, или удовлетворяют некоторому положительно оцениваемому пороговому баллу T при выравнивании со "словом" той же длины в последовательности из базы данных. T обозначает пороговый балл для соседнего "слова" (Altschul et al., выше). Эти изначальные соседние удачные "слова" (hits) действуют в качестве затравок для инициирования поиска вариантов с целью нахождения более длинных HSP, содержащих их. Удачные "слова" удлиняются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличен кумулятивный балл выравнивания. Для нуклеотидных последовательностей кумулятивные баллы рассчитывают с использованием параметров M (балл-вознаграждение за пару соответствующих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за ошибочно спаренные остатки; всегда < 0). Для расчета кумулятивного балла в отношении аминокислотных последовательностей используют матрицу баллов. Удлинение удачных "слов" в каждом направлении останавливается, когда: кумулятивный балл выравнивания падает на величину X от его максимально достигнутой величины; кумулятивный балл доходит до нуля или ниже вследствие аккумуляции одного или более чем одного выравнивания остатков с отрицательными баллами; или при достижении конца любой из двух последовательностей. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину "слова" (W), равную 11; математическое ожидание (E), равное 10, M = 5, N = -4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину "слова", равную 3; математическое ожидание (E), равное 10; и выравнивания (B) по матрице баллов BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10915 (1992)), равные 50; математическое ожидание (E), равное 10, M = 5, N = -4 и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST также осуществляет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993)). Одной из мер сходства, предоставляемых алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая дает указание на вероятность того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будет случайным. Например, считается, что нуклеиновая кислота аналогична эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой меньше чем примерно 0,2, более предпочтительно меньше чем примерно 0,01 и наиболее предпочтительно меньше чем примерно 0,001.

Настоящее изобретение также распространяется на полинуклеотиды, содержащие первую нуклеотидную последовательность, которая селективно гибридизуется в умеренно жестких условиях (как например, в жестких условиях) с комплементом второй нуклеотидной последовательности, кодирующей

полипептид, содержащий:

(1) последовательность белка Rv1753c;

(2) вариант последовательности белка Rv1753c; или

(3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c. Фраза "жесткие условия гибридизации" относится к условиям, при которых зонд будет гибридизоваться со своей подпоследовательностью-мишенью, обычно в сложной смеси, содержащей нуклеиновую кислоту, а ни с какими-либо другими последовательностями. Жесткие условия зависят от последовательности и в разных обстоятельствах будут различаться. Более длинные последовательности специфически гибридизуются при более высоких температурах. Исчерпывающее руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Как правило, жесткие условия выбирают так, чтобы температура была примерно на 5-10°C ниже, чем термическая точка плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенных значениях ионной силы и pH. T_m представляет собой температуру (при определенных значениях ионной силы, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью при равновесии (поскольку последовательности-мишени присутствуют в избытке, то при T_m 50% зондов в равновесии находятся в связанном состоянии). Жесткими условиями будут такие, при которых концентрация соли ниже примерно 1,0 М для ионов натрия, в типичном случае концентрация ионов натрия (или других солей) составляет примерно 0,01-1,0 М при pH 7,0-8,3, а температура равна по меньшей мере примерно 30°C для коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере примерно 60°C для длинных зондов (например, больше 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть достигнуты путём добавления дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для селективной или специфической гибридизации положительный сигнал по меньшей мере в два раза превышает фон, возможно в 10 раз превышает фоновую гибридизацию.

Типичные жесткие условия гибридизации могут быть следующими: 50% формамида, 5×SSC (раствор хлорида и цитрата натрия) и 1% SDS (додецилсульфат натрия), инкубация при 42°C, или 5× SSC, 1% SDS, инкубация при 65°C, с промывкой в 0,2×SSC и 0,1% SDS при 65°C.

Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизуются друг с другом в жестких условиях, остаются по-прежнему функционально эквивалентными, если полипептиды, которые они кодируют, являются, по существу, идентичными. Это имеет место, например, когда копия нуклеиновой кислоты создана с использованием максимальной вырожденности кодонов, допускаемой генетическим кодом. В таких случаях нуклеиновые кислоты обычно гибридизуются в умеренно жестких условиях гибридизации.

Типичные "умеренно жесткие условия гибридизации" включают гибридизацию в буфере из 40% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS, при 37°C и промывку в 1× SSC при 45°C. Положительная гибридизация превышает фон по меньшей мере в два раза. Средние специалисты легко поймут, что для обеспечения условий аналогичной жесткости могут быть использованы альтернативные условия гибридизации и промывки.

Фраза "селективно (или специфически) гибридизуется с" относится к связыванию, образованию дуплекса или гибридизации молекулы только с конкретной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях гибридизации, когда данная последовательность присутствует в сложной смеси (например, суммарной клеточной или библиотечной ДНК или РНК).

Во всяком случае, варианты полипептидной последовательности будут обладать, по существу, той же активностью, что и эталонная последовательность (в случае полинуклеотидов, варианты полинуклеотидных последовательностей будут кодировать полипептид, который обладает, по существу, той же активностью, что и эталонная последовательность). Под "по существу той же активностью" понимают по меньшей мере 50%, подходящим образом по меньшей мере 75% и в особенности по меньшей мере 90% активности эталонной последовательности в анализе *in vitro* рестимуляции PBMC или цельной крови специфическими антигенами (например, рестимуляции в течение периода времени от нескольких часов вплоть до двух недель, как например, вплоть до одних суток, от 1 суток до 1 недели или 1-2 недель), в котором измеряют активацию клеток посредством измерения лимфопротекции, продукции цитокинов в супернатанте культуры (измеряемых с помощью ELISA, CBA и так далее) или определения параметров Т- и В-клеточных ответов с помощью внутри- и внеклеточного окрашивания (например, с использованием антител, специфичных к иммунным маркерам, таким как CD3, CD4, CD8, IL2, TNF α , IFN γ , CD40L, CD69 и так далее) с последующим анализом на проточном цитометре. Соответственно, под "по существу, той же активностью" понимают по меньшей мере 50%, соответственно по меньшей мере 75% и в особенности по меньшей мере 90% активности эталонной последовательности в анализе Т-клеточной пролиферации и/или продукции IFN-гамма.

Полинуклеотидные композиции

Как он использован здесь, термин "полинуклеотид" относится к молекуле, выделенной в свободном от суммарной геномной ДНК состоянии из конкретного образца. Поэтому полинуклеотид, кодирующий полипептид, относится к сегменту полинуклеотида, который содержит одну или более чем одну коди-

рующую последовательность, уже, по существу, изолированному или очищенному от общей геномной ДНК видов, из которых получен данный полинуклеотид.

Как будет понятно специалистам в данной области, полинуклеотиды по данному изобретению могут включать геномные последовательности, экстрагеномные и кодируемые плазмидами последовательности и более мелкие генно-инженерные сегменты генов, которые экспрессируют или которые могут быть адаптированы для экспрессии, белки, полипептиды, пептиды и тому подобное. Такие сегменты могут быть выделены из природных источников или синтетически модифицированы человеком.

Термин "выделенный", как он использован здесь, означает, что полинуклеотид, по существу, свободен от других кодирующих последовательностей и что данный полинуклеотид не содержит больших порций неродственной кодирующей ДНК, таких как большие хромосомные фрагменты или другие функциональные гены, или участки, кодирующие полипептиды. Выделенная нуклеиновая кислота отделена от других открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белки, отличающиеся от тех, которые кодирует данный ген. Несомненно, это относится к сегменту ДНК как он выделен изначально и не исключает генов или кодирующих участков, позже добавленных к данному сегменту человеком.

Как будет понятно специалисту в данной области, полинуклеотиды могут быть одноцепочечными (кодирующими или антисмысловыми) или двухцепочечными и могут представлять собой молекулы ДНК (геномной, кДНК или синтетической) или РНК. Молекулы РНК включают молекулы гРНК (гетерогенная ядерная РНК), которые содержат интроны и соответствуют молекуле ДНК по типу "один-к-одному" ("one-to-one"), и молекулы мРНК, которые не содержат интронов. Дополнительные кодирующие или не кодирующие последовательности могут, но не обязательно, находиться в пределах полинуклеотида по настоящему изобретению, и полинуклеотид может быть, но не обязательно, соединен с другими молекулами и/или веществами-носителями.

Полинуклеотиды могут содержать нативную последовательность (то есть эндогенную последовательность, которая кодирует антиген *Mycobacterium* или его часть) или могут содержать вариант или биологический либо функциональный эквивалент такой последовательности. Полинуклеотидные варианты могут содержать одну или более чем одну замену, добавление, делецию и/или вставку, что также описано ниже, предпочтительно таких, чтобы иммуногенность кодируемого полипептида относительно эталонного белка не уменьшалась. Обычно влияние кодируемого полипептида на иммуногенность можно оценить, как изложено здесь.

В дополнительных воплощениях настоящего изобретения предложены выделенные полинуклеотиды и полипептиды, содержащие различные отрезки следующих один за другим участков последовательности, идентичной одной или более чем одной последовательности, раскрытой здесь, или комплементарной одной или более чем одной последовательности, раскрытой здесь. Например, согласно этому изобретению предложены полинуклеотиды, которые содержат по меньшей мере примерно 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 или 1000 или более следующих один за другим нуклеотидов эталонной последовательности, раскрытой здесь, а также все находящиеся между ними промежуточные отрезки. Легко понять, что "промежуточные отрезки" в этом контексте означают отрезки любой длины, находящейся между приведенными величинами, как например 30, 31, 32 и так далее; 50, 51, 52, 53 и так далее; 100, 101, 102, 103 и так далее; 150, 151, 152, 153 и так далее; в том числе все целочисленные значения в диапазонах 200-500; 500-1000 и тому подобное.

Более того, специалистам в данной области будет очевидно, что в результате вырожденности генетического кода существует много нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептид как раскрыто здесь. Некоторые из этих полинуклеотидов имеют относительно низкую идентичность с нуклеотидной последовательностью любого нативного гена. Однако в настоящем изобретении особенно рассматриваются полинуклеотиды, которые варьируют вследствие различий при использовании кодонов, например, полинуклеотиды, которые оптимизированы для отбора кодонов человека и/или приматов. Более того, аллели генов, содержащих полинуклеотидные последовательности, предложенные здесь, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Аллели представляют собой эндогенные гены, которые изменяются в результате одной или более мутаций, таких как делеции, добавления и/или замены нуклеотидов. Полученные мРНК и белок могут, но не обязательно, иметь измененную структуру или функцию. Аллели могут быть идентифицированы с использованием стандартных методов (таких как гибридизация, амплификация и/или сравнение последовательностей из базы данных).

Идентификация и характеристика полинуклеотидов

Полинуклеотиды могут быть идентифицированы, получены с использованием любого из множества общепризнанных методов и/или на них можно воздействовать с использованием множества общепризнанных методов. Например, полинуклеотид может быть идентифицирован, как описано более подробно ниже, путём скрининга на микрочипах кДНК. Такие скрининги могут быть проведены, например, с использованием микрочипа Synteni (Palo Alto, CA) в соответствии с инструкциями производителя (и, по существу, как описано в Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 10614-10619 (1996) и Heller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 2150-2155 (1997)). Альтернативно, полинуклеотиды могут быть амплифицированы на основании кДНК, полученной из клеток, экспрессирующих белки, раскрытые здесь, таких

как клетки *M. tuberculosis*. Такие полинуклеотиды могут быть амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого подхода на основании предложенных здесь последовательностей могут быть сконструированы сиквенс-специфические праймеры, и их можно приобрести или синтезировать.

Амплифицированный участок полинуклеотида может быть использован для выделения полноразмерного гена из подходящей библиотеки (например, библиотеки кДНК *M. tuberculosis*) с использованием хорошо известных методов. В таких методах библиотеку (кДНК или геномную) подвергают скринингу, используя один или более чем один полинуклеотидный зонд или праймер, подходящих для амплификации. Предпочтительно, чтобы библиотека была отобрана по размеру для включения молекул большего размера. Библиотеки, полученные с использованием случайных праймеров также могут быть предпочтительны для идентификации 5'- и расположенных выше участков генов. Геномные библиотеки являются предпочтительными для получения интронов и протяженных 5'-последовательностей.

Что касается методов гибридизации, то частичная последовательность может быть мечена (например, посредством "ник"-трансляции или концевого мечения с помощью ^{32}P) с использованием хорошо известных методов. Затем бактериальную или бактериофаговую библиотеку обычно подвергают скринингу посредством гибридизации на фильтрах, содержащих денатурированные бактериальные колонии (или газонах, содержащих фаговые бляшки), с меченым зондом (см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2000)). Гибридуемые колонии или бляшки отбирают и размножают, и ДНК выделяют для дальнейшего анализа. Клоны кДНК могут быть проанализированы с целью определения количества дополнительной последовательности посредством, например, ПЦР с использованием праймера из частичной последовательности и праймера из вектора. Для идентификации одного или более чем одного перекрывающегося клона могут быть созданы рестрикционные карты и частичные последовательности. Затем можно определить полную последовательность с использованием стандартных методов, которые могут вовлекать создание ряда делеционных клонов. Полученные перекрывающиеся последовательности затем могут быть собраны в единую непрерывную последовательность. Полноразмерную молекулу кДНК можно создать путём лигирования подходящих фрагментов, используя хорошо известные методы.

Альтернативно, существуют многочисленные методы амплификации для получения полноразмерной кодирующей последовательности из частичной последовательности кДНК. В таких методах амплификацию обычно осуществляют с помощью ПЦР. Для осуществления стадии амплификации можно использовать любой из множества имеющихся в продаже наборов. Праймеры можно конструировать с использованием, например, программного обеспечения, хорошо известного в данной области. Праймеры предпочтительно имеют длину 22-30 нуклеотидов, имеют содержание GC по меньшей мере 50% и отжигаются с последовательностью-мишенью при температуре примерно 68-72°C. Амплифицированный участок может быть секвенирован, как описано выше, и перекрывающиеся последовательности собраны в непрерывную последовательность.

Одной такой методикой амплификации является инвертированная ПЦР (см. Triglia et al., *Nucl. Acids Res.*, 16: 8186 (1988)), в которой используют рестриктазы для создания фрагмента в известном участке гена. Затем этот фрагмент подвергают циркуляризации посредством внутримолекулярного лигирования и используют в качестве матрицы для ПЦР с применением дивергентных праймеров, полученных исходя из последовательности известного участка. В рамках альтернативного подхода последовательности, примыкающие к неполной последовательности, могут быть восстановлены путём амплификации с использованием праймера к линкерной последовательности и праймера, специфичного к известному участку. Обычно амплифицированные последовательности подвергают второму раунду амплификации с использованием того же самого линкерного праймера и второго праймера, специфичного к известному участку. Вариант этой процедуры, в котором используют два праймера, иницирующие удлинение в противоположных направлениях от известной последовательности, описан в WO 96/38591. Другая такая методика известна как "быстрая амплификация концов кДНК" или RACE. Эта методика включает применение внутреннего праймера и внешнего праймера, который гибридизуется с полиА участком или последовательностью вектора, для идентификации последовательностей, расположенных в 5'- и 3'-направлениях от известной последовательности. Дополнительные методики включают ПЦР с захватом (Lagerstrom et al., *PCR Methods Applic*, 1: 111-19 (1991)) и ПЦР-"прогулку" (Parker et al., *Nucl. Acids. Res.* 19: 3055-60 (1991)). Другие способы, использующие амплификацию, также могут быть использованы для получения полноразмерной последовательности кДНК.

В некоторых случаях существует возможность получения полноразмерной последовательности кДНК путём анализа последовательностей, приведенных в базе данных экспрессируемых маркерных последовательностей (EST, Expressed Sequence Tag), таких как те, которые доступны из GenBank. Поиски перекрывающихся EST обычно могут быть осуществлены с использованием хорошо известных программ (например, поиски NCBI BLAST), и такие EST могут быть использованы для создания непрерывной полноразмерной последовательности. Полноразмерные последовательности ДНК также можно получить путём анализа геномных фрагментов.

Экспрессия полинуклеотидов в клетках хозяина

Полинуклеотидные последовательности или их фрагменты, кодирующие полипептиды по изобретению или слитые белки либо их функциональные эквиваленты, могут быть использованы в молекулах рекомбинантной ДНК для того, чтобы направить экспрессию полипептида в соответствующих клетках хозяина. Вследствие природной вырожденности генетического кода могут быть получены другие последовательности ДНК, которые кодируют, по существу, такую же или функционально эквивалентную аминокислотную последовательность, и эти последовательности могут быть использованы для клонирования и экспрессии указанного полипептида.

Как будет понятно специалистам в данной области, в некоторых случаях может иметь преимущество получение полипептид-кодирующих нуклеотидных последовательностей, имеющих неприродные кодоны. Например, для увеличения скорости экспрессии белка или для продуцирования рекомбинантного РНК транскрипта, имеющего такие желаемые свойства, как период полувыведения, который продолжительнее такового у транскрипта, созданного из последовательности природного происхождения, могут быть выбраны кодоны, предпочтительные для конкретного прокариотического или эукариотического хозяина.

Более того, можно конструировать полинуклеотидные последовательности, применяя способы, общеизвестные в данной области для того, чтобы изменять полипептид-кодирующие последовательности по ряду причин, включая, но этим не ограничиваясь, изменения, которые модифицируют клонирование, процессинг и/или экспрессию генного продукта. Например, для конструирования нуклеотидных последовательностей можно использовать перетасовку ДНК путем случайной фрагментации и вторичной сборки генных фрагментов и синтетических олигонуклеотидов с помощью ПЦР. В дополнение к этому, сайт-направленный мутагенез можно использовать для вставки новых рестрикционных сайтов, изменения характера гликозилирования, изменения предпочтения кодонов, получения сплайс-вариантов или введения мутаций и так далее.

Природные, модифицированные или рекомбинантные последовательности нуклеиновой кислоты могут быть лигированы с гетерологичной последовательностью для того, чтобы кодировать слитый белок. Например, скрининг пептидных библиотек в отношении ингибиторов полипептидной активности может быть полезным для кодирования химерного белка, который может распознаваться имеющимся в продаже антителом. Также слитый белок может быть сконструирован так, чтобы он содержал сайт расщепления, локализованный между полипептид-кодирующей последовательностью и гетерологичной белковой последовательностью, так чтобы полипептид можно было отщепить и очистить от гетерологичной группировки.

Последовательности, кодирующие желаемый полипептид, можно синтезировать, целиком или частично, используя химические способы, хорошо известные в данной области техники (см. Caruthers, M. H. et al., *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.*, pp. 215-223 (1980), Horn et al., *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.*, pp. 225-232 (1980)). Альтернативно, сам белок можно получить, используя химические способы синтеза аминокислотной последовательности полипептида или его участка. Например, пептидный синтез может быть осуществлен с использованием различных твердофазных методов (Roberge et al., *Science*, 269: 202-204 (1995)), а автоматизированного синтеза можно достичь, например, с использованием пептидного синтезатора ABI 431A (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

Вновь синтезированный пептид можно в значительной степени очистить с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (например, Creighton, *Proteins, Structures and Molecular Principles* (1983)) или других сравнимых методов, доступных в данной области. Состав синтетических пептидов может быть подтвержден аминокислотным анализом или секвенированием (например, процедурой деградации по Эдману). Кроме того, аминокислотную последовательность полипептида или любого его участка можно изменить в процессе прямого синтеза и/или скомбинировать, используя химические способы, с последовательностями из других белков или любого их участка с целью продуцирования вариантного полипептида.

Для того чтобы экспрессировать желаемый полипептид, нуклеотидные последовательности, кодирующие этот полипептид или его функциональные эквиваленты, можно встроить в соответствующий экспрессирующий вектор, то есть вектор, содержащий необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей последовательности. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области, могут быть использованы для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих последовательности, кодирующие представляющий интерес полипептид, и соответствующие транскрипционные и трансляционные контрольные элементы. Эти способы включают методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и методы генетической рекомбинации *in vivo*. Такие методы описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2000) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (обновляемые ежегодно).

Ряд систем экспрессирующий вектор/хозяин можно использовать для содержания и экспрессии полинуклеотидных последовательностей. Они включают, но не ограничиваются этим, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантными бактериофаговыми, плазмидными или космидными ДНК-экспрессирующими векторами; дрожжи, трансформированные дрожжевыми векторами экспрессии; клеточные системы насекомых, инфицированные вирусными векторами экспрессии (напри-

мер, бакуловирусными); растительные клеточные системы, трансформированные вирусными векторами экспрессии (например, на основе вируса мозаики цветной капусты (CaMV); вируса табачной мозаики (TMV)) или бактериальными векторами экспрессии (например, плазмидами T1 или pBR322); или животные клеточные системы.

"Контрольные элементы" или "регуляторные последовательности", присутствующие в экспрессирующем векторе, представляют собой нетранслируемые участки вектора - энхансеры, промоторы, 5'- и 3'-нетранслируемые участки, которые взаимодействуют с клеточными белками хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут варьировать по своей эффективности и специфичности. В зависимости от применяемых векторной системы и хозяина можно использовать любое количество подходящих транскрипционных и трансляционных элементов, включая конститутивные и индуцибельные промоторы. Например, при клонировании в бактериальных системах можно использовать индуцибельные промоторы, такие как гибридный промотор lacZ фагмиды PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) или плазмиды PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) и тому подобное. В клеточных системах млекопитающих обычно предпочтительнее промоторы из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Если необходимо создать клеточную линию, которая содержит множественные копии последовательности, кодирующей полипептид, преимущество в использовании имеют векторы на основе SV40 (обезьяньего вируса 40) или EBV (вируса Эпштейна-Барр) с соответствующим селектируемым маркером.

В бактериальных системах количество экспрессирующих векторов может быть выбрано в зависимости от применения, предполагаемого для экспрессируемого полипептида. Например, когда требуются большие количества, например, для индукции антител, то можно использовать векторы, приводящие к высокому уровню экспрессии слитых белков, которые можно легко очистить. Такие векторы включают, но не ограничиваются этим, многофункциональные клонирующие и экспрессирующие в *E. coli* векторы, такие как BLUESCRIPT (Stratagene), в которых последовательность, кодирующая представляющий интерес полипептид, может быть лигирована в этот вектор в рамке считывания с последовательностями для аминоконцевого Met и последующих 7 остатков β -галактозидазы, таким образом, что продуцируется гибридный белок; векторы pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.*, 264: 5503-5509 (1989)) и тому подобное. Векторы pGEX (Promega, Madison, Wis.) также могут быть использованы для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST). Обычно такие слитые белки растворимы и могут быть легко очищены из лизированных клеток путём адсорбции на глутатион-агарозных гранулах с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Белки, полученные в таких системах, можно конструировать таким образом, чтобы включить сайты гепарина, сайты расщепления тромбином или протеазой фактор XA, с тем, чтобы при желании представляющий интерес клонированный полипептид можно было освободить от GST-группировки.

В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* могут быть использованы различные векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как промоторы альфа-фактора, алкогольоксидазы и PGH. Другие векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, включают промоторы генов GAP (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), PGK (фосфоглицераткиназа), GAL (галактозидаза) и ADH (алкогольдегидрогеназа). В качестве обзоров см. Ausubel et al. (выше) и Grant et al., *Methods Enzymol.*, 153: 516-544 (1987) и Romas et al. *Yeast*, 8: 423-88 (1992).

В случаях использования растительных экспрессирующих векторов экспрессия последовательностей, кодирующих полипептиды, может управляться любым из множества промоторов. Например, вирусные промоторы, такие как промоторы 35S и 19S CaMV, могут быть использованы по отдельности или в комбинации с омега-лидерной последовательностью из TMV (Takamatsu, *EMBO J.*, 6: 307-311 (1987)). Альтернативно, могут быть использованы растительные промоторы, такие как промоторы генов малой субъединицы RUBISCO (рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа) или белков теплового шока (Coruzzi et al., *EMBO J.*, 3: 1671-1680 (1984); Broglie et al., *Science*, 224: 838-843 (1984); и Winter et al., *Results Probl. Cell Differ.*, 17: 85-105 (1991)). Эти конструкции могут быть введены в растительные клетки путем прямой трансформации ДНК или путём патоген-опосредованной трансфекции. Такие методы описаны в ряде обычно доступных обзоров (см., например, Hobbs в *McGraw Hill Yearbook of Science and Technology*, pp. 191-196 (1992)).

Систему (клеток) насекомых также можно использовать для экспрессии представляющего интерес полипептида. Например, в одной такой системе в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов в клетках *Spodoptera frugiperda* или в *Trichoplusia larvae* используют вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV). Последовательности, кодирующие полипептид, можно клонировать в несущественный участок вируса, например полиэдриновый ген, и поместить под контроль полиэдринового промотора. Успешная вставка полипептид-кодирующей последовательности будет делать полиэдриновый ген неактивным и давать рекомбинантный вирус, не имеющий белка оболочки. Затем рекомбинантные вирусы могут быть использованы для инфицирования, например, клеток *S. frugiperda* или *Trichoplusia larvae*, в которых может экспрессироваться представляющий интерес полипептид (Engelhard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 3224-3227 (1994)).

В клетках-хозяевах млекопитающих обычно доступен ряд экспрессирующих систем на основе ви-

русов. Например, в случаях, где аденовирус используется в качестве экспрессирующего вектора, последовательности, кодирующие представляющий интерес полипептид, могут быть лигированы в аденовирусный транскрипционный/трансляционный комплекс, состоящий из позднего промотора и трехкомпонентной лидерной последовательности. Вставку в несущественный участок E1 или E3 вирусного генома можно использовать для получения жизнеспособного вируса, способного экспрессировать полипептид в инфицированных клетках-хозяевах (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 3655-3659 (1984)). Дополнительно для увеличения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать энхансеры транскрипции, такие как энхансер вируса саркомы Payca (RSV). Обзоры способов и протоколов для работы с аденовирусными векторами приведены в Wold, *Adenovirus Methods and Protocols*, 1998. Дополнительные ссылки, касающиеся применения аденовирусных векторов, можно найти в *Adenovirus: A Medical Dictionary, Bibliography, and Annotated Research Guide to Internet References*, 2004.

Для достижения более эффективной трансляции последовательностей, кодирующих представляющий интерес полипептид, также могут быть использованы специфические сигналы инициации. Такие сигналы включают иницирующий кодон ATG и примыкающие последовательности. В тех случаях, когда последовательности, кодирующие полипептид, его иницирующий кодон и расположенные выше последовательности встроены в соответствующий экспрессирующий вектор, никаких дополнительных транскрипционных или трансляционных контрольных сигналов может не потребоваться. Однако в случаях, когда встроены только кодирующая последовательность или ее участок, необходимо обеспечить экзогенные трансляционные контрольные сигналы, включая иницирующий кодон ATG. Более того, иницирующий кодон должен находиться в правильной рамке считывания, чтобы гарантировать трансляцию всей вставки. Экзогенные трансляционные элементы и иницирующие кодоны могут быть различного происхождения, как природными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии можно повысить путем включения энхансеров, которые являются соответствующими конкретной используемой клеточной системе, которая применяется, как например энхансеров, которые описаны в литературе (Scharf. et al., *Results Probl. Cell Differ.*, 20: 125-162 (1994)).

Кроме того, можно выбрать штамм клеток хозяина по его способности модулировать экспрессию встроженных последовательностей или осуществлять процессинг экспрессируемого белка желательным образом. Такие модификации полипептида включают, но не ограничиваются этим, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование. Посттрансляционный процессинг, при котором происходит расщепление "препро"-формы белка, также можно использовать для облегчения правильной вставки, фолдинга и/или функции. Различные клетки-хозяева, такие как клетки CHO (яичников китайского хомячка), HeLa, MDCK, HEK293 (почек эмбриона человека) и WI38, которые имеют специфический клеточный аппарат и специфические механизмы для таких посттрансляционных активностей, могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга чужеродного белка.

Для продолжительного продуцирования рекомбинантных белков с высоким выходом обычно предпочтительна стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют представляющий интерес полинуклеотид, могут быть трансформированы с использованием экспрессирующих векторов, которые могут содержать вирусные точки инициации репликации и/или эндогенные элементы экспрессии и селективируемый маркерный ген в том же или в отдельном векторе. После введения вектора клетки можно оставить расти в течение 1-2 суток в обогащенной среде, прежде чем перевести их в селективную среду. Задача селективируемого маркера заключается в том, чтобы придать устойчивость к селекции, и его присутствие делает возможным рост и выделение клеток, успешно экспрессирующих введенные последовательности. Устойчивые клоны стабильно трансформированных клеток могут быть размножены с использованием методов культивирования тканей, подходящих для данного типа клеток.

Для получения трансформированных клеточных линий можно использовать любое количество систем селекции. Они включают, но не ограничиваются этим, гены тимидинкиназы (tk) (Wigler et al., *Cell*, 11: 223-32 (1977)) и аденинфосфорибозилтрансферазы (aprt) вируса простого герпеса (Lowy et al., *Cell*, 22: 817-23 (1990)), которые могут быть использованы соответственно в tk.sup.- или aprt.sup.- клетках. Кроме того, в качестве основы для селекции можно использовать устойчивость к антиметаболитам, антибиотикам или гербицидам; например, dhfr (дигидрофолатредуктаза), который придает устойчивость к метотрексату (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 3567-70 (1980)); npt (неомицинфосфотрансфераза), который придает устойчивость к аминогликозидам, неомицину и G-418 (Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1-14 (1981)); и als (ацетоллактатсинтаза) или pat (фосфинотрицин-ацетилтрансфераза), которые придают устойчивость соответственно к хлорсульфону и фосфинотрицину (Murry, выше). Были описаны дополнительные селективируемые гены, например, trpB (триптофансинтаза), который позволяет клеткам утилизировать индол вместо триптофана, или hisD (гистидинолдегидрогеназа), который позволяет клеткам утилизировать гистидинол вместо гистидина (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 8047-51 (1988)). Недавно применение видимых маркеров сделало популярным использование таких маркеров, как антоцианины, β -глюкуронидаза и ее субстрат GUS, люцифераза и ее субстрат люциферин, причем их широко используют не только для идентификации трансфор-

мантов, но также для количественного определения величины временной или стабильной экспрессии белка, присущей конкретной векторной системе (Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.*, 55: 121-131 (1995)).

Хотя наличие/отсутствие экспрессии маркерного гена предполагает, что представляющий интерес ген также присутствует, его присутствие и экспрессия могут нуждаться в подтверждении. Например, если последовательность, кодирующую полипептид, встраивают в последовательность маркерного гена, рекомбинантные клетки, содержащие последовательности, могут быть идентифицированы по отсутствию функции маркерного гена. Альтернативно, маркерный ген можно разместить в тандеме с полипептид-кодирующей последовательностью под контролем одного промотора. Экспрессия маркерного гена в ответ на индукцию или селекцию обычно также указывает на экспрессию тандемного гена.

Альтернативно, клетки хозяина, содержащие и экспрессирующие желаемую полинуклеотидную последовательность, можно идентифицировать различными методами, известными специалистам в данной области. Эти методы включают, но не ограничиваются этим, ДНК-ДНК или ДНК-РНК гибридизации и методы биоанализа или иммуноанализа белков, которые включают мембранные технологии, технологии в растворах или технологии на основе чипов для детекции и/или количественного определения нуклеиновой кислоты или белка.

В данной области техники известно множество протоколов детекции и измерения экспрессии полинуклеотид-кодируемых продуктов с использованием либо поликлональных, либо моноклональных антител, специфичных к данному продукту. Примеры включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и метод флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). Для некоторых применений предпочтительным может быть двухстадийный, основанный на моноклональных антителах иммунологический анализ, в котором используются моноклональные антитела, реагирующие с двумя неперекрывающимися эпитопами на указанном полипептиде, но также можно использовать анализ конкурентного связывания. Эти и другие анализы описаны, наряду с другими источниками, в Hampton et al., *Serological Methods, a Laboratory Manual* (1990) и Maddox et al., *J. Exp. Med.*, 158: 1211-1216 (1983).

Большое разнообразие меток и методов конъюгирования известны специалистам в данной области, и их можно использовать в различных анализах нуклеиновых кислот и аминокислот. Способы получения меченых гибридизационных или ПЦР-зондов для детекции последовательностей, относящихся к полинуклеотидам, включают олигомечение, "ник"-трансляцию, концевое мечение или ПЦР-амплификацию с использованием меченого нуклеотида. Альтернативно, последовательности или любые их участки можно клонировать в вектор для продуцирования мРНК-зонда. Такие векторы известны в данной области, имеются в продаже и их можно использовать для синтеза РНК-зондов *in vitro* путем добавления соответствующей РНК-полимеразы, например, T7, T3 или SP6, и меченых нуклеотидов. Эти процедуры можно проводить, используя различные имеющиеся в продаже наборы. Подходящие репортерные молекулы или метки, которые могут быть использованы, включают радионуклиды, ферменты, флуоресцентные, хемилюминесцентные или хромогенные агенты, а также субстраты, кофакторы, ингибиторы, магнитные частицы и тому подобное.

Клетки хозяина, трансформированные представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью, можно культивировать в условиях, подходящих для экспрессии и выделения белка из клеточной культуры. Белок, продуцируемый рекомбинантной клеткой, может секретироваться или оставаться внутри клетки в зависимости от используемых последовательности и/или вектора. Как будет очевидно специалистам в данной области, экспрессирующие векторы, содержащие полинуклеотиды, могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать в себе сигнальные последовательности, которые управляют секрецией кодируемого полипептида через мембрану прокариотических или эукариотических клеток. Другие рекомбинантные конструкции могут быть использованы для присоединения последовательностей, кодирующих представляющий интерес полипептид, к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептидный домен, который будет облегчать очистку растворимых белков. Такие облегчающие очистку домены включают, но не ограничиваются этим, металл-хелатирующие пептиды, такие как гистидин-триптофановые модули, позволяющие осуществлять очистку на иммобилизованных металлах, домены белка A, позволяющие осуществлять очистку на иммобилизованном иммуноглобулине, и домен, используемый в системе FLAGS-удлинения/аффинной очистки (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Встраивание расщепляемых линкерных последовательностей, таких как линкерные последовательности, специфичные к фактору XA или энтерокиназе (Invitrogen, San Diego, Calif.), между доменом очистки и кодируемым полипептидом можно использовать для облегчения очистки. Один такой экспрессирующий вектор обеспечивает экспрессию слитого белка, содержащего представляющий интерес полипептид, и этот вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую 6 гистидиновых остатков, находящихся перед тиоредоксиновым или энтерокиназным сайтом расщепления. Гистидиновые остатки облегчают очистку на IMAC (аффинная хроматография с использованием иммобилизованных ионов металлов), как описано в Porath et al., *Prot. Exp. Purif.*, 3: 263-281 (1992), в то время как сайт расщепления энтерокиназой обеспечивает средство для очистки желаемого полипептида из слитого белка. Обсуждение векторов, кодирующих слитые белки, приведено в Kroll et al., *DNA Cell Biol.*, 12: 441-453 (1993)).

Методы доставки полинуклеотидов *in vivo*

В дополнительных воплощениях генетические конструкции, содержащие один или более полинуклеотидов по изобретению, вводят в клетки *in vivo*. Этого можно достичь с использованием любого из различных хорошо известных подходов; некоторые из них приведены ниже с целью иллюстрации.

1. Аденовирус

Один из предпочтительных способов для *in vivo* доставки одной или более чем одной последовательности нуклеиновой кислоты включает применение аденовирусного экспрессирующего вектора. Понимается, что "аденовирусный экспрессирующий вектор" включает такие конструкции, которые содержат аденовирусные последовательности, достаточные для (а) поддержания упаковки конструкции и (б) для экспрессии полинуклеотида, клонированного в нем в смысловой или антисмысловой ориентации. Конечно, в контексте антисмысловой конструкции экспрессия не требует, чтобы продукт гена синтезировался.

Экспрессирующий вектор содержит генноинженерную форму аденовируса. Знание генетической организации аденовируса, представляющего собой вирус с линейной двухцепочечной ДНК, 36 т.п.н., позволяет производить замену больших участков аденовирусной ДНК чужеродными последовательностями вплоть до 7 т.п.н. (Grunhaus & Horwitz, 1992). В противоположность ретровирусу, аденовирусная инфекция клеток хозяина не приводит к хромосомной интеграции, потому что аденовирусная ДНК может реплицироваться в виде эписомы без потенциальной генотоксичности. Кроме того, аденовирусы структурно стабильны и после активной амплификации не отмечено никакой геномной перестройки.

Аденовирус может инфицировать фактически все эпителиальные клетки независимо от стадии их клеточного цикла. До настоящего времени аденовирусная инфекция обнаруживается связанной, по-видимому, только с легкой формой заболевания, такого как острое респираторное заболевание, у людей.

Аденовирус особенно подходит для применения его в качестве вектора для переноса генов из-за среднего размера его генома, легкости манипулирования, высокого титра, широкого диапазона клеточных мишеней и высокой инфекционности. Оба конца вирусного генома содержат инвертированные повторы длиной 100-200 пар оснований (ITR), которые представляют собой цис-элементы, необходимые для репликации и упаковки вирусной ДНК. Ранние (E) и поздние (L) участки генома содержат разные транскрипционные единицы, которые разделены точкой начала репликации вирусной ДНК. Участок E1 (E1A и E1B) кодирует белки, отвечающие за регуляцию транскрипции вирусного генома и нескольких клеточных генов. Экспрессия участка E2 (E2A и E2B) приводит к синтезу белков для репликации вирусной ДНК. Эти белки вовлечены в репликацию ДНК, экспрессию поздних генов и "отключение" клетки-хозяина (Renan, 1990). Продукты поздних генов, включая большую часть капсидных вирусных белков, экспрессируются только после значительного процессинга одного первичного транскрипта под контролем главного позднего промотора (MLP). MLP (расположенный на 16,8 единицы карты) особенно эффективен в поздней фазе инфекции, и все мРНК, контролируемые этим промотором, содержат 5'-тройственную лидерную (TPL) последовательность, которая делает их предпочтительными мРНК для трансляции.

В настоящей системе рекомбинантный аденовирус получают в результате гомологичной рекомбинации между "челночным" вектором и провирусным вектором. Вследствие возможной рекомбинации между двумя провирусными векторами в результате этого процесса может быть получен аденовирус дикого типа. Поэтому крайне необходимым является выделение единичного клона вируса из индивидуальной бляшки и проверка его геномной структуры.

Получение и размножение существующих в настоящее время аденовирусных векторов, которые дефектны по репликации, зависит от уникальной линии хелперных клеток, обозначенной 293, которая представляет собой клетки почки эмбриона человека, трансформированные фрагментами ДНК Ad5 (аденовируса 5 серотипа), и которая конститутивно экспрессирует белки E1 (Graham et al., 1977). Поскольку участок E3 является необязательным в аденовирусном геноме (Jones & Shenk, 1978), существующие в настоящее время аденовирусные векторы с помощью клеток 293 несут чужеродную ДНК либо в участке E1, либо D3, либо в обоих этих участках (Graham & Prevec, 1991). В природе аденовирус может упаковывать приблизительно 105% генома дикого типа (Ghosh-Choudhury et al., 1987), обеспечивая емкость приблизительно для 2 дополнительных т.п.н. ДНК. В сочетании с приблизительно 5,5 т.п.н. ДНК, которые могут быть заменены в участках E1 и E3, максимальная емкость существующих в настоящее время аденовирусных векторов составляет менее 7,5 т.п.н. или примерно 15% от общей длины вектора. Более 80% вирусного генома аденовируса остается в остоке вектора и является источником трансмиссивной цитотоксичности. На этом дефектность по репликации E1-делетированного вируса не заканчивается. Например, при использовании доступных в настоящее время векторов с высокой множественностью заражения (MOI) наблюдалась утечка экспрессии вирусных генов (Mulligan, 1993).

Хелперные клеточные линии могут происходить из клеток человека, таких как клетки почки эмбриона человека, мышечные клетки, гемопоэтические клетки или другие мезенхимальные или эпителиальные клетки эмбриона человека. Альтернативно, хелперные клетки могут происходить из клеток других видов млекопитающих, перmissive для аденовируса человека. Такие клетки включают, например, клетки Vero (клетки почки зеленой мартышки) или другие эмбриональные мезенхимальные или эпителиальные клетки обезьяны. Как указано выше, в настоящее время предпочтительной хелперной клеточной

линией является линия 293.

Racher et al. (1995) описали улучшенные способы культивирования клеток 293 и размножения аденовируса. В одном из форматов агрегаты природных клеток выращивают путем инокуляции индивидуальных клеток в силиконизированных вращающихся колбах объемом 1 л (Techne, Cambridge, UK), содержащих по 100-200 мл среды. После перемешивания при 40 об/мин оценивают жизнеспособность клеток с использованием трипанового синего. В другом формате используют микроносители Fibra-Cel (Bibby Sterlin, Stone, UK) (5 г/л) следующим образом. Клеточный инокулят, ресуспендированный в 5 мл среды, добавляют к носителю (50 мл) в колбе Эрленмейера объемом 250 мл и оставляют в стационарном состоянии на 1-4 ч с перемешиванием время от времени. Затем среду заменяют на 50 мл свежей среды и начинают встряхивание. Для продуцирования вируса клетки оставляют расти до конfluence примерно 80%, после чего среду меняют (до 25% конечного объема) и добавляют аденовирус при MOI 0,05. Культуры оставляют в стационарном состоянии на ночь, после чего объем увеличивают до 100% и начинают встряхивание, которое продолжают в течение еще 72 ч.

Помимо требования, чтобы аденовирусный вектор был дефектным или по меньшей мере условно дефектным по репликации, природа аденовирусного вектора, по-видимому, не является решающей для успешного практического применения изобретения. Аденовирус может представлять собой любой из 42 разных известных серотипов или подгрупп A-F. Аденовирус 5 типа подгруппы C является предпочтительным исходным материалом для получения условно дефектного по репликации аденовирусного вектора для применения в настоящем изобретении, поскольку аденовирус 5 типа является человеческим аденовирусом, о котором известно огромное количество биохимической и генетической информации, и исторически его используют для большинства конструкций, использующих аденовирус в качестве вектора.

Как указано выше, типичный вектор по настоящему изобретению дефектен по репликации и не будет иметь аденовирусного участка E1. Таким образом, удобнее всего будет вводить полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес ген, в положение, из которого удалены E1-кодирующие последовательности. Однако положение вставки конструкции в аденовирусных последовательностях не критично для этого изобретения. Полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес ген, также может быть встроен вместо делетированного участка E3 в E3-замещающих векторах, как описано Karlsson et al. (1986), или в участок E4, где линия хелперных клеток или хелперный вирус комплементирует дефект E4.

Аденовирус легко выращивать, им легко манипулировать, и он демонстрирует широкий круг хозяев *in vitro* и *in vivo*. Эта группа вирусов может быть получена с высокими титрами, например, 10^9 - 10^{11} бляшкообразующих единиц на один мл, и они обладают высокой инфекционностью. Жизненный цикл аденовируса не требует интеграции в геном клетки-хозяина. Чужеродные гены, доставляемые посредством аденовирусных векторов, являются эпизомными и, следовательно, имеют низкую генотоксичность в отношении клеток хозяина. Не сообщалось ни о каких побочных эффектах при исследованиях вакцинации аденовирусом дикого типа (Couch et al., 1963; Tor et al., 1971), что демонстрирует их безопасность и терапевтический потенциал в качестве векторов для переноса генов *in vivo*.

Аденовирусные векторы использовали в экспрессии эукариотических генов (Levrero et al., 1991; Gomez-Foix et al., 1992) и разработке вакцин (Grunhaus & Horwitz, 1992; Graham & Prevec, 1992). Недавно исследования на животных показали, что рекомбинантный аденовирус может быть использован для генной терапии (Stratford-Perricaudet & Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Rich et al., 1993). Исследования при введении рекомбинантного аденовируса в разные ткани включают инстилляцию трахеи (Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992), мышечную инъекцию (Ragot et al., 1993), периферические внутривенные инъекции (Herz & Gerard, 1993) и стереотактическую инокуляцию в головной мозг (Le Gal La Salle et al., 1993).

Аденовирусные векторы могут происходить из человеческого аденовируса. Альтернативно, они могут происходить из аденовируса других видов, например шимпанзе, что может иметь преимущество, поскольку данные вирусные векторы не нейтрализуются антителами против человеческого аденовируса, циркулирующего в крови многих человеческих субъектов (см., например: Tatsis N. et al., Gene Therapy, 2006, 13: 421-429).

Аденовирус 35 типа, который является относительно редко встречающимся, и поэтому против самого этого вектора имеются низкие уровни предсуществующего иммунитета, использовали в качестве системы доставки в некоторых противотуберкулезных вакцинах, находящихся в стадии разработки (см. например, Radosevic et al., Infection and Immunity, 2007, 75(8): 4105-4115). Аденовирус 35 типа также может быть особенно полезен в настоящем изобретении в качестве вектора для доставки.

2. Ретровирусы

Ретровирусы представляют собой группу вирусов, содержащих одноцепочечную РНК, характеризующихся способностью превращать свою РНК в двухцепочечную ДНК в инфицированных клетках посредством процесса обратной транскрипции (Coffin, 1990). Полученная ДНК затем стабильно интегрируется в клеточные хромосомы в виде провируса и направляет синтез вирусных белков. Интеграция приводит к сохранению последовательностей вирусных генов в реципиентной клетке и ее потомках. Ретровирусный геном содержит три гена: gag, pol и env, которые кодируют капсидные белки, фермент полимера-

зу и компоненты оболочки, соответственно. Последовательность, обнаруженная выше гена *gag*, содержит сигнал для упаковки генома в вирионы. На 5'- и 3'-концах вирусного генома имеются две последовательности длинных концевых повторов (LTR). Они содержат сильные промоторные и энхансерные последовательности и также необходимы для интеграции в геном клетки-хозяина (Coffin, 1990).

Для того чтобы создать ретровирусный вектор, нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более представляющих интерес олигонуклеотидных или полинуклеотидных последовательностей, встраивают в вирусный геном в место расположения определенных вирусных последовательностей для получения вируса, дефектного по репликации. Для получения вирионов конструируют "упаковывающую" клеточную линию, содержащую гены *gag*, *pol* и *env*, но не содержащую LTR и "упаковывающие" компоненты (Mann et al., 1983). Когда в эту клеточную линию вводят (например, путем осаждения фосфатом кальция) рекомбинантную плазмиду, содержащую кДНК, вместе с ретровирусными LTR и "упаковывающими" последовательностями, "упаковывающая" последовательность способствует упаковке транскрипта РНК рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем секретируются в культуральную среду (Nicolas & Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Среды, содержащие рекомбинантные ретровирусы, затем собирают, возможно концентрируют и используют для переноса генов. Ретровирусные векторы способны инфицировать широкий спектр клеточных типов. Однако для интеграции и стабильной экспрессии необходимо деление клеток хозяина (Paskind et al., 1975).

Недавно был разработан новый подход, который делает возможным специфическое "прицеливание" ретровирусных векторов, основанный на химической модификации ретровируса путем химического присоединения остатков лактозы к вирусной оболочке. Благодаря этой модификации смогли осуществить специфическое заражение гепатоцитов через сialogликопротеиновые рецепторы.

Был применен другой подход для "прицеливания" рекомбинантных ретровирусов, в котором использовали биотинилированные антитела против ретровирусного оболочечного белка и против специфического клеточного рецептора. Антитела соединяли друг с другом через биотиновые компоненты путем использования стрептавидина (Roux et al., 1989). С использованием антител против антигенов класса I и класса II главного комплекса гистосовместимости они продемонстрировали, что имеет место инфекция различных человеческих клеток, несущих такие поверхностные антигены, экотропным вирусом *in vitro* (Roux et al., 1989).

3. Аденоассоциированные вирусы (AAV)

AAV (Ridgeway, 1988; Hermonat & Muzyczka, 1984) представляет собой парвовирус, открытый в виде контаминации аденовирусных штаммов. Он является повсеместно распространенным вирусом (антитела имеются у 85% человеческой популяции в США), связи которого с какой-либо болезнью не установлены. Кроме того, его классифицируют как депендовиром, поскольку его репликация зависит от присутствия хелперного вируса, такого как аденовирус. Были выделены пять серотипов, из которых лучше всего охарактеризован AAV-2. AAV имеет одноцепочечную линейную ДНК, которая заключена в капсидную оболочку с капсидными белками VP1, VP2 и VP3 с образованием икосаэдрического вириона с диаметром 20-24 нм (Muzyczka & McLaughlin, 1988).

ДНК AAV имеет длину приблизительно 4,7 тысяч оснований. Она содержит две открытые рамки считывания и фланкирована двумя ITR. В геноме AAV имеются два основных гена: *гер* и *сар*. Ген *гер* кодирует белки, ответственные за вирусные репликации, тогда как *сар* кодирует капсидный белок VP1-3. Каждый ITR образует Т-образную шпильчатую структуру. Эти концевые повторы являются единственными существенными цис-компонентами AAV для интеграции в хромосомы. Поэтому AAV может быть использован в качестве вектора со всеми вирусными кодирующими последовательностями, удаленными и замененными кассетой генов для доставки. Идентифицированы три вирусных промотора, и они обозначены как *p5*, *p19* и *p40*, в соответствии с их положением на карте. Транскрипция с *p5* и *p19* приводит к продуцированию белков *гер*, а транскрипция с *p40* приводит к продуцированию капсидных белков (Hermonat & Muzyczka, 1984).

Существует несколько факторов, которые побуждали исследователей к изучению возможности использования гAAV (рекомбинантного AAV) в качестве экспрессирующего вектора. Один из них заключается в том, что необходимых условий для доставки гена для интеграции в хромосому хозяина удивительно мало. Необходимо иметь инвертированные повторы (ITR) размером 145 п.н., что составляет только 6% генома AAV. Это оставляет место в векторе для составления вставки ДНК длиной 4,5 т.н. Несмотря на то, что такая несущая емкость может препятствовать доставке больших генов с использованием AAV, она в достаточной степени подходит для доставки антисмысловых конструкций.

Кроме того, AAV представляет собой хороший выбор в качестве средств доставки ввиду своей безопасности. Существует относительно сложный механизм его "высвобождения": для мобилизации гAAV требуются не только аденовирус дикого типа, но также гены AAV. Более того, AAV не является патогенным и не ассоциирован с каким-либо заболеванием. Удаление вирусных кодирующих последовательностей минимизирует иммунные ответы на экспрессию вирусных генов и, следовательно, гAAV не индуцирует воспалительный ответ.

4. Другие вирусные векторы в качестве экспрессирующих конструкций

Для доставки олигонуклеотидных или полинуклеотидных последовательностей в клетку-хозяина в

качестве экспрессирующих конструкций в настоящем изобретении можно использовать другие вирусные векторы. Можно использовать векторы, происходящие из таких вирусов, как вирус оспы коров (Ridgeway, 1988; Coupar et al., 1988), лентивирусы, полиовирусы и герпесвирусы. Также можно ожидать, что будут использованы другие векторы, происходящие из поксвирусов, как, например, векторы на основе вируса оспы птиц. Они обладают некоторыми привлекательными свойствами для различных клеток млекопитающих (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Couparef et al., 1988; Horwich et al., 1990).

Благодаря недавнему открытию дефектных вирусов гепатита В было достигнуто новое понимание структурно-функциональной взаимосвязи разных вирусных последовательностей. Исследования *in vitro* показали, что вирус может сохранять способность к хелпер-зависимой упаковке и обратной транскрипции, несмотря на удаление вплоть до 80% его генома (Horwich et al., 1990). Это навело на мысль, что большие участки генома могут быть заменены чужеродным генетическим материалом. Гепатотропизм и персистенция (интеграция) являлись особенно привлекательными свойствами для печени-направленного переноса генов. Chang et al. (1991) ввели ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) в геном вируса гепатита В утки в место расположения последовательностей, кодирующих полимеразу, поверхностную и предповерхностную (pre-surface) кодирующие области. Осуществили его котрансфекцию вместе с вирусом дикого типа в клеточную линию гепатомы птиц. Для инфицирования первичных утиных гепатоцитов использовали культуральные среды, содержащие высокие титры рекомбинантного вируса. Стабильную экспрессию гена CAT детектировали в течение по меньшей мере 24 суток после трансфекции (Chang et al., 1991).

Дополнительные "вирусные" векторы включают вирусоподобные частицы (VLP) и фаги.

5. Невирусные векторы

Для того, чтобы осуществить экспрессию олигонуклеотидных или полинуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению, экспрессирующая конструкция должна быть доставлена в клетку. Эта доставка может быть осуществлена *in vitro*, как в лабораторных методах трансформации клеточных линий, или *in vivo* или *ex vivo*, как при лечении некоторых болезненных состояний. Как описано выше, один из предпочтительных механизмов доставки осуществляется через вирусную инфекцию, когда экспрессирующая конструкция инкапсулируется в инфекционную вирусную частицу.

После доставки экспрессирующей конструкции в клетку нуклеиновая кислота, кодирующая желаемые олигонуклеотидные или полинуклеотидные последовательности, может располагаться и экспрессироваться в разных сайтах. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота, кодирующая такую конструкцию, может стабильно интегрироваться в геном клетки. Эта интеграция может осуществляться в специфическом положении и ориентации посредством гомологичной рекомбинации (замена генов), или она может интегрироваться в случайном, неспецифическом положении (генная аугментация). В следующих других воплощениях нуклеиновая кислота может стабильно поддерживаться в клетке в виде отдельного эписомного сегмента ДНК. Такие сегменты нуклеиновой кислоты или "эписомы" кодируют последовательности, достаточные для поддержания и репликации независимо от клеточного цикла хозяина или синхронизированно с ним. То, каким образом экспрессирующая конструкция доставляется в клетку и где в клетке сохраняется нуклеиновая кислота, зависит от типа используемой экспрессирующей конструкции.

В некоторых воплощениях изобретения экспрессирующая конструкция, содержащая одну или более олигонуклеотидных или полинуклеотидных последовательностей, может просто состоять из голый рекомбинантной ДНК или плазмиды. Перенос такой конструкции может быть осуществлен, например, любым способом, который физически или химически увеличивает проницаемость клеточной мембраны. Это особенно применимо для переноса *in vitro*, но также может быть использовано для применения *in vivo*. Dubensky et al. (1984) успешно инъецировали полиомавирусную ДНК в форме кальций-фосфатных преципитатов в печень и селезенку взрослых и новорожденных мышей, продемонстрировав активную вирусную репликацию и острую инфекцию. Benvenisty и Reshef (1986) также продемонстрировали, что прямая внутрибрюшинная инъекция осажденных фосфатом кальция плазмид приводит к экспрессии трансфицированных генов. Рассматривается возможность того, что ДНК, кодирующая представляющий интерес ген, также может быть перенесена аналогичным образом *in vivo* и может экспрессировать генный продукт.

Другое воплощение изобретения, касающееся переноса в клетки экспрессирующей конструкции, представляющей собой голую ДНК, может включать бомбардировку частицами. Этот способ зависит от способности ускорять ДНК-покрытые бомбардирующие микрочастицы до высокой скорости, позволяющей им проходить через клеточные мембраны и проникать в клетки, не вызывая их гибели (Klein et al., 1987). Разработано несколько устройств для ускорения небольших частиц. В основе одного такого устройства лежит высоковольтный разряд с целью генерирования электрического тока, что в свою очередь обеспечивает движущую силу (Yang et al., 1990). Используемые микрочастицы состоят из биологически инертных веществ, таких как вольфрамовые или золотые гранулы.

Выбранные органы, включая печень, кожу и мышечную ткань крыс и мышей, подвергали бомбардировке *in vivo* (Yang et al., 1990; Zelenin et al., 1991). Для этого может потребоваться хирургическое воздействие на ткань или клетки с целью исключения любой мешающей ткани, находящейся между пушкой

и органом-мишенью, то есть, обработка *ex vivo*. И снова, ДНК, кодирующая конкретный ген, может быть доставлена с помощью этого способа и кроме того может быть встроена.

В качестве способа доставки также можно использовать бактерии (например, листерии, см. WO 2004/11048) и, в особенности, БЦЖ.

Полипептидные композиции

В других аспектах согласно настоящему изобретению предложены полипептидные композиции.

Как правило, полипептид по изобретению будет представлять собой выделенный полипептид (то есть отделенный от тех компонентов, вместе с которыми его обычно можно обнаружить в природе).

Например, природный белок является выделенным, если он отделен от некоторых или всех сопутствующих веществ в природной системе. Предпочтительно, такие полипептиды являются чистыми по меньшей мере примерно на 90%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно на 99%. Полинуклеотид считается выделенным, если, например, он клонирован в вектор, не являющийся частью природного окружения.

Полипептиды могут быть получены с использованием любого из множества хорошо известных методов. Рекombинантные полипептиды, кодируемые последовательностями ДНК, которые описаны выше, можно легко получить из последовательностей ДНК с использованием любого из различных экспрессирующих векторов, известных средним специалистам в данной области. Можно добиться экспрессии в любой подходящей клетке хозяина, которая трансформирована или трансфицирована экспрессирующим вектором, содержащим молекулу ДНК, которая кодирует рекомбинантный полипептид. Подходящие клетки хозяина включают прокариоты, дрожжи и клетки высших эукариот, такие как клетки млекопитающих и клетки растений. Предпочтительно, используемыми клетками хозяина являются *E. coli*, дрожжи или линия клеток млекопитающих, такая как COS (клетки африканской зеленой мартышки) или CHO (клетки яичников китайского хомячка). Супернатанты из подходящих систем хозяин/вектор, секретирующих рекомбинантный белок или полипептид в культуральную среду, сначала могут быть сконцентрированы с использованием имеющегося в продаже фильтра. После концентрирования концентрат может быть нанесен на подходящий матрикс для очистки, такой как аффинный матрикс или ионообменная смола. Наконец, для дальнейшей очистки рекомбинантного полипептида может быть использована одна или более чем одна стадия обращенно-фазовой ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография).

Полипептиды по изобретению, их иммуногенные фрагменты и другие варианты, имеющие меньше чем примерно 100 аминокислот и обычно меньше чем примерно 50 аминокислот, могут быть также получены способами синтеза с использованием методов, хорошо известных средним специалистам в данной области техники. Например, такие полипептиды могут быть синтезированы с использованием любого из коммерчески доступных твердофазных методов, таких как метод твердофазного синтеза по Меррифилду, в котором аминокислоты последовательно добавляют к растущей аминокислотной цепи. См. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963). Оборудование для автоматизированного синтеза полипептидов имеется в продаже у таких поставщиков, как Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), и на нем можно работать в соответствии с инструкциями производителя.

В некоторых конкретных воплощениях полипептид может представлять собой слитый белок, который содержит множество полипептидов как описано здесь, или который содержит по меньшей мере один полипептид как описано здесь и неродственную последовательность, примеры таких белков включают белки возбудителей столбняка, туберкулеза и гепатита (см., например, Stoute et al., New Engl. J. Med, 336: 86-91 (1997)). Партнер слияния может, например, содействовать обеспечению Т-хелперных эпитопов (иммунологический партнер слияния), предпочтительно Т-хелперных эпитопов, распознаваемых людьми, или может содействовать экспрессии белка (усилитель экспрессии) с более высокими выходами, чем у нативного рекомбинантного белка. Некоторые предпочтительные партнеры слияния являются и иммунологическими, и усиливающими экспрессию партнерами слияния. Другие партнеры слияния могут быть выбраны так, чтобы увеличивать растворимость белка или позволять белку достигать желаемых внутриклеточных компартментов. Другие партнеры слияния включают аффинные метки, которые облегчают очистку белка.

Слитые белки в общем случае могут быть получены с использованием стандартных методов, включая химическое конъюгирование. Предпочтительно, слитый белок экспрессируется в виде рекомбинантного белка, позволяя осуществлять продуцирование с повышенными уровнями относительно неслитого белка в экспрессирующей системе. Коротко, последовательности ДНК, кодирующие полипептидные компоненты, могут быть собраны по отдельности и лигированы в соответствующий экспрессирующий вектор. 3'-конец последовательности ДНК, кодирующей один полипептидный компонент, лигируют, с пептидным линкером или без него, с 5'-концом последовательности ДНК, кодирующей второй полипептидный компонент, таким образом, чтобы рамки считывания последовательностей находятся в фазе. Это позволяет осуществлять трансляцию в виде единого слитого белка, который сохраняет биологическую активность обоих полипептидных компонентов.

Пептидную линкерную последовательность можно использовать для отделения первого и второго полипептидных компонентов расстоянием, достаточным для того, чтобы обеспечить то, что каждый полипептид будет сворачиваться в свою вторичную и третичную структуры. Такую пептидную линкерную

последовательность встраивают в слитый белок, используя стандартные методы, хорошо известные в данной области. Подходящие пептидные линкерные последовательности могут быть выбраны на основании следующих факторов: (1) их способности принимать гибкую вытянутую конформацию; (2) их неспособности принимать вторичную структуру, которая могла бы взаимодействовать с функциональными эпитопами на первом и втором полипептидах; и (3) отсутствия гидрофобных или заряженных остатков, которые могли бы взаимодействовать с полипептидными функциональными эпитопами. Предпочтительные пептидные линкерные последовательности содержат остатки Gly, Asn и Ser. Другие почти нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также могут быть использованы в линкерной последовательности. Аминокислотные последовательности, которые можно успешно использовать в качестве линкеров, включают последовательности, раскрытые в Maratea et al., *Gene*, 40: 39-46 (1985); Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8258-8262 (1986); патенте США № 4935233 и патенте США № 4751180. Линкерная последовательность обычно может иметь длину от 1 до примерно 50 аминокислот. Линкерные последовательности не требуются, когда первый и второй полипептиды имеют несущественные N-концевые аминокислотные участки, которые могут быть использованы для отделения функциональных доменов и предупреждения пространственной интерференции.

В предпочтительных воплощениях иммунологический партнер слияния происходит из белка D, поверхностного белка грамотрицательной бактерии *Haemophilus influenza B* (WO 91/18926). Предпочтительно, когда производное белка D содержит приблизительно первую треть белка (например, первые N-концевые 100-110 аминокислот), и производное белка D может быть липидизировано. В некоторых предпочтительных воплощениях первые 109 остатков партнера слияния липопротеина D включены на N-конце для получения полипептида с дополнительными экзогенными Т-клеточными эпитопами и для увеличения уровня экспрессии в *E. coli* (таким образом, функционируя как усилитель экспрессии). Липидный хвост обеспечивает оптимальное представление антигена антигенпредставляющим клеткам. Другие партнеры слияния включают неструктурный белок из вируса гриппа: NS1 (гемагглютинин). Обычно используют 81 N-концевую аминокислоту, хотя можно использовать разные фрагменты, которые включают Т-хелперные эпитопы.

В другом воплощении иммунологическим партнером слияния является белок, известный как LYTA, или его участок (предпочтительно С-концевой участок). LYTA происходит из *Streptococcus pneumoniae*, который синтезирует N-ацетил-L-аланин-амидазу, известную как амидаза LYTA (кодируемую геном *LytA*; *Gene*, 43: 265-292 (1986)). LYTA представляет собой аутолизин, который специфически расщепляет определенные связи в пептидогликановом остове. С-концевой домен белка LYTA отвечает за сродство к холину или некоторым аналогам холина, таким как DEAE (диэтиламиноэтил). Это свойство использовали для разработки *E. coli* C-LYTA-экспрессирующих плазмид, полезных для экспрессии слитых белков. Описана очистка гибридных белков, содержащих фрагмент C-LYTA на аминоконце (см. *Biotechnology*, 10: 795-798 (1992)). В предпочтительном воплощении повторяющийся участок LYTA может быть встроен в слитый белок. Повторяющийся участок обнаружен в С-концевой области, начиная с остатка 178. Особенно предпочтительный повторяющийся участок включает в себя остатки 188-305.

Т-клетки

Иммунотерапевтические композиции могут также, или альтернативно, содержать Т-клетки, специфичные к антигену *Mycobacterium*. Такие клетки обычно могут быть получены *in vitro* или *ex vivo* с использованием стандартных процедур. Например, Т-клетки можно выделить из спинного мозга, периферической крови или фракции спинного мозга или периферической крови пациента, используя имеющуюся в продаже систему для разделения клеток, такую как система Isolex™, доступная от Nexell Therapeutics, Inc. (Irvine, CA; см. также патент США № 5240856; патент США № 5215926; WO 89/06280; WO 91/16116 и WO 92/07243). Альтернативно, Т-клетки могут быть получены от родственников или не родственников, от млекопитающих, не являющихся людьми, из клеточных линий или культур.

Т-клетки могут быть стимулированы полипептидом по изобретению, полинуклеотидом, кодирующим такой полипептид, и/или антигенпрезентирующей клеткой (АРС), которая экспрессирует такой полипептид. Такую стимуляцию проводят в условиях и в течение времени, достаточных для того, чтобы обеспечить продукцию Т-клеток, специфичных к полипептиду. Предпочтительно полипептид или полинуклеотид присутствует в средстве для доставки, таком как микросфера, для облегчения продуцирования специфических Т-клеток.

Т-клетки считаются специфичными к полипептиду по изобретению, если эти Т-клетки специфически пролиферируют, секретируют цитокины или уничтожают клетки-мишени, покрытые полипептидом или экспрессирующие ген, кодирующий полипептид. Т-клеточную специфичность можно оценить, используя любую из множества стандартных методов. Например, в анализе с высвобождением хрома или анализе пролиферации увеличение индекса стимуляции более чем в два раза в лизисе и/или пролиферации по сравнению с отрицательными контролями указывает на Т-клеточную специфичность. Такие анализы могут быть проведены, например, как описано в Chen et al., *Cancer Res.*, 54: 1065-1070 (1994). Альтернативно, определение пролиферации Т-клеток может быть выполнено с помощью различных известных методов. Например, Т-клеточную пролиферацию можно определить путем измерения возрастающей скорости синтеза ДНК (например, с применением импульсно меченых культур Т-клеток с использованием

ем меченного тритием тимидина и измерения количества меченного тритием тимидина, включенного в ДНК). Контакт с полипептидом по изобретению (100 нг/мл - 100 мкг/мл, предпочтительно 200 нг/мл - 25 мкг/мл) в течение 3-7 суток должен приводить по меньшей мере к двукратному увеличению пролиферации Т-клеток. Описанный выше контакт в течение 2-3 ч должен приводить к активации Т-клеток, как измерено с использованием стандартных цитокиновых анализов, в которых двукратное увеличение в уровне высвобождения цитокина (например, TNF или IFN- γ) является индикатором Т-клеточной активации (см. Coligan et al., Current Protocols in Immunology, vol. 1 (1998)). Т-клетки, которые были активированы в ответ на полипептид, полинуклеотид или полипептид-экспрессирующие APC, могут представлять собой CD4⁺ и/или CD8⁺. Белок-специфические Т-клетки могут быть размножены с использованием стандартных методов. В предпочтительных воплощениях Т-клетки получают от пациента, донора-родственника или донора, не являющегося родственником, и их вводят пациенту после стимуляции и размножения.

Для терапевтических целей CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки, которые пролиферируют в ответ на полипептид, полинуклеотид или APC, могут быть количественно размножены или *in vitro*, или *in vivo*. Пролиферацию таких Т-клеток *in vitro* можно осуществить различными способами. Например, Т-клетки могут быть повторно экспонированы полипептиду или короткому пептиду, соответствующему иммуногенному участку такого полипептида, с добавлением или без добавления Т-клеточных ростовых факторов, таких как интерлейкин-2, и/или стимуляторными клетками, которые синтезируют полипептид. Альтернативно, одна или более Т-клеток, которые пролиферируют в присутствии белка, могут быть количественно размножены путем клонирования. Способы клонирования клеток хорошо известны в данной области и включают серийное разведение.

Фармацевтические композиции

В дополнительных воплощениях полинуклеотидные, полипептидные, Т-клеточные композиции и/или композиции антител, раскрытые здесь, будут изготовлены в фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых растворах для введения в клетку или животному либо отдельно, либо в комбинации с одним или более чем одним другим способом терапии.

Также следует понимать, что при желании сегмент нуклеиновой кислоты (например, РНК или ДНК), экспрессирующий полипептид как раскрыто здесь, можно вводить также в комбинации с другими агентами, такими как, например, другие белки или полипептиды или различные фармацевтически активные агенты, включая химиотерапевтические агенты, эффективные против инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*. На самом деле, фактически нет никакого ограничения в отношении других компонентов, которые также могут быть включены, при условии, что дополнительные агенты не вызывают значительного неблагоприятного эффекта при контакте с клетками-мишенями или тканями хозяина. Таким образом, композиции могут быть доставлены вместе с различными другими агентами, как необходимо в конкретном случае. Такие композиции могут быть очищены из клеток хозяина или других биологических источников либо, альтернативно, могут быть химически синтезированы, как изложено здесь. Более того, такие композиции могут также включать композиции замещенных РНК или ДНК или их производных.

Технология приготовления фармацевтически приемлемых эксципиентов и растворов-носителей хорошо известна специалистам в данной области техники, поскольку относится к разработке подходящих режимов дозирования и схем лечения для применения конкретных композиций, раскрытых здесь, в ряде схем лечения, включая, например, пероральное, парентеральное, внутривенное, интраназальное и внутримышечное введение, и в изготовлении препаратов. Другие пути введения включают введение через поверхности слизистых.

Обычно с помощью композиций, содержащих терапевтически эффективное количество, доставляют от примерно 0,1 до примерно 1000 мкг полипептида за одно введение, в более типичных случаях от примерно 2,5 до примерно 100 мкг полипептида за одно введение. Что касается полинуклеотидных композиций, то обычно доставляют от примерно 10 мкг до примерно 20 мг полинуклеотида по изобретению за одно введение, в более типичных случаях примерно от 0,1 до примерно 10 мг полинуклеотида по изобретению за одно введение.

Естественно, количество активного(ых) соединения(й) в каждой терапевтически полезной композиции, которая может быть изготовлена, делают таким, чтобы в любой указанной стандартной дозе соединения получить подходящую дозировку. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полувыведения, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические полезные свойства, будут подразумеваться специалистом в области изготовления таких фармацевтических композиций, и, по существу, могут быть желательными различные дозировки и схемы лечения.

1. Пероральная доставка

В некоторых применениях фармацевтические композиции, раскрытые здесь, могут быть доставлены посредством перорального введения животному. По существу, эти композиции могут быть изготовлены с использованием инертного разбавителя или с использованием усваиваемого пищевого носителя, или они могут быть помещены в желатиновую капсулу с твердой или мягкой оболочкой, или они могут быть спрессованы в таблетки, или они могут быть введены непосредственно с пищей рациона.

Активные соединения могут быть даже объединены с эксципиентами и использованы в форме про-

глатываемых таблеток, трансбуккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и тому подобного (Mathiowitz et al., 1997; Hwang et al., 1998; патент США 5641515; патент США 5580579 и патент США 5792451, каждый из которых конкретно включен в данное описание во всей своей полноте посредством ссылки). Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и тому подобное могут также содержать следующее: связующее вещество, такое как трагакантовая камедь, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; эксципиенты, такие как дикальцийфосфат; разрыхлитель, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и тому подобное; смазывающее вещество, такое как стеарат магния; и может быть добавлен подсластитель, такой как сахароза, лактоза или сахарин, или корригент, как, например, перечная мята, масло гаультерии или вишневый корригент. Когда стандартная лекарственная форма представляет собой капсулу, тогда она может содержать, в дополнение к веществам вышеприведенного типа, жидкий носитель. Различные другие вещества могут присутствовать в качестве покрытий или каким-либо иным образом модифицировать физическую форму лекарственной единицы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты шеллаком, сахаром или тем и другим. Сироп эликсира может содержать активное соединение, сахарозу в качестве подсластителя, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и корригент, как например, вишневый или апельсиновый корригент. Конечно, любое вещество, используемое в изготовлении любой стандартной лекарственной формы, должно быть фармацевтически чистым и, по существу, нетоксичным в используемых количествах. Кроме того, активные компоненты могут быть включены в препарат и композиции с непрерывным высвобождением.

Для перорального введения композиции по настоящему изобретению могут быть альтернативно введены с одним или более эксципиентами в форме жидкости для полоскания рта, средства для чистки зубов, трансбуккальных таблеток, перорального спрея или сублингвальной, вводимой в ротовую полость композиции. Например, жидкость для полоскания рта может быть приготовлена путем введения активного ингредиента в необходимом количестве в соответствующий растворитель, такой как раствор бората натрия (раствор Добелла). Альтернативно, активный ингредиент может быть включен в пероральный раствор, такой как раствор, содержащий борат натрия, глицерин и бикарбонат калия, или диспергирован в средстве для чистки зубов, или добавлен в терапевтически эффективном количестве к композиции, которая может содержать воду, связующие вещества, абразивные вещества, корригенты, пенообразователи и увлажнители. Альтернативно, композиции могут быть изготовлены в форме таблетки или раствора, которые можно поместить под язык или каким-либо иным образом растворить во рту.

2. Доставка путем инъекции

В некоторых случаях будет желательно доставлять фармацевтические композиции, раскрытые здесь, парентерально, внутривенно, внутримышечно, интрадермально или даже интраперитонеально, как описано в патенте США 5543158, патенте США 5641515 и патенте США 5399363 (каждый из которых конкретно включен здесь во всей своей полноте посредством ссылки). Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей могут быть приготовлены в воде, смешанной соответственно с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Также могут быть приготовлены дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти композиции содержат консервант для предупреждения роста микроорганизмов.

Фармацевтические формы, подходящие для применения путем инъекции, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий (патент США 5466468, конкретно включенный здесь во всей своей полноте посредством ссылки). Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы ее можно было легко вводить с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), подходящие их смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путём применения покрытия, такого как лецитин, путём поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путём применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов можно облегчить путём использования различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях предпочтительным будет включение изотонических агентов, например сахаров или хлорида натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно осуществить путём применения в композициях агентов, замедляющих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Для парентерального введения в водном растворе, например, раствор должен быть, при необходимости, соответствующим образом забуферен, и жидкий разбавитель должен быть сначала приготовлен изотоническим с использованием достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Такие специфические водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и интраперитонеального введения. В связи с этим, в свете настоящего описания, специалистам в

данной области техники будет известна стерильная водная среда, которая может быть использована. Например, одну дозировку можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для введения в подкожную клетчатку, либо инъецировать в предполагаемое место инфузии (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15-е издание, pp. 1035-1038 и 1570-1580). Обязательно будет иметь место некоторая вариация в дозировке в зависимости от состояния подвергаемого лечению субъекта. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять соответствующую дозу для индивидуального субъекта. Более того, для введения человеку препараты должны удовлетворять стандартам стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты, согласно требованиям FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов) на основании стандартов для биопрепаратов.

Стерильные инъекционные растворы готовят путем введения активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем введения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный наполнитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами изготовления являются методы вакуумной сушки и лиофилизации, с помощью которых получают порошок активного ингредиента и любого дополнительного желаемого ингредиента из их предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Композиции, раскрытые здесь, могут быть изготовлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образованные со свободными аминокетонами белка) и которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и тому подобное. Кроме того, соли, образованные свободными карбоксильными группами, могут происходить из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и тому подобное. После приготовления растворы будут введены способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Композиции легко вводят в разнообразных лекарственных формах, таких как инъекционные растворы, капсулы с высвобождением лекарственного средства и тому подобное.

Термин "носитель", как он использован здесь, включает каждый и все растворители, дисперсионные среды, наполнители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты, буферы, растворы-носители, суспензии, коллоиды и тому подобное. Применение таких сред и агентов для фармацевтических активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда любая традиционная среда или агент не совместимы с активным ингредиентом, их применение в терапевтических композициях предполагается. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты.

Фраза "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным структурам и композициям, которые не дают аллергической или подобной неблагоприятной реакции при введении человеку. Изготовление водной композиции, содержащей белок в качестве активного ингредиента, хорошо известно в данной области. Обычно такие композиции изготавливают в виде инъецируемых форм, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий; также могут быть изготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Композиция также может быть эмульгирована.

3. Назальная и трансбуккальная доставка

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции можно доставлять посредством интраназальных спреев, трансбуккальных спреев, ингаляций и/или других приспособлений для доставки аэрозолей. Способы доставки генов, нуклеиновых кислот и пептидных композиций непосредственно в легкие, например, посредством назальных и трансбуккальных аэрозольных спреев, описаны, например, в патенте США 5756353 и патенте США 5804212 (каждый из которых конкретно включен здесь во всей своей полноте посредством ссылки). Кроме того, в области фармацевтики также хорошо известна доставка лекарственных средств с использованием интраназальных смол в виде микрочастиц (Takenaga et al., 1998) и лизофосфатидил-глицериновых соединений (патент США 5725871, конкретно включенный здесь во всей своей полноте посредством ссылки). Кроме того, трансмукозальная доставка лекарственного средства в форме основного вещества с носителем из политетрафторэтилена описана в патенте США 5780045 (конкретно включенном здесь во всей своей полноте посредством ссылки).

4. Доставка, опосредованная липосомами, нанокapsулами и микрочастицами

В некоторых воплощениях авторы изобретения предполагают применение липосом, нанокapsул, микрочастиц, микросфер, липидных частиц, везикул и тому подобного для введения композиций по настоящему изобретению в подходящие клетки хозяина. В частности, композиции по настоящему изобретению могут быть изготовлены для доставки инкапсулированными либо в липидную частицу, либо липосому, либо везикулу, либо наносферу, либо наночастицу или тому подобное.

Такие композиции могут быть предпочтительны для введения фармацевтически приемлемых композиций нуклеиновых кислот или конструкций, раскрытых здесь. Образование и использование липосом обычно известно специалистам в данной области техники (см. например, Couvreur et al., 1977; Couvreur, 1988; Lasic, 1998; где описано применение липосом и нанокапсул в направленной антибиотикотерапии внутриклеточных бактериальных инфекций и заболеваний). Недавно были разработаны липосомы с улучшенными стабильностью в сыворотке и периодами полувыведения из кровотока (Gabizon и Papahadjopoulos, 1988; Allen и Choun, 1987; патент США 5741516, конкретно включенный здесь во всей своей полноте посредством ссылки). Кроме того, представлены обзоры различных способов изготовления липосомных и липосомоподобных композиций в качестве потенциальных лекарственных носителей (Takakura, 1998; Chandran et al., 1997; Margalit, 1995; патент США 5567434; патент США 5552157; патент США 5565213; патент США 5738868 и патент США 5795587, каждый из которых конкретно включен здесь во всей своей полноте посредством ссылки).

Липосомы были успешно использованы с различными типами клеток, которые в норме резистентны к трансфекции другими методами, включая Т-клеточные суспензии, первичные культуры гепатоцитов и клетки PC 12 (Renneisen et al., 1990; Muller et al., 1990). Кроме того, липосомы не имеют ограничений по длине ДНК, которые обычны для систем доставки на основе вирусов. Липосомы были эффективно использованы для введения генов, лекарственных средств (Heath и Martin, 1986; Heath et al., 1986; Balazsovits et al., 1989; Fresta и Puglisi, 1996), радиотерапевтических агентов (Pikul et al., 1987), ферментов (Imaizumi et al., 1990a; Imaizumi et al., 1990b), вирусов (Faller и Baltimore, 1984), транскрипционных факторов и аллостерических эффекторов (Nicolau и Gersonde, 1979) в различные культивируемые клеточные линии и животных. Кроме того, завершено несколько успешных клинических испытаний, в которых исследована эффективность опосредованной липосомами лекарственной доставки (Lopez-Berestein et al., 1985a; 1985b; Coune, 1988; Sculier et al., 1988). Кроме того, некоторыми исследованиями доказано, что применение липосом не ассоциировано с аутоиммунными ответами, токсичностью или гонадной локализацией, как после системной доставки (Mori и Fukatsu, 1992).

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергируются в водной среде и самопроизвольно образуют мультислойные концентрические бислойные везикулы (также названные мультислойными везикулами (MLV)). Обычно MLV имеют диаметры от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию небольших унислойных везикул (SUV) с диаметрами в диапазоне 200-500 Å, содержащих водный раствор в сердцевине.

Липосомы имеют сходство с клеточными мембранами и предложены для применения согласно настоящему изобретению в качестве носителей для пептидных композиций. Они подходят для широкого применения, поскольку могут захватывать вещества, растворимые как в воде, так и в липидах, то есть в водных пространствах и внутри самого бислоя соответственно. Существует возможность использования липосом, несущих лекарственное средство, даже для сайт-специфической доставки активных агентов посредством селективной модификации липосомной композиции.

В дополнение к учению Couvreur et al. (1977; 1988) для получения липосомных композиций может быть использована следующая информация. При диспергировании в воде фосфолипиды могут образовывать ряд структур, отличающихся от липосом, в зависимости от молярного соотношения липида и воды. При низких соотношениях предпочтительной структурой является липосома. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов. Липосомы могут демонстрировать низкую проницаемость в отношении ионных и полярных веществ, но при повышенных температурах подвергаются фазовому переходу, который заметно изменяет их проницаемость. Фазовый переход включает изменение от плотно упакованной, упорядоченной структуры, известной как состояние геля, до слабо упакованной, менее упорядоченной структуры, известной как жидкое состояние. Это происходит при характеристической температуре фазового перехода и приводит к увеличению проницаемости в отношении ионов, сахаров и лекарственных средств.

Помимо температуры, экспозиция с белками может изменять проницаемость липосом. Некоторые растворимые белки, такие как цитохром с, связываются с двойным слоем, деформируют его и проникают через него, вызывая при этом изменения в проницаемости. Холестерин ингибирует это проникновение белков, очевидно посредством более плотной упаковки фосфолипидов. Считается, что наиболее полезные липосомные композиции для доставки антибиотиков и ингибиторов будут содержать холестерин.

Способность захватывать растворенные вещества варьирует у разных типов липосом. Например, MLV умеренно эффективны в отношении захвата растворенных веществ, а SUV в высшей степени неэффективны. SUV дают преимущество в гомогенности и воспроизводимости в распределении по размерам, однако, компромисс между размером и эффективностью захвата обеспечивается при использовании больших унислойных везикул (LUV). Их получают путём упаривания из эфира, и они в три-четыре раза более эффективны в отношении захвата растворенных веществ по сравнению с MLV.

В дополнение к липосомным характеристикам важной детерминантой в захвате соединений являются физико-химические свойства самого соединения. Полярные соединения захватываются в водных пространствах, а неполярные соединения связываются с липидным бислоем везикулы. Полярные соединения высвобождаются путем проникновения или при разрушении бислоя, а неполярные соединения

остаются соединенными с бислоем, пока он не разрушится под действием температуры или экспозиции с липопротеинами. Оба типа демонстрируют максимальные скорости истечения при температуре фазового перехода.

Липосомы взаимодействуют с клетками посредством четырех разных механизмов: эндоцитоза фагоцитарными клетками ретикулоэндотелиальной системы, такими как макрофаги и нейтрофилы; адсорбции на клеточной поверхности либо под действием неспецифических слабых гидрофобных или электростатических сил, либо путем специфических взаимодействий с компонентами клеточной поверхности; слияния с плазматической клеточной мембраной путем вставки липидного бислоя липосомы в плазматическую мембрану с одновременным высвобождением содержимого липосомы в цитоплазму; и путем переноса липосомных липидов в клеточные или субклеточные мембраны или наоборот без какой-либо ассоциации с содержимым липосом. Часто бывает трудно определить, какой механизм действует, и в одно и то же время может действовать более чем один механизм.

Судьба и место размещения внутривенно инъецируемых липосом зависит от их физических свойств, таких как размер, текучесть и поверхностный заряд. Они могут персистировать в тканях в течение часов или суток в зависимости от своего состава, а полупериоды существования в крови изменяются в диапазоне от минут до нескольких часов. Более крупные липосомы, такие как MLV и LUV, быстро захватываются фагоцитарными клетками ретикулоэндотелиальной системы, однако физиология системы кровообращения ограничивает выход таких больших разновидностей в большинство мест. Они могут выйти только в местах, где имеются большие отверстия или поры в эндотелии капилляров, таких как синусоидные капилляры печени или селезенки. Поэтому эти органы являются предпочтительным местом захвата. С другой стороны, SUV демонстрируют более широкое распределение в тканях, но накапливаются все же в высокой степени в печени и селезенке. Обычно такое поведение *in vivo* ограничивает возможную направленную доставку липосом только теми органами и тканями, которые доступны для их большого размера. Они включают кровь, печень, селезенку, спинной мозг и лимфоидные органы.

Вообще, направленная доставка не является ограничением в контексте настоящего изобретения. Однако при необходимости специфической направленной доставки должны быть выполнены способы, доступные для этой цели. Можно использовать антитела для связывания с поверхностью липосомы и для направления антитела и её лекарственных составляющих к специфическим антигенным рецепторам, расположенным на поверхности конкретного клеточного типа. Также можно использовать углеводные детерминанты (гликопротеиновые или гликолипидные компоненты клеточной поверхности, которые играют роль в межклеточном распознавании, взаимодействии и адгезии) в качестве сайтов узнавания, поскольку они обладают способностью направлять липосомы к конкретным типам клеток. В основном подразумевают, что будет использоваться внутривенная инъекция липосомных композиций, однако другие пути введения также возможны.

Альтернативно, согласно изобретению предложены фармацевтически приемлемые нанокапсулярные препараты композиций по настоящему изобретению. Обычно нанокапсулы могут захватывать соединения стабильным и воспроизводимым образом (Henry-Michelland et al., 1987; Quintanar-Guerrero et al., 1998; Douglas et al., 1987). Во избежание побочных эффектов, обусловленных внутриклеточной полимерной перегрузкой, необходимо конструировать такие ультрамелкие частицы (размером около 0,1 мкм) с использованием полимеров, способных разлагаться *in vivo*. Предполагается, что биоразлагаемые полиалкил-цианоакрилатные наночастицы, которые удовлетворяют этим требованиям, подходят для применения в настоящем изобретении. Такие частицы могут быть легко изготовлены, как описано (Couteur et al., 1980; 1988; zur Muhlen et al., 1998; Zambaux et al. 1998; Pinto-Alphandry et al., 1995; и патент США 5145684, конкретно включенные здесь во всей своей полноте посредством ссылки).

Для чрескожной доставки также могут быть использованы трансдермальные пластыри.

Иммуногенные композиции

В некоторых предпочтительных воплощениях настоящего изобретения предложены иммуногенные композиции. Обычно иммуногенные композиции будут содержать один или более полипептидов или полинуклеотидов, таких как описаны выше, в комбинации с иммуностимулятором. Иммуностимулятор может представлять собой любое вещество, которое усиливает или потенцирует иммунный ответ (антигеновый и/или клеточно-опосредованный) на экзогенный антиген. Примеры иммуностимуляторов включают адъюванты, биоразлагаемые микросферы (например, галактид полимера молочной кислоты) и липосомы (в которые включено соединение; см., например, Fullerton, патент США № 4235877).

Изготовление иммуногенных композиций в целом описано, например, в Powell & Newman, eds., Vaccine Design (субъединичный и адъювантный подход) (1995). Фармацевтические композиции и иммуногенные композиции, включенные в объем настоящего изобретения, также могут содержать другие соединения, которые могут быть биологически активными или неактивными. Например, в фармацевтической или иммуногенной композиции может присутствовать один или более чем один иммуногенный участок других антигенов *M. tuberculosis*, либо встроенных в слитый полипептид, либо в виде отдельного соединения.

Приведенные в качестве иллюстрации иммуногенные композиции могут содержать полинуклеотид (например, ДНК), кодирующий один или более полипептидов, которые описаны выше, так что полипеп-

тид образуется *in situ* (тем самым вызывая иммунный ответ). Как отмечено выше, ДНК может находиться в любой из множества систем доставки, известных средним специалистам в данной области, включая экспрессирующие системы на основе нуклеиновых кислот, бактериальные и вирусные экспрессирующие системы. Многочисленные методы генной доставки общеизвестны в данной области, как например, описанные в Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 15: 143-198 (1998) и приведенных там ссылок. Соответствующие экспрессирующие системы на основе нуклеиновых кислот содержат необходимые последовательности ДНК для экспрессии у пациента (такие как подходящий промотор и сигнал терминации). Бактериальные системы доставки включают введение бактериальной клетки-хозяина (например, штамм *Mycobacterium*, *Bacillus* или *Lactobacillus*, включая бациллу Кальметта-Герена (*Bacillus-Calmette-Guerrin*) или *Lactococcus lactis*), которая экспрессирует полипептид (например, на своей клеточной поверхности или секретирует данный полипептид) (см., например, Ferreira, et al., An. Acad. Bras. Cienc. (2005) 77: 113-124; и Raha, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2005) PubMed ID 15635459). В предпочтительном воплощении ДНК может быть введена с использованием вирусной экспрессирующей системы (например, вируса коревой оспы или другого поксвируса, ретровируса или аденовируса), которая может включать применение непатогенного (дефектного), компетентного по репликации вируса. Подходящие системы раскрыты, например, в Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 317-321 (1989); Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 569: 86-103 (1989); Flexner et al., Vaccine, 8: 17-21 (1990); патентах США №№ 4603112, 4769330 и 5017487; WO 89/01973; патенте США № 4777127; GB 2200651; EP 0345242; WO 91/02805; Berkner, Biotechniques, 6: 616-627 (1988); Rosenfeld et al., Science, 252: 431-434 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 215-219 (1994); Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11498-11502 (1993); Guzman et al., Circulation, 88: 2838-2848 (1993) и Guzman et al., Cir. Res., 73: 1202-1207 (1993). Методы включения ДНК в такие экспрессирующие системы хорошо известны средним специалистам в данной области техники. ДНК также может быть "голой", как описано, например, в Ulmer et al., Science, 259: 1745-1749 (1993) и рассмотрено в обзоре Cohen, Science, 259: 1691-1692 (1993). Захват голый ДНК может быть увеличен путем нанесения покрытия ДНК на биоразлагаемые гранулы, которые эффективно транспортируются в клетки. Очевидно, что иммуногенная композиция может содержать и полинуклеотидный и полипептидный компонент. Такая иммуногенная композиция может обеспечивать повышенный иммунный ответ.

Очевидно, что иммуногенная композиция может содержать фармацевтически приемлемые соли полинуклеотидов и полипептидов, предложенных здесь. Такие соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых нетоксичных оснований, включая органические основания (например, соли первичных, вторичных и третичных аминов и основных аминокислот) и неорганические основания (например, натриевые, калиевые, литиевые, аммониевые, кальциевые и магниевые соли).

Поскольку в иммуногенных композициях по данному изобретению может быть использован любой подходящий носитель, известный средним специалистам в данной области, тип носителя будет варьировать в зависимости от способа введения. Композиции по настоящему изобретению могут быть изготовлены для любого подходящего способа введения, включая, например, местное, пероральное, назальное, внутривенное, интратрахеальное, интраперитонеальное, подкожное или внутримышечное введение. Для парентерального введения, такого как подкожная инъекция, носитель предпочтительно содержит воду, физиологический раствор, спирт, жир, воск или буфер. Для перорального введения могут быть использованы любые из приведенных выше носителей или твердый носитель, такой как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлоза, глюкоза, сахароза и карбонат магния. Биоразлагаемые микросферы (например, полилактат-полигликолят) также могут быть использованы в качестве носителей для фармацевтических композиций по данному изобретению. Подходящие биоразлагаемые микросферы раскрыты, например, в патентах США №№ 4897268, 5075109, 5928647, 5811128, 5820883, 5853763, 5814344 и 5942252. Также может быть использован носитель, содержащий комплексы частиц с белками, описанные в патенте США № 5928647, которые способны индуцировать ограниченные классом I ответы цитотоксических Т-лимфоцитов у хозяина.

Такие композиции также могут содержать буферы (например, нейтральный забуференный физиологический раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор), углеводы (например, глюкозу, маннозу, сахарозу или декстраны), маннит, белки, полипептиды или аминокислоты, такие как глицин, антиоксиданты, бактериостатические вещества, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или глутатион, адъюванты (например, гидроксид алюминия), растворенные вещества, которые делают композицию изотонической, гипотонической или слабо гипертонической относительно крови реципиента, суспендирующие агенты, загустители и/или консерванты. Альтернативно, композиции по настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде лиофилизата. Соединения также могут быть инкапсулированы в липосомы с использованием хорошо известной технологии.

Любой из различных иммуностимуляторов может быть использован в иммуногенных композициях по данному изобретению. Например, может быть включен адъювант. Большинство адъювантов содержат вещество, предназначенное для защиты антигена от быстрого катаболизма, такое как гидроксид алюминия или минеральное масло, и стимулятор иммунных ответов, такой как липид А, *Bordetella pertussis* или виды *Mycobacterium* или белки, происходящие из *Mycobacterium*. Например, может быть использован

делипидизированный, дегликолипидизированный *M. vaccae* ("pVac"). Подходящие адъюванты имеются в продаже, например, неполный адъювант и полный адъювант Фрейнда (Difco Laboratories, Detroit, MI); адъювант 65 от Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS01B, AS02A, AS15, AS-2 и их производные (GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA); CWS (остов клеточной стенки из туберкулезной бациллы), TDM (дикориниомиколат трегалозы), Leif (фактор инициации элонгации лейшманий), соли алюминия, такие как гель гидроксида алюминия (квасцы) или фосфат алюминия; соли кальция, железа или цинка; нерастворимая суспензия ацилированного тирозина; ацилированные сахара; катионные или анионные производные полисахаридов; полифосфазены; биоразлагаемые микросферы; монофосфориллипид А (MPL®); и quil A (например, QS-21). В качестве адъювантов также могут быть использованы цитокины, такие как GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) или интерлейкин-2, -7 или -12.

Термин "адъювант" относится к компонентам в вакцинной или терапевтической композиции, которые повышают специфический иммунный ответ на антиген (см., например, Edelman, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8: 1409-1411 (1992)). Адъюванты индуцируют иммунные ответы Th1-типа и Th2-типа. Цитокины Th1-типа (например, IFN- γ , IL-2 и IL-12) имеют тенденцию благоприятно влиять на индукцию клеточно-опосредованного иммунного ответа на вводимый антиген, тогда как цитокины Th2-типа (например, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10) имеют тенденцию благоприятно влиять на индукцию гуморальных иммунных ответов. Адъюванты, способные к предпочтительной стимуляции Th-1 клеточно-опосредованного иммунного ответа, описаны в WO 94/00153 и WO 95/17209.

В иммуногенных композициях, предложенных здесь, адъювантная композиция предпочтительно сконструирована для индукции иммунного ответа преимущественно Th1-типа. После применения иммуногенной композиции как предложено здесь, пациент обычно будет поддерживать иммунный ответ, который включает ответы Th1- и Th2-типов. В предпочтительном воплощении, когда ответ представляет собой преимущественно ответ Th1-типа, уровень цитокинов Th1-типа будет повышаться в большей степени, чем уровень цитокинов Th2-типа. Уровни этих цитокинов можно легко оценить с использованием стандартных методов анализа. Для обзора семейств цитокинов см. Janeway, et al., *Immunobiology*, 5-е издание, 2001.

Композиции на основе Rv1753c обычно содержат один или более чем один адъювант, например, AS01B (3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL®) и QS21 в липосомной композиции; см. публикацию патента США № 2003/0143240); AS02A (3D-MPL® и QS21 и эмульсию типа масло-в-воде; см. Bojang, et al., *Lancet* (2001) 358: 1927); ENHANZYN® (Detox); 3D-MPL®; сапонины, в том числе Quil A и его компоненты, например QS21 и миметики сапонинов; CWS (остов клеточной стенки из туберкулезной бациллы), TDM (дикориниомиколат трегалозы), аминокилглюкозаминид-4-фосфаты (AGP); иммуностимулирующие олигонуклеотиды, например CPG; Leif (фактор инициации элонгации лейшманий); и их производные. В предпочтительном воплощении полипептид Rv1753c вводят с одним или более чем одним адъювантом, выбранным из группы, состоящей из 3D-MPL® и QS21 в липосомной композиции, например, AS01B, и 3D-MPL® и QS21 и эмульсии типа масло-в-воде (например, AS02A). Адъювантные системы AS01B и AS02A также описаны в Pichyangkul, et al., *Vaccine* (2004) 22: 3831-40.

Если доставку антигена Rv1753c осуществляют в виде нуклеиновой кислоты, то он может быть доставлен, например, в вирусном векторе (то есть, аденовирусном векторе) или в мутантной бактериальной клетке-хозяине (то есть, мутантной, авирулентной клетке-хозяине *Mycobacterium*, *Lactobacillus* или *Bacillus*, включая бациллу Кальметта-Герена (БЦЖ) и *Lactococcus lactis*).

Предпочтительные адъюванты для применения с целью индукции преимущественно ответа Th1-типа включают, например, комбинацию монофосфориллипид А (MPL®), предпочтительно 3-О-деацилированного монофосфориллипид А (3D-MPL®), возможно с солью алюминия (см., например, Ribb, et al., 1986, *Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, pp. 407-419; GB 2122204B; GB 2220211; и патент США 4912094). Предпочтительная форма 3D-MPL® находится в виде эмульсии, имеющей небольшой размер частиц, менее 0,2 мкм в диаметре, и способы ее изготовления раскрыты в WO 94/21292. Водные композиции, содержащие монофосфориллипид А и поверхностно-активное вещество, были описаны в WO 98/43670. Типичные предпочтительные адъюванты включают AS01B (MPL® и QS21 в липосомной композиции), 3D-MPL® и QS21 в липосомной композиции, AS02A (MPL® и QS21 и эмульсию типа масло-в-воде), 3D-MPL® и QS21 и эмульсию типа масло-в-воде, и AS15, доступные от GlaxoSmithKline. Адъюванты на основе MPL® доступны от GlaxoSmithKline (см. патенты США №№ 4436727, 4877611, 4866034 и 4912094).

СрG-содержащие олигонуклеотиды (в которых динуклеотид СрG не метилирован) также индуцируют преимущественно Th1-ответ. СрG представляет собой аббревиатуру для цитозин-гуанозинового динуклеотидных мотивов, присутствующих в ДНК. Такие олигонуклеотиды хорошо известны и описаны, например, в WO 96/02555, WO 99/33488 и патентах США №№ 6008200 и 5856462. Иммуностимуляторные последовательности ДНК также описаны, например, в Sato et al., *Science*, 273: 352 (1996). СрG, когда он приготовлен в виде иммуногенных композиций, обычно вводят в свободном виде в растворе вместе со свободным антигеном (WO 96/02555; McCluskie and Davis, выше), или ковалентно конъюгируют

ванным с антигеном (WO 98/16247), или приготовлен в виде препарата с носителем, таким как гидроксид алюминия ((поверхностный антиген вируса гепатита) Davis et al., выше; Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(26), 15553-8). CpG известен в данной области как адъювант, который можно вводить как системно, так и через слизистую оболочку (WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., J. Immunol, 1998, 160(2): 870-876; McCluskie and Davis, J. Immunol., 1998, 161(9): 4463-6).

Другим предпочтительным адъювантом является сапонин или миметики либо производные сапонины, такие как Quil A, предпочтительно QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), которые могут быть использованы по отдельности или в комбинации с другими адъювантами. Например, усиленная система включает комбинацию монофосфориллипида A (MPL®) и производного сапонины, такую как комбинация QS21 и 3D-MPL®, как описано в WO 94/00153, или менее реактогенную композицию, где QS21 погашен холестерином, как описано в WO 96/33739. Другие предпочтительные композиции содержат эмульсию типа масло-в-воде и токоферол. Особенно сильнодействующая адъювантная композиция, включающая QS21, 3D-MPL® и токоферол в эмульсии типа масло-в-воде, описана в WO 95/17210. Дополнительные сапониновые адъюванты для применения в настоящем изобретении включают QS7 (описанный в WO 96/33739 и WO 96/11711) и QS17 (описанный в патенте США № 5057540 и EP 0362279 B1).

Альтернативно, сапониновые композиции могут быть скомбинированы с наполнителями для вакцин, в состав которых входит хитозан или другие поликатионные полимеры, частицы полилактида и сополимера полилактид-со-гликолид, полимерная матрица на основе поли-N-ацетилглюкозамина, частицы, составленные из полисахаридов или химически модифицированных полисахаридов, липосомы и частицы на основе липидов, частицы, составленные из сложных моноэфиров глицерина и так далее. Сапонины также могут быть приготовлены в присутствии холестерина с образованием дисперсных структур, таких как липосомы или ISCOM®. Более того, сапонины могут быть приготовлены вместе с простым или сложным эфиром полиоксиэтилена, либо в растворе, не содержащем частиц, либо в суспензии или в дисперсной структуре, такой как олиголамеллярная (рауциламелар) липосома или ISCOM® (иммуностимулирующий комплекс). Сапонины также могут быть приготовлены в виде препарата с такими эксципиентами как CARBOPOL®, для увеличения вязкости, или могут быть приготовлены в сухой порошковой форме с порошковым эксципиентом, таким как лактоза.

В одном воплощении адъювантная система включает комбинацию монофосфориллипида A и производного сапонины, такую как комбинация QS21 и адъюванта 3D-MPL®, которая описана в WO 94/00153, или менее реактогенную композицию, где QS21 погашен холестерином-содержащими липосомами, как описано в WO 96/33739. Другие подходящие композиции содержат эмульсию типа масло-в-воде и токоферол. Другая подходящая адъювантная композиция, в которой используют QS21, адъювант 3D-MPL® и токоферол в эмульсии типа масло-в-воде, описана в WO 95/17210.

Другая усиленная адъювантная система включает комбинацию CpG-содержащего олигонуклеотида и производного сапонины, в частности комбинацию CpG и QS21 как раскрыто в WO 00/09159. Удобно, когда композиция дополнительно содержит эмульсию типа масло-в-воде и токоферол.

Другие предпочтительные адъюванты включают MONTANIDE® ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS® (CSL), MF-59 (Chiron), адъюванты серии SBAS (SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium), Detox (Corixa), RC-529 (Corixa) и другие аминоксилглюкозаминид-4-фосфаты (AGP), как например, описанные в находящихся на рассмотрении заявках на патент США №№ 08/853826 и 09/074720, описания которых включены здесь во всей своей полноте посредством ссылки, и адъюванты на основе простого эфира полиоксиэтилена, как, например, описанные в WO 99/52549A1. В настоящее время SmithKline Beecham и Corixa Corporation входят в GlaxoSmithKline.

Другие подходящие адъюванты включают молекулы адъюванта общей формулы (I):



где n равно 1-50, A представляет собой связь или -C(O)-, R представляет собой C₁₋₅₀алкил или фенил-C₁₋₅₀алкил.

Другим представляющим интерес адъювантом является b-цепь шига-токсина, использованная, например, как описано в WO 2005/112991.

В одном воплощении настоящего изобретения представлена иммуногенная композиция, содержащая полиоксиэтиленовый простой эфир общей формулы (I), где n равен 1-50, предпочтительно 4-24, наиболее предпочтительно 9; компонент R представляет собой C₁₋₅₀, предпочтительно C₄-C₂₀алкил и наиболее предпочтительно C₁₂алкил, и A представляет собой связь. Концентрация полиоксиэтиленовых простых эфиров должна быть в диапазоне 0,1-20%, предпочтительно 0,1-10% и наиболее предпочтительно в диапазоне 0,1-1%. Предпочтительные полиоксиэтиленовые простые эфиры выбраны из следующей группы: полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-9-стеариловый эфир, полиоксиэтилен-8-стеариловый эфир, полиоксиэтилен-4-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-35-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-23-лауриловый эфир. Полиоксиэтиленовые простые эфиры, как например, полиоксиэтилен-лауриловый эфир, описаны в Merck index (Справочник именных реакций в органической химии) (12-е издание: запись 7717). Эти адъювантные молекулы описаны в WO 99/52549.

Любая иммуногенная композиция, предложенная здесь, может быть изготовлена с использованием хорошо известных способов, которые приводят к получению комбинации антигена, усилителя иммунного ответа и подходящего носителя или эксципиента. Композиции, изложенные здесь, могут быть введены в виде части препарата с непрерывным высвобождением (т.е. такого препарата, как капсула, губка или гель (состоящие, например, из полисахаридов), который обеспечивает медленное высвобождение соединения после введения). Как правило, такие препараты можно изготовить, используя хорошо известную технологию (см., например, Coombes et al., Vaccine, 14: 1429-1438 (1996)), и вводить, например, перорально, ректально или подкожной имплантацией либо путем имплантации в желаемое целевое место. Композиции с непрерывным высвобождением могут содержать полипептид, полинуклеотид или антитело, распределенные в матрикс-носителе и/или содержащиеся в резервуаре, окруженном мембраной, контролирующей скорость высвобождения.

Носители для применения в таких композициях являются биологически совместимыми и также могут быть биоразлагаемыми; предпочтительно композиция обеспечивает относительно постоянный уровень высвобождения активных компонентов. Такие носители включают микрочастицы из сополимера поли(лактид-со-гликолид), полиакрилата, латекса, крахмала, целлюлозы, декстрана и тому подобного. Другие носители замедленного высвобождения включают надмолекулярные биовекторы, которые содержат нежидкое гидрофильное ядро (например, поперечно-сшитый полисахарид или олигосахарид) и, возможно, внешний слой, содержащий амфифильное соединение, такое как фосфолипид (см., например, патент США № 5151254 и заявки PCT WO 94/20078, WO 94/23701 и WO 96/06638). Количество активного соединения, содержащегося в препарате с непрерывным высвобождением, зависит от места имплантации, скорости и ожидаемой продолжительности высвобождения.

Любое из множества средств доставки можно использовать в фармацевтических композициях и иммуногенных композициях для того, чтобы облегчить получение антиген-специфического иммунного ответа. Средства доставки включают антигенпредставляющие клетки (APC), такие как дендритные клетки, макрофаги, В-клетки, моноциты и другие клетки, которые могут быть использованы для конструирования эффективных APC. Такие клетки могут быть, но не обязательно, генетически модифицированными для увеличения способности презентировать антиген, для улучшения активации и/или поддержания Т-клеточного ответа и/или чтобы быть иммунологически совместимыми с получателем (то есть соответствовать HLA гаплотипу). APC обычно могут быть выделены из любых различных биологических жидкостей и органов и могут представлять собой аутологические, аллогенные, сингенные или ксеногенные клетки.

В некоторых предпочтительных воплощениях настоящего изобретения в качестве антигенпредставляющих клеток используют дендритные клетки или их клетки-предшественники. Дендритные клетки являются высоко эффективными APC (Banchereau & Steinman, Nature, 392: 245-251 (1998)), и показано, что они эффективны в качестве физиологического адьюванта для индукции профилактического или терапевтического иммунитета (см. Timmerman & Levy, Ann. Rev. Med., 50: 507-529 (1999)). Обычно дендритные клетки можно идентифицировать на основании их типичной формы (звездообразной *in situ*, с заметными цитоплазматическими отростками (дендритами), видимыми *in vitro*), их способности захватывать, процессировать и представлять антигены с высокой эффективностью и их способности активировать ответы наивных Т-клеток. Несомненно, дендритные клетки могут быть сконструированы для экспрессии специфических рецепторов или лигандов клеточной поверхности, которые обычно не обнаруживаются на дендритных клетках *in vivo* или *ex vivo*, и такие модифицированные дендритные клетки предложены в настоящем изобретении. В качестве альтернативы дендритным клеткам в иммуногенной композиции могут быть использованы секретлируемые везикулы нагруженных антигеном дендритных клеток (называемые экзосомами) (см. Zitvogel et al., Nature Med., 4: 594-600 (1998)).

Дендритные клетки и их клетки-предшественники могут быть получены из периферической крови, спинного мозга, лимфатических узлов, селезенки, кожи, пуповинной крови или любой другой подходящей ткани или жидкости. Например, дендритные клетки могут быть дифференцированы *ex vivo* путем добавления комбинации цитокинов, таких как GM-CSF, IL-4, IL-13 и/или TNF α , к культурам моноцитов, полученных из периферической крови. Альтернативно, CD34-позитивные клетки, собранные из периферической крови, пуповинной крови или спинного мозга, могут быть дифференцированы в дендритные клетки путем добавления к культуральной среде комбинаций GM-CSF, IL-3, TNF α , лиганда CD40, LPS (липополисахарид), лиганда flt3 и/или другого(их) соединения(ий), которые индуцируют дифференцировку, созревание и пролиферацию дендритных клеток.

Дендритные клетки удобно разделить на такие категории, как "незрелые" и "зрелые" клетки, что позволяет просто различать два хорошо охарактеризованных фенотипа. Однако эту номенклатуру не следует толковать как исключающую все возможные промежуточные стадии дифференцировки. Незрелые дендритные клетки характеризуются как APC с высокой эффективностью к захвату и процессингу антигенов, что коррелирует с высоким уровнем экспрессии Fc γ -рецептора и маннозного рецептора. Зрелый фенотип обычно характеризуется низким уровнем экспрессии этих маркеров, но высоким уровнем экспрессии молекул клеточной поверхности, ответственных за активацию Т-клеток, таких как молекулы

класса I и класса II MHC (главного комплекса гистосовместимости), молекулы адгезии (например, CD54 и CD11) и костимуляторные молекулы (например, CD40, CD80, CD86 и 4-1BB).

Обычно APC могут быть трансфицированы полинуклеотидом, кодирующим белок (или его участок или другой вариант), так что полипептид экспрессируется на клеточной поверхности. Такая трансфекция может иметь место *ex vivo*, и фармацевтическая композиция или иммуногенная композиция, содержащие такие трансфицированные клетки, затем могут быть использованы, как изложено здесь. Альтернативно, пациенту может быть введено средство для доставки гена, нацеленное на дендритную или другую антигенпредставляющую клетку, что приводит к трансфекции, которая имеет место *in vivo*. Трансфекция дендритных клеток *in vivo* и *ex vivo* обычно может быть, например, осуществлена с использованием любых способов, известных в данной области, таких как описанные в WO 97/24447, или подхода с применением "генной пушки", описанного в Mahvi et al., *Immunology and Cell Biology*, 75: 456-460 (1997). Загрузки дендритных клеток антигенами можно добиться посредством инкубации дендритных клеток или клеток-предшественников с полипептидом, ДНК (голой или в составе плазмидного вектора) или РНК; либо с антиген-экспрессирующими рекомбинантными бактериями или вирусами (например, векторами на основе вируса коровьей оспы, вируса птичьей оспы, аденовируса или лентивируса). Перед загрузкой полипептид может быть ковалентно конъюгирован с иммунологическим партнером, который обеспечивает помощь Т-клеток (например, с молекулой-носителем). Альтернативно, дендритную клетку можно подвергнуть импульсному воздействию неконъюгированного иммунологического партнера, отдельно или в присутствии полипептида.

Иммуногенные композиции и фармацевтические композиции могут быть представлены в однодозовых или многодозовых контейнерах, таких как запаянные ампулы или герметично укупоренные флаконы. Такие контейнеры предпочтительно герметично укупорены для сохранения стерильности композиции вплоть до применения. Как правило, композиции можно хранить в виде суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных наполнителях. Альтернативно, иммуногенную композицию или фармацевтическую композицию можно хранить в лиофилизированном состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя непосредственно перед применением.

В некоторых воплощениях за "примированием" или первым введением полипептида Rv1753c (включая варианты, иммуногенные фрагменты или слитые белки) или полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид, следует одна или более "бустер-иммунизаций" или последующих введений полипептида Rv1753c (включая варианты, иммуногенные фрагменты или слитые белки) или полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид (способ "примирования и бустер-иммунизации"). Например, за первым введением полипептида Rv1753c (включая варианты, иммуногенные фрагменты или слитые белки) или полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид, следуют одно или более чем одно последующее введение полипептида Rv1753c (включая варианты, иммуногенные фрагменты или слитые белки) или полинуклеотида, кодирующего указанный полипептид.

В одном воплощении за первым введением полипептида Rv1753c или кодирующего его полинуклеотида следует одно или более чем одно последующее введение полипептида Rv1753c. В одном воплощении за первым введением полипептида Rv1753c или кодирующего его полинуклеотида следует одно или более чем одно последующее введение полинуклеотида, кодирующего Rv1753c. Обычно первое или "примировующее" введение и второе или "бустинг"-введение выполняют с интервалом приблизительно 2-12 недель или с интервалом вплоть до 4-6 месяцев. Последующие "бустер"-введения выполняют с интервалом примерно 6 месяцев или с интервалом 1, 2, 3, 4 или 5 лет. Традиционная бустинг-обработка (например, примировующее введение белка с последующим бустинг-введением белка) также может быть полезна в предупреждении или лечении туберкулеза (например, в предупреждении или лечении латентного туберкулеза, в частности предупреждении или замедлении реактивации туберкулеза).

Антитела

"Антитело" относится к полипептиду, содержащему каркасную область, кодируемую иммуноглобулиновым геном, или ее фрагменты, который специфически связывает и распознает антиген. Известные иммуноглобулиновые гены включают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также несчетное количество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируют как либо каппа, либо лямбда. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые в свою очередь определяют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно.

Типичная структурная единица иммуноглобулина (антитела) представляет собой тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменную область приблизительно из 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена. Термины "переменная легкая цепь (V_L)" и "переменная тяжелая цепь (V_H)" относятся соответственно к этим легким и тяжелым цепям.

Антитела существуют, например, в виде интактных иммуноглобулинов или в виде множества хорошо охарактеризованных фрагментов, полученных в результате расщепления различными пептидазами. Так, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с получе-

нием $F(ab')_2$, димера Fab, который сам по себе представляет собой легкую цепь, соединенную с V_H - C_H1 посредством дисульфидной связи. $F(ab')_2$ можно восстановить в мягких условиях с разрывом дисульфидной связи в шарнирной области, превращая при этом димер $F(ab')_2$ в мономер Fab'. Мономер Fab', по существу, представляет собой Fab с частью шарнирной области (см. *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3-е изд. 1993)). Несмотря на то что различные фрагменты антитела определяют в терминах расщепления интактного антитела, специалисту будет очевидно, что такие фрагменты можно синтезировать *de novo* или химически, или с использованием методологии рекомбинантной ДНК. Таким образом, термин "антитело", как он использован здесь, также включает в себя фрагменты антител, либо полученные в результате модификации целых антител, либо синтезированные *de novo* с использованием методологии рекомбинантной ДНК (например, одноцепочечный фрагмент Fv), либо идентифицированные с использованием библиотек фагового дисплея (см., например, McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554(1990)).

Для получения моноклональных или поликлональных антител можно использовать любой известный в данной области метод (см., например, Kohler & Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today*, 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 в *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)). Методы получения одноцепочечных антител (патент США 4946778) могут быть адаптированы для получения антител к полипептидам по данному изобретению. Кроме того, для экспрессии гуманизированных антител могут быть использованы трансгенные мыши или другие организмы, например, другие млекопитающие. Альтернативно, для идентификации антител и гетеромерных Fab-фрагментов, которые специфически связывают выбранные антигены, может быть использована технология фагового дисплея (см., например, McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990); Marks et al., *Biotechnology*, 10: 779-783 (1992)).

Фраза "специфически (или селективно) связывается" с антителом или "специфически (или селективно) иммунореактивен в отношении", когда касается белка или пептида, относится к реакции связывания, которая определяет присутствие белка в гетерогенной популяции белков и других биологических молекул. Таким образом, в разработанных условиях иммуноанализа специфические антитела связываются с конкретным белком по меньшей мере в два раза большем количестве по сравнению с фоном и, по существу, не связываются в значительном количестве с другими белками, присутствующими в образце. Для специфического связывания с антителом в таких условиях может потребоваться антитело, отобранное по его специфичности к конкретному белку. Например, среди поликлональных антител, индуцированных в ответ на слитые белки, можно отобрать только те поликлональные антитела, которые специфически иммунореактивны в отношении слитого белка, а не в отношении индивидуальных компонентов слитых белков. Этот отбор может быть осуществлен путем исключения антител, дающих перекрестную реакцию с индивидуальными антигенами. Для отбора антител, специфически иммунореактивных в отношении конкретного белка, можно использовать ряд иммунологических форматов. Например, для отбора антител, специфически иммунореактивных в отношении белка, обычно используют твердофазные ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) иммуноанализы (см., например, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) и *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (1998) для описания иммуноаналитических форматов и условий, которые могут быть использованы для определения специфической иммунореактивности). Обычно специфическое или селективное взаимодействие должно по меньшей мере в два раза превышать фоновый сигнал или шум и в более типичных случаях превышать фон больше чем в 10, 20 или 100 раз (например, связывание с другими микобактериальными белками, такими как другие белки *Mycobacterium tuberculosis*).

Диагностические средства

В другом аспекте согласно данному изобретению предложены способы применения одного или более чем одного из полипептидов, описанных выше, для диагностики туберкулеза (например, с использованием основанных на Т-клеточном ответе анализов или основанных на применении антител анализов традиционного формата).

Например, предложен способ определения предшествующей инфекции *M. tuberculosis* у индивидуума, включающий:

- (а) получение образца от данного индивидуума;
- (б) приведение указанного образца в контакт с выделенным полипептидом, содержащим:
 - (1) последовательность белка Rv1753c;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c; или
 - (3) иммуногенный фрагмент последовательности белка Rv1753c;
- (в) количественное определение ответа образца.

Образец, может представлять собой, например, цельную кровь или очищенные клетки. Удобно, если образец будет содержать мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС). В одном воплощении изобретения индивидуум будет серопозитивным. Во втором воплощении изобретения индивидуум будет серонегативным.

Удобно, если индивидуум не будет являться предварительно вакцинированным против инфекции, вызываемой *M. tuberculosis* (например, удобно, если индивидуум не будет являться предварительно вакцинированным БЦЖ).

Ответ образца можно количественно измерить целым рядом способов, известных специалистам в

данной области, включая мониторинг пролиферации лимфоцитов или продуцирование специфических цитокинов или антител. Например, ELISPOT (иммуоферментный спот-анализ) Т-клеток можно использовать для мониторинга таких цитокинов, как интерферон-гамма (IFN γ), интерлейкин 2 (IL2) и интерлейкин 5 (IL5). ELLISPOT-анализ В-клеток можно использовать для мониторинга стимуляции специфических антигенов *M. tuberculosis*. Клеточный ответ также можно охарактеризовать, применяя внутри- и внеклеточное окрашивание и анализ на проточном цитометре.

Способы количественного определения пролиферативного ответа образца включают:

(1) импульсную обработку культивированных клеток радиоактивной меткой (например, меченным тритием тимидином) и мониторинг захвата трития (например, с использованием газового сцинтилляционного счетчика);

(2) мечение сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеин-диацетата (CFSE) и мониторинг клеточного деления по флуоресценции с использованием проточной цитометрии.

Количественное определение цитокинового ответа образца включает, в частности, мониторинг продуцирования гамма-интерферона.

При использовании таких способов количественного определения положительный ответ на антиген может быть определен по соотношению сигнала и шума (соотношение S/N), составляющему по меньшей мере 2:1 (например, по меньшей мере 3:1 или по меньшей мере 5:1).

В другом аспекте настоящего изобретения предложены способы диагностики инфекции, вызываемой *M. tuberculosis*, с использованием кожной пробы. Термин "кожная проба", как он использован здесь, представляет собой любой анализ, проведенный непосредственно на пациенте, в котором измеряют реакцию гиперчувствительности замедленного типа (DTH) (как например, набухание, покраснение или дерматит) после внутрикожной инъекции полипептида Rv153c как описано выше (или его варианта, иммуногенных фрагментов или нуклеотидов, кодирующих их). Такую инъекцию можно осуществить, используя любое подходящее устройство, обеспечивающее приведение в контакт антигенной комбинации с клетками кожи пациента, такое как туберкулиновый шприц или шприц на 1 мл. Реакцию измеряют по окончании периода времени, например, по меньшей мере 48 ч после инъекции, в частности, 48-72 ч.

Реакция DTH представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ, который оказывается более сильным у пациентов, которые ранее подвергались воздействию тестируемого антигена. Такой ответ можно измерить визуально, используя линейку. В общем случае, ответ, превышающий примерно 0,5 см в диаметре, особенно превышающий примерно 1,0 см в диаметре, представляет собой положительный ответ, указывая на наличие предшествующей инфекции *M. tuberculosis*, что может проявляться или может не проявляться в форме активного заболевания.

Для применения в кожной пробе удобно, если компонент Rv1753c изготовлен в виде фармацевтической композиции, содержащей физиологически приемлемый носитель. Соответственно носителем, используемым в таких фармацевтических композициях, является физиологический раствор с соответствующими консервантами, такими как фенол и/или Tween 80TM.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложены наборы для применения в любом из вышеупомянутых диагностических способов. Такие наборы обычно содержат два или более чем два компонента, необходимых для проведения диагностического анализа. Такими компонентами могут быть соединения, реагенты, контейнеры и/или оборудование.

Например, один контейнер в наборе может содержать моноклональное антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с белком. Такие антитела или фрагменты могут быть предложены присоединенными к веществу-носителю, как описано выше. Один или более дополнительных контейнеров могут содержать в себе элементы, такие как реагенты или буферы, для использования в анализе. Такие наборы могут также, или альтернативно, содержать детектирующий реагент как описано выше, который содержит репортерную группу, подходящую для прямой или непрямой детекции связывания антител.

Альтернативно, набор может быть разработан для детекции уровня мРНК, кодирующей белок в биологическом образце. Такие наборы обычно содержат по меньшей мере один олигонуклеотидный зонд или праймер, как описано выше, который гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим белок. Такой олигонуклеотид можно использовать, например, в анализе с использованием ПЦР или гибридизационном анализе. Дополнительные компоненты, которые могут присутствовать в таких наборах, включают второй олигонуклеотид и/или диагностический реагент или контейнер для облегчения детекции полинуклеотида, кодирующего белок по изобретению.

Другие диагностические наборы включают наборы, разработанные для детекции клеточно-опосредованных ответов (которые, например, могут быть использованы в диагностических способах по настоящему изобретению). Такие наборы обычно содержат:

(1) устройство для получения соответствующего образца клеток от субъекта;

(2) средства для стимуляции указанного образца клеток полипептидом Rv1753c (или его вариантом, его иммуногенными фрагментами или ДНК, кодирующей такие полипептиды);

(3) средства для детекции или количественного определения клеточного ответа на стимуляцию.

Подходящие средства для количественного определения клеточного ответа включают набор для ELISPOT-анализа В-клеток или альтернативно набор для ELISPOT-анализа Т-клеток, которые известны специалистам в данной области техники.

Один возможный набор содержит:

- (а) полипептид по изобретению и
- (б) детектирующий реагент, подходящий для прямой или непрямой детекции связывания с антителом.

Особый интерес представляют диагностические наборы, специально разработанные для количественного определения Т-клеточных ответов: Диагностический набор, содержащий:

- (а) полипептид по изобретению и
- (б) устройство, обеспечивающее приведение указанного полипептида в контакт с клетками кожи индивидуума;

Диагностический набор, содержащий:

- (а) полипептид по изобретению,
- (б) устройство, обеспечивающее приведение указанного полипептида в контакт с образцом (например, с цельной кровью или более удобно с РВМС), взятым у индивидуума, и
- (в) средства для количественного определения Т-клеточного ответа (например, пролиферации или продукции IFN-гамма).

Примеры

Следующие примеры предложены лишь с целью иллюстрации и не являются ограничивающими. Специалисты в данной области техники без труда найдут разнообразные некритические параметры, которые могут быть изменены или модифицированы с получением, по существу, аналогичных результатов.

Пример 1. Идентификация Rv1753c в качестве мишени для вакцины против латентного ТВ.

Ген Rv1753c, также известного как PPE24, кодирует белок, являющийся членом PPE-семейства *Mycobacterium tuberculosis* Gly-, Asn-богатых белков.

Rv1753c был выбран на основании полногеномного анализа генов *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с поддержанием стадии покоя и инфекционности, как описано в Murphy and Brown, BMC. Infect. Dis., 2007, 7: 84-99. Возможные гены-мишени стадии покоя у *Mycobacterium tuberculosis* были ранжированы в результате проведения биоинформационного мета-анализа опубликованных наборов данных, полученных с использованием полногеномного анализа ДНК на микрочипах, по экспрессии бактериальных генов в искусственно созданных условиях покоя. Далее, для всего генома была проведена субклеточная локализация кодируемых генами белков *M. tuberculosis* для идентификации мишеней вакцины.

Вкратце, экспериментальные условия в моделях покоя были весьма разнообразны, поэтому была разработана система оценки баллов от нуля до пяти для нормирования этих данных на основе двух критериев: 1) соответствия экспериментальных условий состоянию покоя и 2) рангового порядка экспрессии. Максимальный балл для конкретного экспериментального набора данных устанавливался на основании возможного соответствия клинической встречаемости фазы покоя инфекции *M. tuberculosis*. В табл. 1 показаны наборы данных, собранных для этапа 1, вместе с установленным максимальным баллом для каждого набора данных. Дополнительные наборы данных по значимости генов для роста получали из опубликованных исследований, в которых применялись эксперименты по нокауту генов, основанные на использовании транспозонов (TraSH). Генам, которые не оказывали никакого эффекта на рост, присваивали балл, равный нулю.

Таблица 1. Источники, экспериментальные модели и критерии оценки для экспрессии генов *M. tuberculosis* с использованием анализа ДНК на микрочипах и полногеномного генного нокаута (значимость фазы роста)

Ссылка	Экспериментальная модель	Временная точка: максимальный балл ^a
Betts JC, <i>et al.</i> <i>Mol. Microbiol.</i> , 2002, 43: 717-731	Голодание в условиях контроля O ₂	96 ч: 3
		24 ч: 2
		4 ч: 1

Hampshire T, <i>et al.</i> <i>Tuberculosis (Edinb.)</i> , 2004, 84: 228-238	Истощение питательных веществ в условиях контроля O ₂	62 и 75 сут: 5 49 сут: 4 18 сут: 2
Muttucumaru DG <i>et al.</i> <i>Tuberculosis (Edinb.)</i> , 2004, 84: 239-246	Модель гипоксии Вейна *	14 сут (NRP-2): 4 7 сут (NRP-1): 2
Voskuil MI, <i>et al.</i> <i>Tuberculosis (Edinb.)</i> , 2004, 84: 218-227	Модель гипоксии Вейна *	30 и 80 сут: 5 14 и 20 сут: 4 10 и 12 сут: 3 6 и 8 сут: 2
Schnappinger D, <i>et al.</i> <i>J. Exp. Med.</i> , 2003, 198: 693-704	Инфекция мышинных макрофагов, +/- γ -INF	24 и 48 ч: 5
Karakousis PC, <i>et al.</i> <i>J. Exp. Med.</i> , 2004, 200: 647-657	Подкожный имплантат на основе полых волокон у мышей	10 сут: 3
Talaat AM, <i>et al.</i> <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 2004, 101: 4602-4607	Инфекция мышей. MTB, полученный из легкого ^b	28 сут: 3
Sasseti CM, <i>et al.</i> <i>Mol. Microbiol.</i> , 2003, 48: 77-84	TraSH мутированные библиотеки, выращенные на твердых средах	14 сут: 5
Rengarajan J <i>et al.</i> <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 2005, 102: 8327-8332	Инфекция мышинных макрофагов, +/- γ -INF с TraSH мутированными библиотеками <i>M. tuberculosis</i>	7 сут: 5
Sasseti CM <i>et al.</i> <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 2003, 100: 12989-12994	C57BL/6J мыши, инфицированные TraSH мутированными библиотеками <i>M. tuberculosis</i>	7, 14, 28 и 56 сут: 5

Максимальный балл, основанный на релевантности в качестве модели покоя; ч = час; сут = сутки.

^bСоотношение *M. tuberculosis* из легкого Balb/c и MTB в аэрируемой культуре для 28 сут. # Wayne L.G. and Hayes L.G., *Infect. Immun.*, 1996, 64: 2062-2069.

Этап 2. При применении второго критерия, рангового порядка генной экспрессии, баллы генов из каждого набора данных были упорядочены от наивысшего до самого низкого на основании экспрессионного соотношения (кратность экспрессии в экспериментальных условиях относительно экспрессии в клетках в логарифмической фазе культуры в жидкой среде). Ген с наивысшим рангом получал максимальный балл для этого конкретного набора данных (перечислены в колонке 3 табл. 1 (например, 5, 4 ..., 1 единица)). Балл уменьшали на 0,005 единицы для каждого гена по порядку вплоть до нуля или до достижения конца набора данных. Таким образом, когда максимальный балл составлял 4 единицы, 100-й по рангу ген получил бы балл 3,500. Для максимального балла в 5 единиц, 1000 генов или 25% генома *M. tuberculosis* получили балл. Для экспериментов, в которых собирали данные для нескольких временных точек, в качестве окончательного балла использовали максимальный балл по всем временным точкам.

На этапе 3 баллы для каждого гена в каждом из экспериментальных условий вводили в базу данных Microsoft Access. Для облегчения установления приоритетов добавляли ссылочные поля, такие как Ref-seq ID, Genbank function, Genbank note, Tuberculist classification и KEGG и Sanger Center links. Путем комбинирования данных из различных исследований и источников было достигнуто единодушное мнение относительно конкретных генов и путей, наиболее важных для выживания в состоянии покоя.

На этапе 4 с использованием 400 генов с наивысшим рангом (~10% генома) был получен список приоритетных терапевтических мишеней, дополненный результатами экспертного вычислительного и ручного анализа биохимических путей, энзимологии, удобства манипулирования лекарственным средством, гомологии с генами человека и другим предшествующим уровнем техники. Подавляющее большинство высокоранжированных генов получают из подмножества, где две или три группы пересекаются.

На этапе 5 была проведена идентификация субклеточной локализации кодируемых генами белков *M. tuberculosis* на целом геноме. Эвристическая процедура, использованная для предсказания мембранных белков, описана в Chalker *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2001, 183: 1259-1268. Усредненные профили гидрофоб-

ности (H) (von Heijne G., J. Mol. Biol., 1992, 225: 487-494) получали с использованием индексов гидрофобности по GES (Goldman-Engelman-Steitz) (Engelman D.M. et al., Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1986, 15: 321-353), взвешенных с использованием окна трапеции (trapezoid window). С использованием способа, аналогичного начальным этапам алгоритма TopPred II (Claros MG et al., Comput. Appl. Biosci., 1994, 10: 685-686), для каждой пептидной последовательности были предсказаны спиральные трансмембранные сегменты (TMS) посредством отбора 19 аминокислот с центром с наивысшим индексом H (MaxH), защиты их от дальнейшего рассмотрения и повторения процесса до тех пор, пока не останется пиков с $H > 0,5$. Субклеточные места локализации определяли на основании величины пика MaxH, числа сегментов с $H > 1,0$ и распределения величин пика H предполагаемых TMS. Порог MaxH, равный 1,15 был выбран, чтобы максимизировать различие между двумя тестовыми наборами данных SwissProtein release 34, содержащими трансмембранные и цитоплазматические белки, соответственно (Boyd D. et al., Protein Sci., 1998, 7: 201-205). Белки с $MaxH < 1,15$ классифицировали как цитоплазматические, тогда как белки с $MaxH > 1,15$ и по меньшей мере тремя возможными TMS классифицировали как мембранные белки. "Заякоренные" белки определяли как имеющие строго два TMS, один из которых начинается перед аминокислотой (aa) 35, и один из которых имеет $H > 1,15$, а другой имеет H не ниже 0,5. Специально для M. tuberculosis использовали SignalP с параметрами для грамположительных бактерий с целью идентификации секретируемых белков среди белков, классифицируемых в эвристическом анализе или как цитоплазматические, или как "неизвестные" (Nielsen H, et al. Protein Eng., 1997, 10: 1-6).

Rv1753c получил очень высокий ранг в качестве вакцинного антигена согласно нескольким критериям:

(1) Rv1753c неизменно активирован во всех моделях покоя. Среди всего набора из 3999 генов, оцененных в мета-анализе, Rv1753c был ранжирован 116-м как один из 10% сверхэкспрессируемых генов во всех моделях покоя. Балл активации для Rv1753c составил 13,29, что является благоприятным по сравнению с наивысшим баллом гена, составляющим 22,28. Rv1753c не подвергался негативной регуляции ни в одной из моделей состояния покоя, оценивается в 0 баллов (по сравнению с -18,13 для гена, подверженного наиболее значительной негативной регуляции).

(2) Rv1753c ранжирован как значимый для роста согласно моделям роста in vitro для выживаемости M. tuberculosis (оценивается в 2,07 балла из возможных 5).

(3) Предсказание субклеточной локализации говорит о том, что белок Rv1753c секретируется и, следовательно, значительно экспонирован вне клетки, что указывает на его пригодность в качестве мишени для вакцины.

Пример 2. Идентификация эпитопов Rv1753c

Способ.

Предсказание Т-клеточных эпитопов было основано на следующих подходах.

Прогноз	Название	URL(унифицированный указатель ресурса)/Ссылки
CD4 и CD8	Multipred	вебсайт: antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/ Zhang, G.L., Khan, A.M., Srinivasan, K.N., August, J.T. and Brusic, V. (2005) "MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides" Nucleic Acids Res. 33, W172 - W179.

	SVMHC	<p>вебсайт: www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC</p> <p>"Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC." Pierre Dönnes and Arne Elofsson in: <i>BMC Bioinformatics</i>, 2002, 3: 25.</p>
CD4	ProPred	<p>вебсайт: www.imtech.res.in/raghava/propred/</p> <p>Singh, H. and Raghava, G.P.S. (2001) "ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites". <i>Bioinformatics</i>, 17(12), 1236-37.</p>
	Tepitope2	<p>Программа собственной разработки на основе:</p> <p>H. Bian, J. Hammer (2004) "Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T-cell epitopes with TEPITOPE." <i>Methods</i>, 34: 468-75.</p>
CD8	nHLA	<p>вебсайт: www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/</p> <p>Bhasin M. and Raghava G.P.S. (2006) "A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T-cell epitopes"; <i>J. Biosci.</i>, 32: 31-42.</p>
	NetCTL	<p>вебсайт: www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/</p> <p>"An integrative approach to CTL epitope prediction. A combined algorithm integrating MHC-I binding, TAP transport efficiency and proteasomal cleavage predictions." Larsen M.V., Lundegaard C., Kasper Lamberth, Buus S., Brunak S., Lund O. and Nielsen M. <i>European Journal of Immunology</i>. 35(8): 2295-303, 2005.</p>
	EpiJen	<p>вебсайт: www.jenner.ac.uk/EpiJen/</p> <p>Doytchinova, I. A., P. Guan, D. R. Flower. "EpiJen: a server for multi-step T-cell epitope prediction." <i>BMC Bioinformatics</i>, 2006, 7, 131.</p>

Syfeithi	<p>вебсайт: www.syfeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm</p> <p>Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic: "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics (1999) 50: 213-219.</p>
PredTAP	<p>вебсайт: antigen.i2r.a-star.edu.sg/predTAP/</p> <p>Zhang, G.L., Petrovsky, N., Kwok, C.K., August, J.T. and Brusic, V. (2006) "PREDTAP: a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing." Immunome Res. 2(1), 3.</p>
PAPROC	<p>вебсайт: www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html</p> <p>C. Kuttler, A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.-G. Rammensee, H. Schild, K.P. Haderl, "An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages", J. Mol. Biol. 298 (2000), 417-429.</p> <p>A.K. Nussbaum, C. Kuttler, K.P. Haderl, H.-G. Rammensee, H. Schild, "PAPROC: A Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW", Immunogenetics, 53 (2001), 87-94.</p>

Результаты

Таблица 2. Предсказанные человеческие CD4+ Т-клеточные эпитопы Rv1753c

Номер предсказанного CD4 эпитопа	Положение аминокислоты	Последовательность эпитопа	SEQ ID No:	HLA аллель
1	57	WQGASSSAM	SEQ ID No: 30	DRB1_0401
2	81	VQAEQTAAQ	SEQ ID No: 31	DRB1_0401
3	100	VKTAVVQPM	SEQ ID No: 32	DRB1_0301, DRB1_1301
4	105	VQPMMLVAAN	SEQ ID No: 33	DRB1_1301
5	109	LVAANRADL	SEQ ID No: 34	DRB1_0301, DRB1_0801, DRB1_1101, DRB1_1301, DRB1_1501
6	117	LVSLVMSNL	SEQ ID No: 35	DRB1_1501
7	120	LVMSNLFQ	SEQ ID No: 36	DRB1_0401, DRB1_1301
8	140	YEQMWAADV	SEQ ID No: 37	DRB1_0101
9	144	WAADVSAVS	SEQ ID No: 38	DRB1_0401
10	172	LQNLGLPA	SEQ ID No: 39	DRB1_0101, DRB1_1101, DRB1_1501
11	261	FGNLGSNNV	SEQ ID No: 40	DRB1_0401
12	291	FGNTGNNNI	SEQ ID No: 41	DRB1_0401
13	413	FLNAGNINT	SEQ ID No: 42	DRB1_0401
14	453	LQFSITTPD	SEQ ID No: 43	DRB1_0401
15	673	LTIPAGITI	SEQ ID No: 44	DRB1_1501
16	725	FGIPFTLQF	SEQ ID No: 45	DRB1_0401, DRB1_1101
17	731	LQFQTNVPA	SEQ ID No: 46	DRB1_0401
18	733	FQTNVPALQ	SEQ ID No: 47	DRB1_0401, DRB1_0801, DRB1_1101
19	770	YTLTGPIVI	SEQ ID No: 48	DRB1_0101, DRB1_0401, DRB1_1101
20	782	FLPAFNIPG	SEQ ID No: 49	DRB1_0401
21	866	LTIDPINLT	SEQ ID No: 50	DRB1_0401
22	891	LTIDPINLT	SEQ ID No: 51	DRB1_0301, DRB1_1501
23	954	YFNSSTAPS	SEQ ID No: 52	DRB1_0401, DRB1_1101
24	955	FNSSTAPSS	SEQ ID No: 53	DRB1_0401
25	976	FGNNGSGLS	SEQ ID No: 54	DRB1_0401
26	1000	YQNFGGLSS	SEQ ID No: 55	DRB1_0101, DRB1_0801, DRB1_1101, DRB1_1501
27	1003	FGGLSSGFS	SEQ ID No: 56	DRB1_0401
28	1020	FANRGILPF	SEQ ID No: 57	DRB1_0801
29	1025	ILPFSVASV	SEQ ID No: 58	DRB1_1301
30	1037	FANIGTNLA	SEQ ID No: 59	DRB1_0401, DRB1_1101

Таблица 3. Предсказанные человеческие CD8+ Т-клеточные эпитопы Rv1753c

Номер предсказанного CD8 эпитопа	Положение аминокислоты	Последовательность эпитопа	SEQ ID No:	HLA аллель
1	2	NFSVLPPEI	SEQ ID No: 60	A24
2	5	VLPPEINSA	SEQ ID No: 61	A2, A_0201
3	6	LPPEINSAL	SEQ ID No: 62	B7, B8, B_3501, B51
4	8	PEINSALIF	SEQ ID No: 63	B44
5	9	EINSALIFA	SEQ ID No: 64	A_0201, A_0301
6	18	GAGPEPMAA	SEQ ID No: 65	A_0101, B_3501
7	20	GPEPMAAAA	SEQ ID No: 66	B7, B_3501
8	22	EPMAAAATA	SEQ ID No: 67	B7, B_0702, B8, B_3501, B51
9	26	AAATAWDGL	SEQ ID No: 68	A1, B8, B_3501
10	28	ATAWDGLAM	SEQ ID No: 69	B7
11	30	AWDGLAMEL	SEQ ID No: 70	A1, A_2402, B44, Cw_0602
12	33	GLAMELASA	SEQ ID No: 71	A_0101, A_0301, A2, A_0201
13	34	LAMELASAA	SEQ ID No: 72	A3, A_0301, B51
14	48	VTSGLVGGA	SEQ ID No: 73	A_0101, A_0301
15	64	AMAAAAAPY	SEQ ID No: 74	A1, A3, A_0301, A_0101, B_4403
16	66	AAAAAPYAA	SEQ ID No: 75	A_0301, B_3501
17	68	AAAPYAAWL	SEQ ID No: 76	A1, A24, B_3501, B51
18	69	AAPYAAWLA	SEQ ID No: 77	A1, A_0301, B_3501
19	70	APYAAWLAA	SEQ ID No: 78	A3, A_0301, B7, B_0702, B8, B_3501
20	72	YAAWLAAAA	SEQ ID No: 79	A_0301, B8, B_3501
21	73	AAWLAAAIV	SEQ ID No: 80	A2, A_0201, B7, B51
22	75	WLAAAIVQA	SEQ ID No: 81	A2, A3, A_0201
23	82	QAEQTAAQA	SEQ ID No: 82	A1, A_0301
24	83	AEQTAAQAA	SEQ ID No: 83	B44, B_4403
25	86	TAAQAAAMI	SEQ ID No: 84	A3, B8, B51
26	91	AAMIAFEFA	SEQ ID No: 85	A_0201, A_0301, B_3501
27	92	AMIAFEFAV	SEQ ID No: 86	A2, A_0201
28	95	AEFEAVKTA	SEQ ID No: 87	B44
29	97	FEAVKTAVV	SEQ ID No: 88	B8, B44
30	98	EAVKTAVVQ	SEQ ID No: 89	B8, B_3501
31	101	KTAVVQPML	SEQ ID No: 90	A_0101, A_0201
32	106	QPMLVAANR	SEQ ID No: 91	A3, B7, B_0702, B_3501, B51
33	107	PMLVAANRA	SEQ ID No: 92	A2, A_0201, B8
34	109	LVAANRADL	SEQ ID No: 93	B7
35	112	ANRADLVSL	SEQ ID No: 94	B7, B44
36	114	RADLVSLVM	SEQ ID No: 95	B7, B_3501
37	118	VSLVMSNLF	SEQ ID No: 96	A24, A_0101
38	124	NLFGQNAPA	SEQ ID No: 97	A2
39	130	APAIAAIEA	SEQ ID No: 98	B7, B_3501
40	132	AIAAIEATY	SEQ ID No: 99	A1, A_0101, A3, A_0301
41	138	ATYEQMWAA	SEQ ID No: 100	A_0101, A2, A_0301
42	142	QMWAADVSA	SEQ ID No: 101	A2, A_0201
43	150	AMSAYHAGA	SEQ ID No: 102	A2, A_0201
44	152	SAYHAGASA	SEQ ID No: 103	B7, B_3501
45	153	AYHAGASAI	SEQ ID No: 104	A1, A_0201, A3, A_2402, A_0301, A24
46	157	GASAIASAL	SEQ ID No: 105	B7, B_3501
47	160	AIASALSPF	SEQ ID No: 106	A_0301, B7
48	164	ALSPFSKPL	SEQ ID No: 107	A_0101, A2, A_0201
49	167	PFSKPLQNL	SEQ ID No: 108	A24, A_2402, Cw_0401
50	170	KPLQNLAGL	SEQ ID No: 109	B7, B_3501, B51
51	174	NLAGLPAWL	SEQ ID No: 110	A2, A_0201, B7, Cw_0602

52	175	LAGLPAWLA	SEQ ID No: 111	A_0101, A_0301
53	178	LPAWLASGA	SEQ ID No: 112	B7, B_3501
54	181	WLASGAPAA	SEQ ID No: 113	A_0201
55	185	GAPAAAMTA	SEQ ID No: 114	A3, A_0301, B8
56	186	APAAAMTAA	SEQ ID No: 115	A3, B_3501, B7
57	189	AAMTAAAGI	SEQ ID No: 116	A1, A_2402, B51
58	192	TAAAGIPAL	SEQ ID No: 117	B7, B51, Cw_0602
59	193	AAAGIPALA	SEQ ID No: 118	A_0101, A_0301
60	199	ALAGGPTAI	SEQ ID No: 119	A1, A_0101, A2, A_0201, A_0301
61	201	AGGPTAINL	SEQ ID No: 120	A1, A24, B51
62	203	GPTAINLGI	SEQ ID No: 121	A_2402, B7, B_0702, B8, B_3501, B51
63	206	AINLGIANV	SEQ ID No: 122	A2, A_0201
64	231	NANLGNYNF	SEQ ID No: 123	A24, B_3501
65	236	NYNFGSGNF	SEQ ID No: 124	A24
66	263	NLGSNNVG	SEQ ID No: 125	A2, A_0201
67	383	SLNTGSGNM	SEQ ID No: 126	A2
68	408	NANTGFLNA	SEQ ID No: 127	A_0101, A_0301
69	413	FLNAGNINT	SEQ ID No: 128	A2
70	418	NINTGVFNI	SEQ ID No: 129	A_0201, A_0301
71	447	GVGQGSQF	SEQ ID No: 130	B7, B_3501
72	456	SITTPDLTL	SEQ ID No: 131	A_0101, A_0201, A_0301
73	459	TPDLTLPL	SEQ ID No: 132	B7, B_3501, B51
74	461	DLTLPLQI	SEQ ID No: 133	A_0101, A_0201
75	466	PLQIPGISV	SEQ ID No: 134	A_0201
76	469	IPGISVPAF	SEQ ID No: 135	B7, B_3501
77	471	GISVPAFSL	SEQ ID No: 136	A_0101, A_0201, A_0301, B44
78	474	VPAFSLPAI	SEQ ID No: 137	B7, B51
79	476	AFSLPAITL	SEQ ID No: 138	A_0201, A24, B7
80	479	LPAITLPSL	SEQ ID No: 139	A24, B7, B_3501, B51, B_0702, Cw_0401, Cw_0602
81	481	AITLPSLNI	SEQ ID No: 140	A_0101, A_0301
82	483	TLPSLNIPA	SEQ ID No: 141	A2, A_0201, A_0301
83	484	LPSLNIPAA	SEQ ID No: 142	B7, B_3501, B51
84	492	ATTPANITV	SEQ ID No: 143	A1, A_0101, A2, A_0201
85	494	TPANITVGA	SEQ ID No: 144	B7, B_3501
86	497	NITVGAFSL	SEQ ID No: 145	A2, A_0201, A_0301, A24
87	502	AFSLPGLTL	SEQ ID No: 146	A24, A_2402, B7
88	505	LPGLTLPSL	SEQ ID No: 147	B7, B_3501, B51, B_0702, Cw_0602
89	509	TLPSLNIPA	SEQ ID No: 148	A2
90	518	ATTPANITV	SEQ ID No: 149	A1, A2
91	523	NITVGAFSL	SEQ ID No: 150	A2, A24, A_0201
92	528	AFSLPGLTL	SEQ ID No: 151	A_2402, B7
93	531	LPGLTLPSL	SEQ ID No: 152	B7, B_0702, B_3501, B51, Cw_0602
94	535	TLPSLNIPA	SEQ ID No: 153	A2

95	544	ATTPANITV	SEQ ID No: 154	A1, A2
96	549	NITVGAFSL	SEQ ID No: 155	A2, A24, A_0201
97	554	AFSLPGLTL	SEQ ID No: 156	A_2402, B7
98	557	LPGLTLPSL	SEQ ID No: 157	B7, B_0702, B_3501, B51, Cw_0602
99	561	TLPSLNIPA	SEQ ID No: 158	A2
100	570	ATTPANITV	SEQ ID No: 159	A1, A2
101	575	NITVGAFSL	SEQ ID No: 160	A2, A24, A_0201
102	580	AFSLPGLTL	SEQ ID No: 161	A_2402, B7
103	583	LPGLTLPSL	SEQ ID No: 162	B7, B_0702, B_3501, B51, Cw_0602
104	587	TLPSLNIPA	SEQ ID No: 163	A2
105	596	ATTPANITV	SEQ ID No: 164	A1, A2
106	601	NITVGAFSL	SEQ ID No: 165	A2, A24
107	609	LPGLTLPSL	SEQ ID No: 166	B7, B_0702, B_3501, B51, Cw_0602
108	622	ATTPANITV	SEQ ID No: 167	A1, A2
109	625	PANITVSGF	SEQ ID No: 168	A24, B_3501
110	627	NITVSGFQL	SEQ ID No: 169	A_0201, A_0301
111	635	LPPLSIPSV	SEQ ID No: 170	B7, B51
112	636	PPLSIPSV	SEQ ID No: 171	B7, B_3501
113	640	IPSVAIPPV	SEQ ID No: 172	B7, B51
114	645	IPPVTVPPV	SEQ ID No: 173	B7, B51
115	650	VPPITVGAF	SEQ ID No: 174	B7, B_3501
116	662	PLQIPEVTI	SEQ ID No: 175	A_0201
117	665	IPEVTIPQL	SEQ ID No: 176	B7, B_3501, B51
118	669	TIPQLTIPA	SEQ ID No: 177	A_0201, A_0301
119	673	LTIPAGITI	SEQ ID No: 178	A_0101, A_0201, B51
120	678	GITIGGFSL	SEQ ID No: 179	A_0101, A_0201, A_0301
121	686	LPAIHTQPI	SEQ ID No: 180	B7, B8, B51
122	688	AIHTQPITV	SEQ ID No: 181	A_0101, A_0201, A_0301
123	693	PITVGQIGV	SEQ ID No: 182	A_0201
124	698	QIGVGQFGL	SEQ ID No: 183	A_0201
125	705	GLPSIGWDV	SEQ ID No: 184	A2, A_0201
126	706	LPSIGWDVF	SEQ ID No: 185	B7, B_3501
127	712	DVFLSTPRI	SEQ ID No: 186	A_0201
128	714	FLSTPRITV	SEQ ID No: 187	A_0101, A2, A_0201, B8
129	717	TPRITVPAF	SEQ ID No: 188	B7, B8, B_3501
130	725	FGIPFTLQF	SEQ ID No: 189	A_0201, B8, B_3501
131	729	FTLQFQTNV	SEQ ID No: 190	A_0101, A2, A_0201
132	732	QFQTNVPAL	SEQ ID No: 191	A24
133	739	ALQPPGGGL	SEQ ID No: 192	A_0101, A_0201
134	747	LSTFTNGAL	SEQ ID No: 193	A_0101, B7
135	748	STFTNGALI	SEQ ID No: 194	A_0101, A_0201, A_0301, A24
136	749	TFTNGALIF	SEQ ID No: 195	A24
137	754	ALIFGEFDL	SEQ ID No: 196	A_0101, A2, A_0201
138	758	GEFDLPQLV	SEQ ID No: 197	B44
139	762	LPQLVHPY	SEQ ID No: 198	B7, B51

140	764	QLVWHPYTL	SEQ ID No: 199	A_0101, A2, A_0201, B8
141	768	HPYTLTGPI	SEQ ID No: 200	B7, B8, B51
142	770	YTLTGPIVI	SEQ ID No: 201	A_0101, A2, A_0201
143	774	GPIVIGSFF	SEQ ID No: 202	A24, B7, B_3501
144	775	PIVIGSFFL	SEQ ID No: 203	A_0101, A_0301
145	780	SFFLPAFNI	SEQ ID No: 204	A24
146	783	LPAFNIPGI	SEQ ID No: 205	B7, B51
147	788	IPGIDVPAI	SEQ ID No: 206	B7, B51
148	790	GIDVPAINV	SEQ ID No: 207	A_0101, A_0201, A_0301
149	793	VPAINVDGF	SEQ ID No: 208	B7, B_3501
150	795	AINVDGFTL	SEQ ID No: 209	A_0101, A_0201, A_0301, B44
151	802	TLPQITTPA	SEQ ID No: 210	A2
152	803	LPQITTPAI	SEQ ID No: 211	B7, B8, B51
153	808	TPAITTPEF	SEQ ID No: 212	B7, B_3501
154	810	AITTPEFAI	SEQ ID No: 213	A_0101, A_0201, A_0301
155	813	TPEFAIPPI	SEQ ID No: 214	B7, B51
156	818	IPPIGVGGF	SEQ ID No: 215	B7, B_3501
157	820	PIGVGGFTL	SEQ ID No: 216	A_0101, A_0201, A_0301
158	828	LPQITTQEI	SEQ ID No: 217	B7, B51
159	829	PQITTQEI	SEQ ID No: 218	A_0101
160	835	EITPELTI	SEQ ID No: 219	A_0101, A_0201, A_0301
161	838	TPELTINSI	SEQ ID No: 220	B7, B51
162	840	ELTINSIGV	SEQ ID No: 221	A_0201
163	845	SIGVGGFTL	SEQ ID No: 222	A_0201, A_0301
164	853	LPQITTPPI	SEQ ID No: 223	B7, B51
165	858	TPPITTPPL	SEQ ID No: 224	B7, B_3501, B51
166	860	PITTPPLTI	SEQ ID No: 225	A_0101, A_0201, A_0301
167	863	TPPLTIDPI	SEQ ID No: 226	B7, B51
168	870	PINLTGFTL	SEQ ID No: 227	A_0101, A_0301
169	913	TPPLTIEPI	SEQ ID No: 228	B7, B51
170	915	PLTIEPIGV	SEQ ID No: 229	A_0101, A_0201
171	918	IEPIGVGGF	SEQ ID No: 230	B44
172	929	PPLTVPGIH	SEQ ID No: 231	B_3501
173	930	PLTVPGIHL	SEQ ID No: 232	A_0101, A_0201
174	935	GIHLPSTTI	SEQ ID No: 233	A_0101, A_0301
175	937	HLPSTTIGA	SEQ ID No: 234	A2
176	938	LPSTTIGAF	SEQ ID No: 235	B7, B8, B_3501
177	946	FAIPGGPGY	SEQ ID No: 236	A_0101, A_0301, B_3501
178	958	STAPSSGFF	SEQ ID No: 237	A1, A_0101, A24
179	986	WFNTNPAGL	SEQ ID No: 238	A24
180	1002	NFGGLSSGF	SEQ ID No: 239	A24
181	1005	GLSSGFSNL	SEQ ID No: 240	A_0101, A2, A_0201
182	1012	NLGSGVSGF	SEQ ID No: 241	A_0201
183	1020	FANRGILPF	SEQ ID No: 242	B8, B_3501
184	1022	NRGILPFSV	SEQ ID No: 243	A2, A24, B51
185	1025	ILPFSVASV	SEQ ID No: 244	A2, A_0201
186	1026	LPFSVASVV	SEQ ID No: 245	B7, B51
187	1029	SVASVVS GF	SEQ ID No: 246	A24, B7
188	1036	GFANIGNTL	SEQ ID No: 247	A24, Cw_0401, Cw_0602

Как можно видеть из табл. 2 и 3, Rv1753c содержит ряд предсказанных CD4+ и CD8 Т-клеточных эпитопов. Кроме того, на основании этой информации предполагают, что белок несет эпитопы, которые могут распознаваться HLA, встречающимися по всему миру (то есть HLA у представителей белой европеоидной расы, Африки, Азии или Латинской Америки - см. вебсайт www.allelefrequencies.net).

Пример 3. Гомологи H37RV

Последовательности Rv1753c из ряда штаммов *M. tuberculosis* и БЦЖ идентифицировали, используя систему поиска BLASTP GenBank (инвентарный номер эталонной последовательности H37Rv YP_177830.1):

Штамм	Инвентарный номер	% идентичности
CDC1551	NP_336255.1	95
F11	YP_001287714.1	80
Haarlem	ZP_02247061.1	82
C	ZP_00878894.1	96
БЦЖ	YP_977884.1	83

Выравнивание гомологичных последовательностей указывает на высокий уровень идентичности в N-концевых и C-концевых областях, причем наибольшая вариация имеет место в центральном связывающем участке.

Биологические анализы

Количественное определение Т-клеточных ответов на Rv1753c

Можно провести скрининг полипептидов по их способности активировать Т-клетки (индукцию пролиферации и/или продуцирование цитокинов) в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) или в препаратах цельной крови от инфицированных (например, пораженных латентной инфекцией) индивидуумов.

Пораженных латентной инфекцией индивидуумов обычно идентифицируют по кожной пробе, которая имеет диаметр более 10 мм и протекает бессимптомно, при отсутствии положительного ответа на Mtb (*M. tuberculosis*) в посеве, при отрицательном ответе мокроты и при отсутствии какого-либо поражения (по результатам рентгенограммы грудной клетки).

Можно использовать ряд анализов *in vitro*, основанных на применении образцов PBMC или цельной крови: после рестимуляции в присутствии антигена (или его варианта/иммуногенного фрагмента, как целесообразно) можно определить пролиферацию клеток (как измерено с использованием CFSE/проточной цитометрии) или количественно оценить продуцирование цитокинов (присутствующих в супернатанте культивируемых клеток и измеренных посредством ELISA, или, после внутриклеточного окрашивания CD4 и CD8 Т-клеток и анализа посредством проточной цитометрии).

Например, образцы PBMC можно получить из гепаринизированной цельной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл/гипак, следуя стандартным процедурам. Затем клетки можно промыть и заморозить в жидком азоте до проведения тестирования (для дополнительных деталей см. Lalvani A et al. *J. Infect. Dis.*, 1999, 180: 1656-1664).

Т-клеточная пролиферация

Специфический иммунный ответ можно охарактеризовать путём проведения анализа пролиферации лимфоцитов с использованием меченого тритием тимидина. В этом методе оценивают размножение клеток после стимуляции антигеном *in vitro*. На практике клеточную пролиферацию определяют, оценивая включение меченого тритием тимидина в ДНК, процесс, тесно связанный с последующими изменениями в количестве клеток.

Более подходит, если пролиферацию лимфоцитов можно провести с использованием сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеин-диацетата (CFSE). CFSE спонтанно и необратимо связывается как с внутриклеточными белками, так и белками клеточной поверхности путём взаимодействия с боковыми цепями лизина и другими доступными аминокислотными группами. Когда клетки лимфоцитов делятся, мечение CFSE распределяется в равной мере между дочерними клетками, флуоресценция которых ввиду этого составляет половину от флуоресценции родителей. В результате деление пополам клеточной флуоресценции маркирует каждое последующее поколение в популяции пролиферирующих клеток и легко отслеживается с помощью проточной цитометрии (для дополнительных деталей см. Hodgkins P.D., et al., *J. Exp. Med.*, 1996, 184:277-281).

Практически, после оттаивания PMBC могут быть промыты и окрашены CFSE, после чего подвергнуты культивированию (2×10^5 клеток) в течение 72 ч с антигеном (10 мкг/мл) в культуральных средах (RPMI-1640, дополненной глутамином, несущественной аминокислотой, пируватом и инактивированной нагреванием человеческой АВ сывороткой). Затем клетки могут быть собраны и их фенотип охарактеризован с использованием окрашивания поверхности для идентификации CD8 и CD4+ Т-клеток памяти. После этого можно использовать проточный цитометрический анализ для выявления степени пролиферации лимфоцитов в ответ на каждый антиген (доли клеток с пониженной интенсивностью CFSE после стимуляции *in vitro*).

Продуцирование цитокинов

Продуцирование IFN- γ (или продуцирование других цитокинов, таких как, например, IL2, TNF- α , IL5, IL12 и так далее) можно измерить, используя твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA). ELISA-планшеты могут быть покрыты мышиными моноклональными антителами против человеческого IFN- γ (PharMingen, San Diego, CA) в PBS (забуференном фосфатом физиологическом растворе) в течение четырех часов при комнатной температуре. Затем лунки блокируют, используя PBS, содержащий 5% (мас./об.) нежирного сухого молока, в течение 1 ч при комнатной температуре. Потом планшеты промывают, например шесть раз в смеси PBS/0,2% Твин-20, и образцы, разведенные 1:2 в культуральной среде в ELISA-планшетах, инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты снова промывают, и в каждую лунку можно добавить поликлональную кроличью сыворотку против IFN- γ человека, например, разведенную 1:3000 в смеси PBS/10% нормальной козьей сыворотки. Затем планшеты инкубируют в течение двух часов при комнатной температуре, промывают, и можно добавить конъюгированные с пероксидазой хрена анти-кроличьи IgG (Sigma Chemical So., St. Louis, MO), например, в разведении 1:2000 в смеси PBS/5% нежирного сухого молока. По окончании следующих двух часов инкубации при комнатной температуре планшеты промывают и добавляют субстрат ТМБ (тетраметилбензидин). Реакция может быть остановлена через 20 мин добавлением 1 н. серной кислоты. Затем можно определить оптическую плотность (OD) при 450 нм, используя 570 нм в качестве длины волны сравнения. Обычно, фракции, дающие в обоих повторах величину OD, в два раза превышающую среднюю величину

OD для клеток, культивируемых в одной только среде, могут считаться положительными.

Пример 4. Иммуногенность на СВ6F1 мышах

Иммуногенность антигена оценивали на СВ6F1 мышах (первое поколение скрещенных BALB/c и C57BL/6 мышей).

СВ6F1 мышей иммунизировали внутримышечно три раза (на 0-е сутки, 14-е сутки и 28-е сутки) 0,5 или 2 мкг белкового антигена в комбинации с адьювантной системой AS01E (липосомная адьювантная композиция, содержащая 3D-MPL и QS21).

Использовали следующий план эксперимента:

Группа	0-е сутки	14-е сутки	28-е сутки
1	2 мкг Rv1753c/AS01E	2 мкг Rv1753c/AS01E	2 мкг Rv1753c/AS01E
2	0,5 мкг Rv1753c/AS01E	0,5 мкг Rv1753c/AS01E	0,5 мкг Rv1753c/AS01E

В каждой группе в протоколе суммарно использовали 24 мыши.

Лимфоциты периферической крови (PBL) собирали и объединяли в пулы на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) и 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации) и измеряли антиген-специфические CD4 и CD8 Т-клеточные ответы (как определяли по количеству CD4 или CD8 Т-клеток, продуцирующих IL-2, и/или IFN-гамма, и/или TNF-альфа) посредством проточной цитометрии после рестимуляции *in vitro* в течение ночи пулами 15-мерных пептидов, охватывающих представляющие интерес последовательности.

Детекцию мышинных Т-клеток, которые экспрессируют IL-2 и/или IFN-гамма, и/или TNF-альфа, выполняли, используя кратковременную иницируемую антигеном амплификацию экспрессии цитокинов.

Вкратце, к гепаринизированной периферической крови мышей добавляли раствор PharmLyse (BD-Pharmingen), чтобы лизировать эритроциты. Полученные PBL (лимфоциты периферической крови) промывали и затем инкубировали в присутствии пула 15-мерных пептидов - перекрывающихся по 11 аминокислотам - охватывающих последовательность представляющего интерес антигена, и 1 мкг/мл антител к CD28 и CD49d (BD-Pharmingen). Каждый 15-мерный пептид использовали в конечной концентрации 1 мкг/мл. Контроли со средой также стимулировали антителами к CD28 и CD49d.

Блокирующее секрецию цитокинов соединение брэфелдин-A (BD-Pharmingen) добавляли через 2 ч после начала культивирования при 37°C, 5% CO₂ и клетки поддерживали при 37°C, 5% CO₂ в течение следующих 4 дополнительных часов после инкубации в течение ночи при +4°C.

Затем клетки собирали и окрашивали, используя связанные с Pacific Blue антитела против CD4 (BD - клон RM4-5, BD-Pharmingen) и связанные с комплексом перидинин-хлорофилл-белок А (PerCp) цианина5.5 (Cy5.5) антитела против CD8 альфа (клон 53-6.7, BD-Pharmingen).

Затем клетки промывали, фиксировали, подвергали пермеабилзации (набор Cytofix-cytoperm, BD-Pharmingen) и окрашивали, используя аллофикоцианин-связанные антитела против IFN-g (клон XMG1.2, BDPharmingen), флуоресцеин-изотиоцианат(FITC)-связанные антитела против IL-2 (клон JES 6-5H4, Beckman Coulter) и фикоэритрин(PE)-связанные антитела против TNF-альфа (клон MP6-XT22, BDPharmingen). После последних промывок окрашенные клетки анализировали на проточном цитометре LSR II (Beckton-Dickinson). В CD8+ подгруппе данные собирали минимум для 10000 клеток.

Для дополнительной информации см. Walzer T. et al., Cell Immunol., 2000, 206(1): 16-25 и Maecker HT et al., J. Immunol. Methods, 2001, 255(1-2): 27-40.

В качестве отрицательных контролей некоторые клетки также культивировали *in vitro* в течение ночи в культуральной среде (не стимулировали). Антиген-специфические ответы рассчитывали путём вычитания среднего цитокинowego ответа, произведенного нестимулированными клетками, из среднего цитокинowego ответа, произведенного пептид-стимулированными клетками.

В каждую временную точку и для каждой группы собирали данные от 4 пулов из 6 мышей в каждом. Приведенные ниже данные представлены в виде % CD4 или CD8 Т-клеток, продуцирующих IL-2 и/или IFN-гамма, и/или TNF-альфа. На диаграмму наносили данные для каждого индивидуального пула мышей (треугольники), а также среднюю величину в группе (штрих).

На фиг. 1 показано, что на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) Rv1753c-специфические CD4 и CD8 Т-клеточные ответы детектируются у мышей, иммунизированных любой из двух доз Rv1753c/AS01E. Уровни Rv1753c-специфических Т-клеточных ответов оказываются выше у мышей, иммунизированных 2 мкг Rv1753c/AS01E, чем у мышей, иммунизированных 0,5 мкг Rv1753c/AS01E.

На фиг. 2 показан цитокиновый профиль CD4 Т-клеточного ответа из PBL, стимулированных пулом пептидов из Rv1753c, (без вычета данных для среды) на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации).

На фиг. 3 показан цитокиновый профиль CD8 Т-клеточного ответа из PBL, стимулированных пулом пептидов из Rv1753c, (без вычета данных для среды) на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации).

На фиг. 4 показано, что на 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации) Rv1753c-специфические CD4 и CD8 Т-клеточные ответы детектируются у мышей, иммунизированных любой из двух доз Rv1753c/AS01E. Уровни Rv1753c-специфических Т-клеточных ответов оказываются выше у мышей, иммунизированных 2 мкг Rv1753c/AS01E, нежели у мышей, иммунизированных 0,5 мкг Rv1753c/AS01E.

Третье введение повышает CD4 Т-клеточный ответ, наблюдаемый на 21-е сутки, в более низкой дозе 0,5 мкг, но не в высокой дозе антигена, равной 2 мкг. Антиген-специфический CD8 Т-клеточный ответ оказывается более низким на 35-е сутки, нежели на 21-е сутки.

На фиг. 5 показан цитокиновый профиль CD4 Т-клеточного ответа из PBL, стимулированных пулом пептидов из Rv1753c, (без вычета данных для среды) на 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации). Ввиду технических трудностей данные для третьего пула клеток в дозе 2 мкг оказались не доступны.

На фиг. 6 показан цитокиновый профиль CD8 Т-клеточного ответа из PBL, стимулированных пулом пептидов из Rv1753c, (без вычета данных для среды) на 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации). Ввиду технических трудностей данные для третьего пула клеток в дозе 2 мкг оказались не доступны.

Пример 5. Иммуногенность на C57BL/6 мышах

Иммуногенность антигена также оценивали на C57BL/6 мышах.

C57BL/6 мышей иммунизировали внутримышечно три раза (на 0-е сутки, 14-е сутки и 28-е сутки) белковым антигеном (1 мкг или 4 мкг) в комбинации с адъювантной системой AS01E (липосомной адъювантной композицией, содержащей 3D-MPL и QS21).

Использовали следующий план эксперимента:

Группа	0-е сутки	14-е сутки	28-е сутки
1	4 мкг Rv1753c/AS01E	4 мкг Rv1753c/AS01E	4 мкг Rv1753c/AS01E
2	1 мкг Rv1753c /AS01E	1 мкг Rv1753c/AS01E	1 мкг Rv1753c/AS01E

Лимфоциты периферической крови (PBL) собирали и объединяли в пулы на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) и 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации) и измеряли антиген-специфические CD4 и CD8 Т-клеточные ответы (как определяли по количеству CD4 или CD8 Т-клеток, продуцирующих IL-2, и/или IFN-гамма, и/или TNF-альфа) посредством проточной цитометрии после рестимуляции *in vitro* в течение ночи пулами 15-мерных пептидов, охватывающих представляющие интерес последовательности. Процедуру проводили, как описано ранее.

В качестве отрицательных контролей некоторые клетки также культивировали *in vitro* в течение ночи в культуральной среде (не стимулировали). Антиген-специфические ответы рассчитывали путём вычитания среднего цитокинового ответа, произведенного нестимулированными клетками, из среднего цитокинового ответа, произведенного пептид-стимулированными клетками.

В каждую временную точку и для каждой группы собирали данные от 4 пулов из 6 мышей в каждом. Приведенные ниже данные представлены в виде % CD4 или CD8 Т-клеток, продуцирующих IL-2 и/или IFN-гамма, и/или TNF-альфа. На диаграмму наносили данные для каждого индивидуального пула мышей (треугольники), а также среднюю величину в группе (штрих).

На фиг. 7 показано, что на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) Rv1753c-специфические CD4 и CD8 Т-клеточные ответы детектируются у мышей, иммунизированных любой из двух доз Rv1753c/AS01E. Уровни Rv1753c-специфических CD4 Т-клеточных ответов одинаковы независимо от иммунизирующей дозы Rv1753c. И наоборот, мыши, иммунизированные 1 мкг Rv1753c/AS01E, проявляли более сильные Rv1753c-специфические CD8 Т-клеточные ответы, чем мыши, иммунизированные 4 мкг Rv1753c/AS01E.

На фиг. 8 показан цитокиновый профиль CD4 Т-клеточного ответа из PBL, стимулированных пулом пептидов из Rv1753c, (без вычета данных для среды) на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации). Ввиду технических трудностей данные для первого пула клеток при дозе 1 мкг оказались не доступны.

На фиг. 9 показан цитокиновый профиль CD8 Т-клеточного ответа из PBL, стимулированных пулом пептидов из Rv1753c, (без вычета данных для среды) на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации). Ввиду технических трудностей данные для первого пула клеток при дозе 1 мкг оказались не доступны.

Иммунологические данные на 35-е сутки все еще не были получены на момент времени, когда эта заявка была подготовлена.

Пример 6. Распознавание *in vitro* с использованием РВМС от людей с латентным ТВ

Эксперименты проводили с целью оценки ответа периферических Т-клеток, специфического в отношении антигена по изобретению, у 4 ранее не подвергавшихся ТВ здоровых взрослых (кожная проба PPD = 0 мм) и у 8 латентно инфицированных ТВ здоровых взрослых (кожная проба PPD = 15 мм или выше) из Южной Африки.

Данные кожной пробы PPD
Индивидуальный ID
(идентификационный) Диаметр уплотнения

номер	(мм)
4	0
5	0
33	0
38	0
36	15
46	15
13	15
7	16
58	25
74	26
8	53
60	55

Оценку клеточно-опосредованного иммунного (СМІ) ответа выполняли путём измерения цитокинов на выделенных моноклеарных клетках периферической крови (РВМС), используя анализ с внутриклеточным окрашиванием цитокинов (ICS).

Проводимый ICS представлял собой адаптацию ранее описанной методологии (см. Von Eschen et al, Hum. Vaccin. 2009 5(7)). РВМС стимулировали *in vitro* одним из пулов 15-мерных пептидов (с перекрытием по 11 аминокислотам) охватывающих всю последовательность представляющего интерес антигена. Клетки стимулировали пептидами в течение 2 ч, затем культивировали в течение ночи в присутствии брэфелдина А, обрабатывали для ICS и анализировали с использованием проточной цитометрии. Измеряли частоту встречаемости антиген-специфических CD3+CD4+ или CD3+CD8+ Т-клеток, экспрессирующих IFN-гамма, и/или TNF-альфа, и/или IL-17. Из ответов, полученных в стимулированных пептидными пулами клетках, вычитали ответы стимулированных средой клеток.

ICS: антитела:

анти-CD3 PO (Invitrogen - № по каталогу CD0330),
 анти-CD4 PB (BD - № по каталогу 558116),
 анти-CD8 APC-H7 (BD - № по каталогу 641400),
 анти-IFN γ AF700 (BD-Pharmingen - № по каталогу 557995),
 анти-TNF PE-Cy7 (BD-Pharmingen - № по каталогу 557647),
 анти-IL17 AF647 (BD-Pharmingen - № по каталогу 51-7178-71).

Результаты представлены в виде числа антиген-специфических CD3+CD4+ Т-клеток, экспрессирующих TNF-альфа и IFN-гамма, на миллион CD3+CD4+ Т-клеток, поскольку эти клетки представляют основную популяцию антиген-специфических CD4 Т-клеток (уровень фонового ответа, обусловленный средой, вычитают). Не было выявлено никаких антиген-специфических CD3+CD8+ Т-клеток. Фиг. 10 показывает, что антиген-специфический CD4 Т-клеточный ответ определяется у 7 из 8 индивидуумов с латентной инфекцией (отсутствует у индивидуума под номером 60) в сравнении с неспецифическим CD4 Т-клеточным ответом, измеренным у ранее не подвергавшихся инфекции индивидуумов.

В заключение можно отметить, что антиген Rv1753c способен вызывать иммунный ответ как у СВ6F1, так и C57BL/6 мышей. Кроме того, профиль продуцирования цитокинов указывает, что большая часть антиген-специфических Т-клеток экспрессирует множество Th1-ассоциированных цитокинов (то есть вызывает полифункциональный Т-клеточный ответ). Важно, что после иммунизации присутствуют как CD4, так и CD8 антиген-специфические Т-клетки, CD8-клетки могут быть особенно важны в сценарии латентного ТВ. Значимость Rv1753c для инфекции человека подтверждается высоким уровнем распознавания у индивидуумов с латентной инфекцией из Южной Африки и отсутствием ответов у ранее не подвергавшихся инфекции субъектов. Поэтому ожидается, что Rv1753c будет иметь важное значение в предупреждении, лечении и диагностике латентной туберкулезной инфекции.

Хотя приведенное выше изобретение описано несколько подробно посредством иллюстраций и примеров для ясности понимания, среднему специалисту в данной области, благодаря разъяснениям в этом изобретении, будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть сделаны в нем без отклонения от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки, относящиеся к данной заявке, в том числе патенты и заявки на патент, включены в данное описание посредством ссылки в максимально возможной степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Во всем описании, реферате и формуле изобретения, которая следует далее, если контекст не требует иного, слово "содержать" и такие варианты, как "содержит" и "содержащий", будут пониматься как

означающие включение наличия указанных целого, стадии, группы целых или группы стадий, но не для исключения любого другого целого, стадии, группы целых или группы стадий.

<110> ГлаксоСмитКлайн Байолоджикалз с.а.,
Глаксо Груп Лимитед
Меттенс, Паскаль
Браун, Джеймс
Мерфи, Деннис

<120> НОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

<130> VB63087PCT

<150> US61/083692

<151> 2008-07-25

<160> 249

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1053

<212> HPT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Штамм H37Rv

<400> 1

```

Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
1      5      10      15
Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
      20      25      30
Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val
      35      40      45
Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala
      50      55      60
Met Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala
65      70      75      80
Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Met Ile Ala Glu
      85      90      95
Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala
      100      105      110
Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
      115      120      125
Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp
      130      135      140
Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala
145      150      155      160
Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala
      165      170      175
Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr
      180      185      190
Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn
      195      200      205
Leu Gly Ile Ala Asn Val Gly Gly Gly Asn Val Gly Asn Ala Asn Asn
210      215      220
Gly Leu Ala Asn Ile Gly Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe Gly
225      230      235      240

```

Ser Gly Asn Phe Gly Asn Ser Asn Ile Gly Ser Ala Ser Leu Gly Asn
 245 250 255
 Asn Asn Ile Gly Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val Gly
 260 265 270
 Asn Leu Gly Asn Leu Asn Thr Gly Phe Ala Asn Thr Gly Leu Gly Asn
 275 280 285
 Phe Gly Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr
 290 295 300
 Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn
 305 310 315 320
 Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser
 325 330 335
 Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly
 340 345 350
 Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser
 355 360 365
 Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380
 Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn
 385 390 395 400
 Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415
 Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 420 425 430
 Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445
 Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460
 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480
 Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525
 Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
 530 535 540
 Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu
 545 550 555 560
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile
 565 570 575
 Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn
 580 585 590
 Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser
 595 600 605
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr
 610 615 620
 Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Ser Ile
 625 630 635 640
 Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr Val Gly
 645 650 655
 Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln
 660 665 670
 Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu Pro Ala
 675 680 685
 Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe
 690 695 700
 Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile
 705 710 715 720
 Thr Val Pro Ala Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn


```

              725              730              735
Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe Thr Asn
              740              745              750
Gly Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val Val His
              755              760              765
Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu Pro
              770              775              780
Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly
              785              790              795              800
Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe
              805              810              815
Ala Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr
              820              825              830
Thr Gln Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val
              835              840              845
Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro
              850              855              860
Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln
              865              870              875              880
Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile
              885              890              895
Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr
              900              905              910
Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Thr
              915              920              925
Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly
              930              935              940
Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala
              945              950              955              960
Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ser Gly Phe
              965              970              975
Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala
              980              985              990
Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser
              995              1000              1005
Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg
              1010              1015              1020
Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala
              1025              1030              1035
Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
              1040              1045              1050

```

```

<210> 2
<211> 3162
<212> ДНК
<213> Mycobacterium tuberculosis

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Штамм H37Rv

```

```

<400> 2
atgaattttt ctgtactgcc gccggagatc aattcagcgc tgatatcgcg cggggcaggg 60
ccggaaccga tggcggcggc cgcgacggcc tgggacgggt tggccatgga attggcctcg 120
gccgcagcct ctttcggctc agtgacatcc ggactcgtgg gcggggcgctg gcagggcgcg 180
tcgtcgtcgg ccatggcggc agcggcagcc ccctatgcgg cgtggcttgc cgcggcgggc 240
gtccaggcgg agcagacggc cgtcaggct gcggcgatga tagccgagtt tgaagcggtc 300
aagacggcgg tggcgagcc gatgctgggt gcggccaacc gtgccgacct ggtgtcgtg 360
gtgatgtcga acctgtttgg acagaacgct ccggcgatcg ctgccattga agccacgtac 420
gagcaaatgt gggctgccga tgtgtcggcg atgtctgcct accatgccgg ggcacggcg 480

```

```

atcgccctgg cgtgtgcccc gttcagtaaa ccgctgcaga acctggctgg cttgccggct 540
tggttggcca gggcgcgccc tgcggcgccc atgaccgcag ccgcaggcat accggcgctt 600
ggggggggac ccaccgccat caacctgggc atagccaacg tcggcggttg caacgtcggc 660
aacgccaaca acggccttgc caacatcggc aacgccaacc ttggcaacta caatttcggg 720
tccggaaatt tcggtaactc caatatcggc tcagcaagcc tgggtaataa caacatcggc 780
ttcgggaacc tcggcagcaa caatgtcggc gtgggaaacc ttggcaatct caacacggg 840
tttgccaaca ccggcttggg caacttcggc ttgggaaca ctggcaaca caacatcggc 900
atcggtctta ccggcaaca ccagatcggg atcggcgggc tcaactcggg caccgggaat 960
ttcgattgt tcaactcggg cagcggaac gtcggcttct tcaactcggg caatggaaac 1020
tttggcatgg gaaactcggg taattttcaac accgttggct ggaattctgg acacgggaac 1080
acgggcttct tcaatgcggg ctcgtttaac accgttatgt tggacgtcgg caacgcgaac 1140
acaggcagcc tgaacaccgg cagttataac atgggcgact tcaatccggg gtcgtccaac 1200
accggcagct tcaacacggg aatgtctaac accggtttcc tcaacgcggg aaatatcaac 1260
actgggtgtc tcaatattgg ccacatgaat aatgggctgt tcaacacggg tgacatgaac 1320
aatggcgctc tctacgggg cgtggggcag ggcagcctgc agttcagtat tacgacacct 1380
gatctgactc tgccgcgct gcaaataccg gggatatcgg ttcccgctt cagtctgccg 1440
gcaataacgc tgccgtcgtc gaacatcccg gccgccacca caccggccaa catcacgctc 1500
ggcgccctca ccctgcccgg gttgacgttg ccgtcgttga acatcccgcc cgcacccaca 1560
ccagccaaca tcaccgtggg tgccctcagc ctgcccggtg tgacgttgcc gtcgttgaac 1620
atcccgcccg ccaccaacac agccaacatc accgtcggcg ccttcagcct gcccggttg 1680
acgttgccgt cgttgaacat cccggccgcc accacaccag ccaacatcac cgtcggcgcc 1740
ttcagcctgc ccgggttgac gttgcgctgc ttgaacatcc cggccgcgac cacaccagcc 1800
aacatcacgc tcgggcgctt cagcctgccc ggggtgacgt tgccgtcgtt gaacatcccg 1860
gccgcacca caccgcgcaa catcacgcta agcggcttcc agttgcctcc gctgagtatt 1920
ccttcgtag ccattccgcc ggtgacggtc ccgccatta cgtgggtgc ttttaatttg 1980
ccgccattgc agattccgga agtaactatt ccgcagctga cgataccgc gggtatcaca 2040
atcggtggct ttagtctacc tgcgatacat actcaaccga taacggctcg ccagattggc 2100
gtgggccaat ttggcctgcc ctccatagc tgggatgtt tctaagcac acctaggata 2160
acagtaccgg cttttggaat accctttacc ctacaattcc agaccaatgt gctgcgctt 2220
cagccgcccc gggcggggct tagtaacttc accaatggcg cctcatctt cgggtgagttt 2280
gacttacac aattgtgggt tccccatac acattgaccg gccctattgt catcggttca 2340
ttctttctgc ccgccttcaa catacccggg atcgatgtcc ccgctatcaa cgtcgatggc 2400
ttcacctcgc cgcagatcac caccccagct atcaccaccc cggagttcgc gatccctccg 2460
atcggcgtgg gcggtttcac tctgccgcag atcaccaccc aggaatcat caccgccggg 2520
ctaaccatca actcgatcgg cgtcggcggg ttaccctgc cgcaaatcac caccaccacc 2580
atcaccaccc caccgctgac catcgacccc atcaacctca ccggttcac cctccccaa 2640
atcaccaccc caccatcac caccaccacg ctgaccatcg acccatcaa cctcacggc 2700
ttcacctccc ccaaatcac caccaccacc atcaccaccc caccgctcac catcgagccg 2760
atcggcgtgg ggggcttcac caccgcccgc ctaccggtt ccggcatcca cctgcccagc 2820
accacgatcg gggccttcgc gatccccggg gggccgggct acttcaactc gagcacccg 2880
ccttcgtcgg gcttcttcaa ttccgggtcg ggcggcaact ccggcttcgg caacaacggc 2940
tcgggcctct cgggttgggt caacaccaac ccggccgggc tgttggcgcg ctgggctat 3000
cagaacttcg gcgggctatc ctcgggcttt tccaaacctg gcagcgcgct ctcaggcttc 3060
gccaacaggg gcatcctgcc gttctcggtg gccagcgtcg ttccggctt tgccaatatc 3120
ggcaccaccc tggcggttt cttccaaggc accacgtcct aa 3162

```

```

<210> 3
<211> 1105
<212> NPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> MISC_FEATURE

```

```

<400> 3
Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
1 5 10 15
Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
20 25 30

```

Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val
 35 40 45
 Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala
 50 55 60
 Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Met Ile Ala Glu
 85 90 95
 Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala
 100 105 110
 Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
 115 120 125
 Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp
 130 135 140
 Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala
 145 150 155 160
 Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala
 165 170 175
 Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr
 180 185 190
 Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn
 195 200 205
 Leu Gly Ile Ala Asn Val Gly Gly Asn Val Gly Asn Ala Asn Asn
 210 215 220
 Gly Leu Ala Asn Ile Gly Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Asn Phe Gly Asn Ser Asn Ile Gly Ser Ala Ser Leu Gly Asn
 245 250 255
 Asn Asn Ile Gly Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val Gly
 260 265 270
 Asn Leu Gly Asn Leu Asn Thr Gly Phe Ala Asn Thr Gly Leu Gly Asn
 275 280 285
 Phe Gly Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr
 290 295 300
 Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn
 305 310 315 320
 Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser
 325 330 335
 Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly
 340 345 350
 Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser
 355 360 365
 Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380
 Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn
 385 390 395 400
 Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415
 Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 420 425 430
 Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445
 Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460
 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480
 Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Thr Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala

Phe	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Ala	Ala	
	530						535				540					
Thr	Thr	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	
545					550					555						560
Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Pro	Ala	Asn	Ile	
				565					570						575	
Thr	Val	Gly	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Asn	
			580					585				590				
Ile	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Phe	Ser	
	595						600					605				
Leu	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	
	610					615					620					
Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	
625					630					635						640
Pro	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	
				645					650						655	
Gly	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro	
			660				665					670				
Ala	Ala	Thr	Thr	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Pro	
		675					680					685				
Pro	Leu	Ser	Ile	Pro	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Pro	Val	Thr	Val	Pro	Pro	
	690					695					700					
Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Phe	Asn	Leu	Pro	Pro	Leu	Gln	Ile	Pro	Glu	Val	
705					710					715						720
Thr	Ile	Pro	Gln	Leu	Thr	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Thr	Ile	Gly	Gly	Phe	
				725					730						735	
Ser	Leu	Pro	Ala	Ile	His	Thr	Gln	Pro	Ile	Thr	Val	Gly	Gln	Ile	Gly	
			740					745				750				
Val	Gly	Gln	Phe	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Gly	Trp	Asp	Val	Phe	Leu	Ser	
		755					760				765					
Thr	Pro	Arg	Ile	Thr	Val	Pro	Ala	Phe	Gly	Ile	Pro	Phe	Thr	Leu	Gln	
		770				775					780					
Phe	Gln	Thr	Asn	Val	Pro	Ala	Leu	Gln	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	
785				790						795						800
Thr	Phe	Thr	Asn	Gly	Ala	Leu	Ile	Phe	Gly	Glu	Phe	Asp	Leu	Pro	Gln	
				805					810						815	
Leu	Val	Val	His	Pro	Tyr	Thr	Leu	Thr	Gly	Pro	Ile	Val	Ile	Gly	Ser	
			820					825					830			
Phe	Phe	Leu	Pro	Ala	Phe	Asn	Ile	Pro	Gly	Ile	Asp	Val	Pro	Ala	Ile	
		835					840					845				
Asn	Val	Asp	Gly	Phe	Thr	Leu	Pro	Gln	Ile	Thr	Thr	Pro	Ala	Ile	Thr	
		850					855									

```

Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly
1010 1015 1020
Gly Asn Ser Gly Phe Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp
1025 1030 1035
Phe Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln
1040 1045 1050
Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly
1055 1060 1065
Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala
1070 1075 1080
Ser Val Val Ser Gly Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly
1085 1090 1095
Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
1100 1105

```

```

<210> 4
<211> 975
<212> NPPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Hramm Fl1

```

```

<400> 4
Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
1 5 10 15
Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
20 25 30
Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val
35 40 45
Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala
50 55 60
Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala
65 70 75 80
Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile Ala Glu
85 90 95
Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala
100 105 110
Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
115 120 125
Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp
130 135 140
Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala
145 150 155 160
Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala
165 170 175
Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Met Thr
180 185 190
Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn
195 200 205
Leu Gly Ile Ala Asn Val Gly Gly Asn Val Gly Asn Ala Asn Asn
210 215 220
Gly Leu Ala Asn Ile Gly Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe Gly
225 230 235 240
Ser Gly Asn Phe Gly Asn Ser Asn Ile Gly Ser Ala Ser Leu Gly Asn
245 250 255
Asn Asn Ile Gly Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val Gly
260 265 270
Asn Leu Gly Asn Leu Asn Thr Gly Phe Ala Asn Thr Gly Leu Gly Asn

```

	275		280		285
Phe Gly	Phe Gly Asn Thr Gly	Asn Asn Asn Ile Gly	Ile Gly Leu Thr		
290		295	300		
Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile	Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn				
305	310	315	320		
Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser					
	325	330	335		
Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly					
	340	345	350		
Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser					
	355	360	365		
Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu					
	370	375	380		
Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn					
385	390	395	400		
Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala					
	405	410	415		
Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly					
	420	425	430		
Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val					
	435	440	445		
Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu					
	450	455	460		
Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro					
465	470	475	480		
Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Thr Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala					
	485	490	495		
Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser					
	500	505	510		
Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala					
	515	520	525		
Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala					
	530	535	540		
Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu					
545	550	555	560		
Ser Ile Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr					
	565	570	575		
Val Gly Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile					
	580	585	590		
Pro Gln Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu					
	595	600	605		
Pro Ala Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly					
	610	615	620		
Gln Phe Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro					
625	630	635	640		
Arg Ile Thr Val Pro Ala Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln					
	645	650	655		
Thr Asn Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe					
	660	665	670		
Thr Asn Gly Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val					
	675	680	685		
Val His Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe					
	690	695	700		
Leu Pro Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val					
	705	710	715		
Asp Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro					
	725	730	735		
Glu Phe Ala Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln					
	740	745	750		
Ile Thr Thr Gln Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile					
	755	760	765		

Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr
 770 775 780
 Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu
 785 790 795 800
 Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp
 805 810 815
 Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro
 820 825 830
 Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe
 835 840 845
 Thr Thr Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr
 850 855 860
 Ile Gly Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe Asn Ser Ser
 865 870 875 880
 Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ser
 885 890 895
 Gly Phe Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe Asn Thr Asn
 900 905 910
 Pro Ala Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu
 915 920 925
 Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn
 930 935 940
 Arg Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala
 945 950 955 960
 Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
 965 970 975

<210> 5
 <211> 1050
 <212> NP
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Wtamm Haarlem A

<400> 5
 Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
 20 25 30
 Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val
 35 40 45
 Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala
 50 55 60
 Met Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Met Ile Ala Glu
 85 90 95
 Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala
 100 105 110
 Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
 115 120 125
 Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp
 130 135 140
 Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala
 145 150 155 160
 Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala
 165 170 175
 Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr

			180						185						190					
Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Pro	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro	Thr	Ala	Ile	Asn					
		195					200					205								
Leu	Gly	Ile	Ala	Asn	Val	Gly	Gly	Gly	Asn	Val	Gly	Asn	Ala	Asn	Asn					
		210					215					220								
Gly	Leu	Ala	Asn	Ile	Gly	Asn	Ala	Asn	Leu	Gly	Asn	Tyr	Asn	Phe	Gly					
225					230						235				240					
Ser	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asn					
				245					250					255						
Asn	Asn	Ile	Gly	Phe	Gly	Asn	Leu	Gly	Ser	Asn	Asn	Val	Gly	Val	Gly					
			260					265					270							
Asn	Leu	Gly	Asn	Leu	Asn	Thr	Gly	Phe	Ala	Asn	Thr	Gly	Leu	Gly	Asn					
		275					280					285								
Phe	Gly	Phe	Gly	Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	Asn	Ile	Gly	Ile	Gly	Leu	Thr					
		290					295				300									
Gly	Asn	Asn	Gln	Ile	Gly	Ile	Gly	Gly	Leu	Asn	Ser	Gly	Thr	Gly	Asn					
305					310						315				320					
Phe	Gly	Leu	Phe	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Val	Gly	Phe	Phe	Asn	Ser					
				325					330					335						
Gly	Asn	Gly	Asn	Phe	Gly	Ile	Gly	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Asn	Thr	Gly					
			340					345					350							
Gly	Trp	Asn	Ser	Gly	His	Gly	Asn	Thr	Gly	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser					
		355					360					365								
Phe	Asn	Thr	Gly	Met	Leu	Asp	Val	Gly	Asn	Ala	Asn	Thr	Gly	Ser	Leu					
		370				375					380									
Asn	Thr	Gly	Ser	Tyr	Asn	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Pro	Gly	Ser	Ser	Asn					
385					390					395					400					
Thr	Gly	Thr	Phe	Asn	Thr	Gly	Asn	Ala	Asn	Thr	Gly	Phe	Leu	Asn	Ala					
				405					410					415						
Gly	Asn	Ile	Asn	Thr	Gly	Val	Phe	Asn	Ile	Gly	His	Met	Asn	Asn	Gly					
			420					425					430							
Leu	Phe	Asn	Thr	Gly	Asp	Met	Asn	Asn	Gly	Val	Phe	Tyr	Arg	Gly	Val					
		435					440					445								
Gly	Gln	Gly	Ser	Leu	Gln	Phe	Ser	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Leu	Thr	Leu					
		450				455					460									
Pro	Pro	Leu	Gln	Ile	Pro	Gly	Ile	Ser	Val	Pro	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro					
465					470					475					480					
Ala	Ile	Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Thr	Ile	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Pro	Ala					
				485					490					495						
Asn	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser					
			500					505					510							
Leu	Asn	Ile	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr	Val	Gly	Ala					
		515					520													


```

Thr Asn Gly Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val
      675      680      685
Val His Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe
      690      695      700
Leu Pro Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val
705      710      715      720
Asp Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro
      725      730      735
Glu Phe Ala Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln
      740      745      750
Ile Thr Thr Gln Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile
      755      760      765
Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr
      770      775      780
Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu
785      790      795      800
Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp
      805      810      815
Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro
      820      825      830
Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe
      835      840      845
Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr
      850      855      860
Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr
865      870      875      880
Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr
      885      890      895
Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro
      900      905      910
Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Thr Pro Pro Leu
      915      920      925
Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala Phe Ala
      930      935      940
Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser
      945      950      955      960
Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ser Gly Phe Gly Asn Asn
      965      970      975
Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu Leu
      980      985      990
Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser
      995      1000      1005
Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu
      1010      1015      1020
Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala Asn Ile Gly
      1025      1030      1035
Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
      1040      1045      1050

```

```

<210> 6
<211> 1078
<212> PPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> MTram C

```

```

<400> 6
Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe

```

1		5		10		15
Ala Gly Ala Gly	Pro Glu Pro Met	Ala Ala Ala Ala	Thr Ala Trp Asp			
	20	25	30			
Gly Leu Ala Met	Glu Leu Ala Ser	Ala Ala Ala Ser	Phe Gly Ser Val			
	35	40	45			
Thr Ser Gly Leu	Val Gly Gly Ala	Trp Gln Gly Ala	Ser Ser Ser Ala			
	50	55	60			
Met Ala Ala Ala	Ala Ala Pro Tyr	Ala Ala Trp Leu	Ala Ala Ala Ala			
	65	70	75			
Val Gln Ala Glu	Gln Thr Ala Ala	Gln Ala Ala Ala	Met Ile Ala Glu			
	85	90	95			
Phe Glu Ala Val	Lys Thr Ala Val	Val Gln Pro Met	Leu Val Ala Ala			
	100	105	110			
Asn Arg Ala Asp	Leu Val Ser Leu	Val Met Ser Asn	Leu Phe Gly Gln			
	115	120	125			
Asn Ala Pro Ala	Ile Ala Ala Ile	Glu Ala Thr Tyr	Glu Gln Met Trp			
	130	135	140			
Ala Ala Asp Val	Ser Ala Met Ser	Ala Tyr His Ala	Gly Ala Ser Ala			
	145	150	155			
Ile Ala Ser Ala	Leu Ser Pro Phe	Ser Lys Pro Leu	Gln Asn Leu Ala			
	165	170	175			
Gly Leu Pro Ala	Trp Leu Ala Ser	Gly Ala Pro Ala	Ala Ala Met Thr			
	180	185	190			
Ala Ala Ala Gly	Ile Pro Ala Leu	Ala Gly Gly Pro	Thr Ala Ile Asn			
	195	200	205			
Leu Gly Ile Ala	Asn Val Gly Gly	Gly Asn Val Gly	Asn Ala Asn Asn			
	210	215	220			
Gly Leu Ala Asn	Ile Gly Asn Ala	Asn Leu Gly Asn	Tyr Asn Phe Gly			
	225	230	235			
Ser Gly Asn Phe	Gly Asn Ser Asn	Ile Gly Ser Ala	Ser Leu Gly Asn			
	245	250	255			
Asn Asn Ile Gly	Phe Gly Asn Leu	Gly Ser Asn Asn	Val Gly Val Gly			
	260	265	270			
Asn Leu Gly Asn	Leu Asn Thr Gly	Phe Ala Asn Thr	Gly Leu Gly Asn			
	275	280	285			
Phe Gly Phe Gly	Asn Thr Gly Asn	Asn Asn Ile Gly	Ile Gly Leu Thr			
	290	295	300			
Gly Asn Asn Gln	Ile Gly Ile Gly	Gly Leu Asn Ser	Gly Thr Gly Asn			
	305	310	315			
Phe Gly Leu Phe	Asn Ser Gly Ser	Gly Asn Val Gly	Phe Phe Asn Ser			
	325	330	335			
Gly Asn Gly Asn	Phe Gly Ile Gly	Asn Ser Gly Asn	Phe Asn Thr Gly			
	340	345	350			
Gly Trp Asn Ser	Gly His Gly Asn	Thr Gly Phe Phe	Asn Ala Gly Ser			
	355	360	365			
Phe Asn Thr Gly	Met Leu Asp Val	Gly Asn Ala Asn	Thr Gly Ser Leu			
	370	375	380			
Asn Thr Gly Ser	Tyr Asn Met Gly	Asp Phe Asn Pro	Gly Ser Ser Asn			
	385	390	395			
Thr Gly Thr Phe	Asn Thr Gly Asn	Ala Asn Thr Gly	Phe Leu Asn Ala			
	405	410	415			
Gly Asn Ile Asn	Thr Gly Val Phe	Asn Ile Gly His	Met Asn Asn Gly			
	420	425	430			
Leu Phe Asn Thr	Gly Asp Met Asn	Asn Gly Val Phe	Tyr Arg Gly Val			
	435	440	445			
Gly Gln Gly Ser	Leu Gln Phe Ser	Ile Thr Thr Pro	Asp Leu Thr Leu			
	450	455	460			
Pro Pro Leu Gln	Ile Pro Gly Ile	Ser Val Pro Ala	Phe Ser Leu Pro			
	465	470	475			
Ala Ile Thr Leu	Pro Ser Leu Asn	Ile Pro Ala Ala	Thr Thr Pro Ala			
	485	490	495			

```

Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
500 505 510
Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
515 520 525
Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
530 535 540
Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu
545 550 555 560
Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile
565 570 575
Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn
580 585 590
Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser
595 600 605
Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr
610 615 620
Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Ser Ile
625 630 635 640
Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr Val Gly
645 650 655
Ala Phe Asn Leu Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln
660 665 670
Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu Pro Ala
675 680 685
Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe
690 695 700
Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile
705 710 715 720
Thr Val Pro Ala Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn
725 730 735
Val Pro Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe Thr Asn
740 745 750
Gly Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val Val His
755 760 765
Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu Pro
770 775 780
Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly
785 790 795 800
Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe
805 810 815
Ala Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr
820 825 830
Thr Gln Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val
835 840 845
Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro
850 855 860
Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln
865 870 875 880
Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile
885 890 895
Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr
900 905 910
Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu
915 920 925
Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu
930 935 940
Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Thr Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly
945 950 955 960
Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly
965 970 975
Pro Gly Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn

```

```

          980                      985                      990
Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ser Gly Phe Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu
    995                      1000                      1005
Ser Gly Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu Leu Gly Gly Ser
    1010                      1015                      1020
Gly Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu
    1025                      1030                      1035
Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe
    1040                      1045                      1050
Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn
    1055                      1060                      1065
Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser
    1070                      1075

```

```

<210> 7
<211> 1026
<212> IPT
<213> Mycobacterium bovis

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Mramm BLX

```

```

<400> 7
Met Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
1      5      10      15
Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp
    20      25      30
Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val
    35      40      45
Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala
    50      55      60
Met Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala
65      70      75      80
Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile Ala Glu
    85      90      95
Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala
    100     105     110
Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
    115     120     125
Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp
    130     135     140
Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala
145     150     155     160
Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala
    165     170     175
Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr
    180     185     190
Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn
    195     200     205
Leu Gly Ile Ala Asn Val Gly Gly Asn Val Gly Asn Ala Asn Asn
    210     215     220
Gly Leu Ala Asn Ile Gly Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe Gly
225     230     235     240
Ser Gly Asn Phe Gly Asn Ser Asn Ile Gly Ser Ala Ser Leu Gly Asn
    245     250     255
Asn Asn Ile Gly Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val Gly
    260     265     270
Asn Leu Gly Asn Leu Asn Thr Gly Phe Ala Asn Thr Gly Leu Gly Asn
    275     280     285

```

Phe Gly Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile Gly Ile Gly Leu Thr
 290 295 300
 Gly Asn Asn Gln Ile Gly Ile Gly Gly Leu Asn Ser Gly Thr Gly Asn
 305 310 315 320
 Phe Gly Leu Phe Asn Ser Gly Ser Gly Asn Val Gly Phe Phe Asn Ser
 325 330 335
 Gly Asn Gly Asn Phe Gly Ile Gly Asn Ser Gly Asn Phe Asn Thr Gly
 340 345 350
 Gly Trp Asn Ser Gly His Gly Asn Thr Gly Phe Phe Asn Ala Gly Ser
 355 360 365
 Phe Asn Thr Gly Met Leu Asp Val Gly Asn Ala Asn Thr Gly Ser Leu
 370 375 380
 Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met Gly Asp Phe Asn Pro Gly Ser Ser Asn
 385 390 395 400
 Thr Gly Thr Phe Asn Thr Gly Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 405 410 415
 Gly Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile Gly His Met Asn Asn Gly
 420 425 430
 Leu Phe Asn Thr Gly Asp Met Asn Asn Gly Val Phe Tyr Arg Gly Val
 435 440 445
 Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 450 455 460
 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro
 465 470 475 480
 Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Thr Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala
 485 490 495
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
 515 520 525
 Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
 530 535 540
 Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu
 545 550 555 560
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile
 565 570 575
 Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val Ala
 580 585 590
 Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile Thr Val Gly Ala Phe Asn Leu
 595 600 605
 Pro Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln Leu Thr Ile Pro
 610 615 620
 Ala Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu Pro Ala Ile His Thr Gln
 625 630 635 640
 Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe Gly Leu Pro Ser
 645 650 655
 Ile Gly Trp Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile Thr Val Pro Ala
 660 665 670
 Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala Leu
 675 680 685
 Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu Ser Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile
 690 695 700
 Phe Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val Val His Pro Tyr Thr Leu
 705 710 715 720
 Thr Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu Pro Ala Phe Asn Ile
 725 730 735
 Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly Phe Thr Leu Pro
 740 745 750
 Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe Ala Ile Pro Pro
 755 760 765
 Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Gln Glu Ile

```

      770              775              780
Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr
785              790              795              800
Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile
      805              810              815
Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro
      820              825              830
Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly
      835              840              845
Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu
      850              855              860
Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr
865              870              875              880
Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val
      885              890              895
Gly Gly Phe Thr Thr Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro
      900              905              910
Ser Thr Thr Ile Gly Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe
      915              920              925
Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly
      930              935              940
Gly Asn Ser Gly Phe Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe
945              950              955              960
Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe
      965              970              975
Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly
      980              985              990
Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser
      995              1000              1005
Gly Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly
      1010              1015              1020
Thr Thr Ser
      1025

```

```

<210> 8
<211> 110
<212> HPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

```

```

<220>
<221> mat_peptide
<222> (29)..(110)

```

```

<400> 8
Met Arg Leu Ser Leu Thr Ala Leu Ser Ala Gly Val Gly Ala Val Ala
      -25              -20              -15
Met Ser Leu Thr Val Gly Ala Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Val Asp
      -10              -5              -1 1
Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val Val Ala Ala Leu
5              10              15              20
Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala Gln Phe Asn Ala Ser Pro Val
      25              30              35
Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu Ala Ala Pro Pro Pro Gln Arg
      40              45              50
Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala Val Pro Gly Ala Ala Gln Tyr
      55              60              65
Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly Ser Cys Asn Asn Tyr
      70              75              80

```

<210> 9
 <211> 97
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 9
 Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu Val Ala Ser Gln Ser
 1 5 10 15
 Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His Thr Ile Gly Gln Ala
 20 25 30
 Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His Gln Gly Glu Ser Ser
 35 40 45
 Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val Ala Ala Ala Lys
 50 55 60
 Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn Leu Gly Glu Ala Ala
 65 70 75 80
 Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Thr Tyr Thr Gly
 85 90 95
 Phe

<210> 10
 <211> 94
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 10
 Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met
 1 5 10 15
 Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val
 20 25 30
 Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Val
 35 40 45
 Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile
 50 55 60
 Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn
 65 70 75 80
 Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala
 85 90

<210> 11
 <211> 132
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 11
 Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe
 1 5 10 15
 Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly
 35 40 45
 Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val
 50 55 60
 Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val
 65 70 75 80
 Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala
 85 90 95
 Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp

100 105 110
 Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu
 115 120 125
 Gly Pro Pro Ala
 130

<210> 12
 <211> 195
 <212> NPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 12
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 20 25 30
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 35 40 45
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 50 55 60
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 65 70 75 80
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 85 90 95
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 100 105 110
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 130 135 140
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
 165 170 175
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 180 185 190
 Ala Ala Ser
 195

<210> 13
 <211> 391
 <212> NPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<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 Gln 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 Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr
 65 70 75 80
 Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala
 85 90 95
 Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala
 100 105 110

Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly
 115 120 125
 Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met
 130 135 140
 Trp Ala Gln Asp Ala Ala Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala
 145 150 155 160
 Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr
 165 170 175
 Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser
 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 Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu
 210 215 220
 Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val
 245 250 255
 Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala
 260 265 270
 Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala
 275 280 285
 Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly
 290 295 300
 Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val
 305 310 315 320
 Pro Gln Ala Trp Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg
 325 330 335
 Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly
 340 345 350
 Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly
 355 360 365
 Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met
 370 375 380
 Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
 385 390

<210> 14
 <211> 392
 <212> NP
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 14
 Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
 1 5 10 15
 Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala
 35 40 45
 Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala
 50 55 60
 Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln
 85 90 95
 Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val
 100 105 110
 Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala
 115 120 125
 Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val

```

      130      135      140
Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala
145      150      155      160
Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala
      165      170      175
Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Ile
      180      185      190
Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys
      195      200      205
Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg
      210      215      220
Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr
225      230      235      240
Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala
      245      250      255
Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser
      260      265      270
Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe
      275      280      285
Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln
      290      295      300
Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln
305      310      315      320
Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met
      325      330      335
Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser
      340      345      350
Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr
      355      360      365
Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln
      370      375      380
Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val
385      390

```

```

<210> 15
<211> 423
<212> NPRT
<213> Mycobacterium tuberculosis

```

```

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

```

```

Ala Ser Ala Leu Pro Pro Phe Thr Pro Pro Val Gln Gly Thr Gly Pro
      165      170      175
Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala Gly Ala Gly
      180      185      190
Ala Val Ala Asp Ala Gln Ala Thr Leu Ala Gln Leu Pro Pro Gly Ile
      195      200      205
Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala Ala Asn Ala Asp Pro Leu Thr
      210      215      220
Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr Leu Asn Pro Gln Val Gly Ser
      225      230      235      240
Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro Ile Gly Glu Leu Asp Val Ile
      245      250      255
Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr Gly Ser Ile Ala Leu Ala Ile
      260      265      270
Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile Gly Leu Tyr Gly Asn Ala Gly
      275      280      285
Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro Leu Ser Ser Ala Thr Asp Glu
      290      295      300
Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala
      305      310      315      320
Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val Gly Ala Leu Ser Val Pro His Ser
      325      330      335
Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu Ile Gln Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro
      340      345      350
Thr Phe Ser Ser Ser Ala Gly Ala Asp Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met
      355      360      365
Pro Ala Gly Leu Leu Ser Gly Met Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg
      370      375      380
Gly Thr Thr Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly
      385      390      395      400
Gln Glu Asp Gly Arg Lys Pro Pro Val Val Val Ile Arg Glu Gln Pro
      405      410      415
Pro Pro Gly Asn Pro Pro Arg
      420

```

```

<210> 16
<211> 95
<212> IPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

```

```

<220>
<221> INIT_MET
<222> (1)..(1)

```

```

<220>
<221> mat_peptide
<222> (2)..(95)

```

```

<400> 16
Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
-1 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 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
Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala

```

```

80                               85                               90

<210> 17
<211> 338
<212> NPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>
<221> mat_peptide
<222> (43)..(338)

<400> 17
Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg
-40 -35 -30
Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val
-25 -20 -15
Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly
-10 -5 -1 1 5
Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp
10 15 20
Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr
25 30 35
Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile
40 45 50
Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val
55 60 65 70
Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro
75 80 85
Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu
90 95 100
Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro
105 110 115
Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu
120 125 130
Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met
135 140 145 150
Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly
155 160 165
Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly
170 175 180
Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val
185 190 195
Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn
200 205 210
Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu
215 220 225 230
Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn
235 240 245
Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr
250 255 260
His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp
265 270 275
Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln
280 285 290
Gly Ala
295

<210> 18
<211> 325
<212> NPT

```

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<221> mat_peptide

<222> (41)..(325)

<400> 18

```

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met
-40          -35          -30          -25
Ile Gly Thr Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala
          -20          -15          -10
Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val
          -5          -1  1          5
Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val
10          15          20
Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp
25          30          35          40
Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro
          45          50          55
Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val
60          65          70
Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly
75          80          85
Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu
90          95          100
Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser
105          110          115          120
Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala
125          130          135
Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu
140          145          150
Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met
155          160          165
Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser
170          175          180
Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu
185          190          195          200
Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro
205          210          215
Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe
220          225          230
Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly
235          240          245
Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp
250          255          260
Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser
265          270          275          280
Ser Leu Gly Ala Gly
285

```

<210> 19

<211> 144

<212> NPPT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>

<221> INIT_MET

<222> (1)..(1)

<220>

<221> mat_peptide
 <222> (2)..(144)

<400> 19
 Met Ala Thr Thr Leu Pro Val Gln Arg His Pro Arg Ser Leu Phe Pro
 -1 1 5 10 15
 Glu Phe Ser Glu Leu Phe Ala Ala Phe Pro Ser Phe Ala Gly Leu Arg
 20 25 30
 Pro Thr Phe Asp Thr Arg Leu Met Arg Leu Glu Asp Glu Met Lys Glu
 35 40 45
 Gly Arg Tyr Glu Val Arg Ala Glu Leu Pro Gly Val Asp Pro Asp Lys
 50 55 60
 Asp Val Asp Ile Met Val Arg Asp Gly Gln Leu Thr Ile Lys Ala Glu
 65 70 75
 Arg Thr Glu Gln Lys Asp Phe Asp Gly Arg Ser Glu Phe Ala Tyr Gly
 80 85 90 95
 Ser Phe Val Arg Thr Val Ser Leu Pro Val Gly Ala Asp Glu Asp Asp
 100 105 110
 Ile Lys Ala Thr Tyr Asp Lys Gly Ile Leu Thr Val Ser Val Ala Val
 115 120 125
 Ser Glu Gly Lys Pro Thr Glu Lys His Ile Gln Ile Arg Ser Thr Asn
 130 135 140

<210> 20
 <211> 228
 <212> NPRT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (24)..(228)

<400> 20
 Met Arg Ile Lys Ile Phe Met Leu Val Thr Ala Val Val Leu Leu Cys
 -20 -15 -10
 Cys Ser Gly Val Ala Thr Ala Ala Pro Lys Thr Tyr Cys Glu Glu Leu
 -5 -1 1 5
 Lys Gly Thr Asp Thr Gly Gln Ala Cys Gln Ile Gln Met Ser Asp Pro
 10 15 20 25
 Ala Tyr Asn Ile Asn Ile Ser Leu Pro Ser Tyr Tyr Pro Asp Gln Lys
 30 35 40
 Ser Leu Glu Asn Tyr Ile Ala Gln Thr Arg Asp Lys Phe Leu Ser Ala
 45 50 55
 Ala Thr Ser Ser Thr Pro Arg Glu Ala Pro Tyr Glu Leu Asn Ile Thr
 60 65 70
 Ser Ala Thr Tyr Gln Ser Ala Ile Pro Pro Arg Gly Thr Gln Ala Val
 75 80 85
 Val Leu Lys Val Tyr Gln Asn Ala Gly Gly Thr His Pro Thr Thr Thr
 90 95 100 105
 Tyr Lys Ala Phe Asp Trp Asp Gln Ala Tyr Arg Lys Pro Ile Thr Tyr
 110 115 120
 Asp Thr Leu Trp Gln Ala Asp Thr Asp Pro Leu Pro Val Val Phe Pro
 125 130 135
 Ile Val Gln Gly Glu Leu Ser Lys Gln Thr Gly Gln Gln Val Ser Ile
 140 145 150
 Ala Pro Asn Ala Gly Leu Asp Pro Val Asn Tyr Gln Asn Phe Ala Val
 155 160 165
 Thr Asn Asp Gly Val Ile Phe Phe Phe Asn Pro Gly Glu Leu Leu Pro
 170 175 180 185
 Glu Ala Ala Gly Pro Thr Gln Val Leu Val Pro Arg Ser Ala Ile Asp

```

Ser Met Leu Ala      190      195      200
                205

<210>  21
<211> 355
<212> IPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>
<221> mat_peptide
<222> (33)..(355)

<400>  21
Met Ser Asn Ser Arg Arg Arg Ser Leu Arg Trp Ser Trp Leu Leu Ser
      -30      -25      -20
Val Leu Ala Ala Val Gly Leu Gly Leu Ala Thr Ala Pro Ala Gln Ala
      -15      -10      -5      -1
Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
  1          5          10          15
Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
      20      25      30
Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
      35      40      45
Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
      50      55      60
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
      65      70      75      80
Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
      85      90      95
Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
      100      105      110
Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
      115      120      125
Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
      130      135      140
Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
      145      150      155      160
Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
      165      170      175
Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
      180      185      190
Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala
      195      200      205
Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly
      210      215      220
Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu
      225      230      235      240
Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val
      245      250      255
Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile
      260      265      270
Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp
      275      280      285
Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln
      290      295      300
Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly
      305      310      315      320
Pro Pro Ala

```

<210> 22
 <211> 323
 <212> PPT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Ser/Ala-мутант зрелого Mtb32A

<400> 22

```

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
1          5          10          15
Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
          20          25          30
Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
          35          40          45
Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
          50          55          60
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
65          70          75          80
Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
          85          90          95
Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
          100          105          110
Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
          115          120          125
Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
          130          135          140
Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
145          150          155          160
Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
          165          170          175
Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
          180          185          190
Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala
          195          200          205
Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly
210          215          220
Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu
225          230          235          240
Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val
          245          250          255
Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile
          260          265          270
Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp
275          280          285
Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln
290          295          300
Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly
305          310          315          320
Pro Pro Ala

```

<210> 23
 <211> 96
 <212> PPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 23


```

Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly
1      5      10      15
Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile
      20      25      30
Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly
      35      40      45
Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp
      50      55      60
Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr
      65      70      75      80
Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly
      85      90      95

```

```

<210> 24
<211> 723
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Mtb72f

```

```

<400> 24
Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
1      5      10      15
Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
      20      25      30
Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
      35      40      45
Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
      50      55      60
Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
      65      70      75      80
Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
      85      90      95
Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
      100      105      110
Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
      115      120      125
Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
      130      135      140
Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
      145      150      155      160
Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
      165      170      175
Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
      180      185      190
Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
      195      200      205
Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
      210      215      220
Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
      225      230      235      240
Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
      245      250      255
Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
      260      265      270
Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
      275      280      285
Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
      290      295      300

```

Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 530 535 540
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 565 570 575
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 595 600 605
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 645 650 655
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 675 680 685
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 705 710 715 720
 Ala Ala Ser

<210> 25
 <211> 723
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> M72

<400> 25

```

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
1      5      10      15
Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
20      25      30
Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
35      40      45
Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
50      55      60
Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
65      70      75      80
Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
85      90      95
Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
100     105     110
Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
115     120     125
Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
130     135     140
Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
145     150     155     160
Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
165     170     175
Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
180     185     190
Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
195     200     205
Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
210     215     220
Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
225     230     235     240
Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
245     250     255
Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
260     265     270
Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
275     280     285
Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
290     295     300
Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
305     310     315     320
Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
325     330     335
Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
340     345     350
Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
355     360     365
His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
370     375     380
Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
385     390     395     400
Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
405     410     415
Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
420     425     430
Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
435     440     445
Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln

```

```

      450              455              460
Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
465              470              475              480
Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
      485              490              495
Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
      500              505              510
Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
      515              520              525
Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
      530              535              540
Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
545              550              555              560
Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
      565              570              575
Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
      580              585              590
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
      595              600              605
Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
      610              615              620
Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
625              630              635              640
Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
      645              650              655
Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
      660              665              670
Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
      675              680              685
Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
      690              695              700
Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
705              710              715              720
Ala Ala Ser

```

```

<210> 26
<211> 702
<212> PPT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Mtb71f

```

```

<400> 26
Asp Pro Val Asp Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val
1      5      10      15
Val Ala Ala Leu Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala Gln Phe Asn
      20      25      30
Ala Ser Pro Val Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu Ala Ala Pro
      35      40      45
Pro Pro Gln Arg Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala Val Pro Gly
      50      55      60
Ala Ala Gln Tyr Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly Ser Cys Asn
65      70      75      80
Asn Tyr Glu Leu Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala
      85      90      95
His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Ser Leu Glu Ala Glu His
      100     105     110
Gln Ala Ile Val Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly

```

115						120						125					
Ala	Gly	Ser	Val	Ala	Cys	Gln	Glu	Phe	Ile	Thr	Gln	Leu	Gly	Arg	Asn		
130						135						140					
Phe	Gln	Val	Ile	Tyr	Glu	Gln	Ala	Asn	Ala	His	Gly	Gln	Lys	Val	Gln		
145						150						155					
Ala	Ala	Gly	Asn	Asn	Met	Ala	Gln	Thr	Asp	Ser	Ala	Val	Gly	Ser	Ser		
165						170						175					
Trp	Ala	Thr	Ser	Met	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala	His	Ile	Pro	Gln	Leu	Val		
180						185						190					
Ala	Ser	Gln	Ser	Ala	Phe	Ala	Ala	Lys	Ala	Gly	Leu	Met	Arg	His	Thr		
195						200						205					
Ile	Gly	Gln	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Met	Ser	Ala	Gln	Ala	Phe	His	Gln		
210						215						220					
Gly	Glu	Ser	Ser	Ala	Ala	Phe	Gln	Ala	Ala	His	Ala	Arg	Phe	Val	Ala		
225						230						235					
Ala	Ala	Ala	Lys	Val	Asn	Thr	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Gln	Ala	Asn	Leu		
245						250						255					
Gly	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Tyr	Val	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser		
260						265						270					
Thr	Tyr	Thr	Gly	Phe	Asp	Ile	Met	Asp	Phe	Gly	Leu	Leu	Pro	Pro	Glu		
275						280						285					
Val	Asn	Ser	Ser	Arg	Met	Tyr	Ser	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Ser	Met	Leu		
290						295						300					
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Trp	Asp	Gly	Val	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Ser	Ala		
305						310						315					
Ala	Val	Ser	Tyr	Gly	Ser	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Ile	Val	Glu	Pro	Trp		
325						330						335					
Met	Gly	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Met	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Pro	Tyr	Val		
340						345						350					
Gly	Trp	Leu	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Ala	Lys	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln		
355						360						365					
Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Phe	Gly	Thr	Ala	Phe	Ala	Met	Thr	Val		
370						375						380					
Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Ala	Ala	Asn	Arg	Ser	Arg	Leu	Met	Ser	Leu	Val		
385						390						395					
Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Thr	Gln		
405						410						415					
Ala	Glu	Tyr	Ala	Glu	Met	Trp	Ala	Gln	Asp	Ala	Ala	Val	Met	Tyr	Ser		
420						425						430					
Tyr	Glu	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	Pro	Phe	Thr	Pro		
435						440						445					
Pro	Val	Gln	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala		
450						455						460					
Thr	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Asp	Ala	Gln	Ala	Thr	Leu		
465						470						475					
Ala	Gln	Leu	Pro	Pro	Gly	Ile	Leu	Ser	Asp	Ile	Leu	Ser	Ala	Leu	Ala		
485						490						495					
Ala	Asn	Ala	Asp	Pro	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Ile	Ala	Ser	Thr		
500						505						510					
Leu	Asn	Pro	Gln	Val	Gly	Ser	Ala	Gln	Pro	Ile	Val	Ile	Pro	Thr	Pro		
515						520						525					
Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Val	Ile	Ala	Leu	Tyr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Thr		
530						535						540					
Gly	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Ile	Thr	Asn	Thr	Ala	Arg	Pro	Trp	His	Ile		
545						550						555					
Gly	Leu	Tyr	Gly	Asn	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly	Pro	Thr	Gln	Gly	His	Pro		
565						570						575					
Leu	Ser	Ser	Ala	Thr	Asp												

Ala Leu Ser Val Pro His Ser Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu Ile Gln
 610 615 620
 Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro Thr Phe Ser Ser Ser Ala Gly Ala Asp
 625 630 635 640
 Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met Pro Ala Gly Leu Leu Ser Gly Met Ala
 645 650 655
 Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Gly Thr Thr Gly Gly Gly Gly Thr Arg
 660 665 670
 Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly Gln Glu Asp Gly Arg Lys Pro Pro Val
 675 680 685
 Val Val Ile Arg Glu Gln Pro Pro Gly Asn Pro Pro Arg
 690 695 700

<210> 27
 <211> 920
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> M72-Mtb9.9-Mtb9.8

<400> 27
 Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
 20 25 30
 Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
 35 40 45
 Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
 50 55 60
 Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
 65 70 75 80
 Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
 85 90 95
 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
 100 105 110
 Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
 115 120 125
 Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
 130 135 140
 Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300

Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 530 535 540
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 565 570 575
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 595 600 605
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 645 650 655
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 675 680 685
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 705 710 715 720
 Ala Ala Ser Ser Thr Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp
 725 730 735
 Ala His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu
 740 745 750
 His Gln Ala Ile Val Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly
 755 760 765
 Gly Ala Gly Ser Val Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg
 770 775 780
 Asn Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val

```

785          790          795          800
Gln Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser
      805      810      815
Ser Trp Ala Thr Ser Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu
      820      825      830
Val Ala Ser Gln Ser Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His
      835      840      845
Thr Ile Gly Gln Ala Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His
      850      855      860
Gln Gly Glu Ser Ser Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val
      865      870      875      880
Ala Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn
      885      890      895
Leu Gly Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala
      900      905      910
Ser Thr Tyr Thr Gly Phe Pro Trp
      915      920

```

```

<210> 28
<211> 1010
<212> PPT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> M103

```

```

<400> 28
Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
1      5      10      15
Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
20      25      30
Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
35      40      45
Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
50      55      60
Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
65      70      75      80
Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
85      90      95
Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
100     105     110
Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
115     120     125
Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
130     135     140
Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
145     150     155     160
Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
165     170     175
Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
180     185     190
Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
195     200     205
Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
210     215     220
Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
225     230     235     240
Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
245     250     255
Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn

```


[illegible]

Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg
 755 760 765
 Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu
 770 775 780
 Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln
 785 790 795 800
 Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly
 805 810 815
 Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln
 820 825 830
 Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile
 835 840 845
 Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His
 850 855 860
 Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro
 865 870 875 880
 Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala
 885 890 895
 Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala
 900 905 910
 Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn
 915 920 925
 Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu
 930 935 940
 Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser
 945 950 955 960
 Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn
 965 970 975
 Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp
 980 985 990
 Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly
 995 1000 1005
 Ala Gly
 1010

<210> 29
 <211> 1148
 <212> PPT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> M114

<400> 29
 Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
 20 25 30
 Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
 35 40 45
 Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
 50 55 60
 Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
 65 70 75 80
 Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
 85 90 95
 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
 100 105 110
 Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
 115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
 130 135 140
 Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 530 535 540
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 565 570 575
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 595 600 605
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala

```

610          615          620
Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
625          630          635          640
Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
          645          650          655
Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
          660          665          670
Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
          675          680          685
Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
          690          695          700
Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
705          710          715          720
Ala Ala Ser Ser Thr Met Asp Phe Gly Leu Leu Pro Pro Glu Val Asn
          725          730          735
Ser Ser Arg Met Tyr Ser Gly Pro Gly Pro Glu Ser Met Leu Ala Ala
          740          745          750
Ala Ala Ala Trp Asp Gly Val Ala Ala Glu Leu Thr Ser Ala Ala Val
          755          760          765
Ser Tyr Gly Ser Val Val Ser Thr Leu Ile Val Glu Pro Trp Met Gly
          770          775          780
Pro Ala Ala Ala Ala Met Ala Ala Ala Ala Thr Pro Tyr Val Gly Trp
785          790          795          800
Leu Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Lys Glu Thr Ala Thr Gln Ala Arg
          805          810          815
Ala Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Ala Phe Ala Met Thr Val Pro Pro
          820          825          830
Ser Leu Val Ala Ala Asn Arg Ser Arg Leu Met Ser Leu Val Ala Ala
          835          840          845
Asn Ile Leu Gly Gln Asn Ser Ala Ala Ile Ala Ala Thr Gln Ala Glu
          850          855          860
Tyr Ala Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Val Met Tyr Ser Tyr Glu
865          870          875          880
Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Leu Pro Pro Phe Thr Pro Pro Val
          885          890          895
Gln Gly Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gln
          900          905          910
Ala Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Asp Ala Gln Ala Thr Leu Ala Gln
          915          920          925
Leu Pro Pro Gly Ile Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala Ala Asn
          930          935          940
Ala Asp Pro Leu Thr Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr Leu Asn
945          950          955          960
Pro Gln Val Gly Ser Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro Ile Gly
          965          970          975
Glu Leu Asp Val Ile Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr Gly Ser
          980          985          990
Ile Ala Leu Ala Ile Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile Gly Leu
          995          1000          1005
Tyr Gly Asn Ala Gly Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro Leu
          1010          1015          1020
Ser Ser Ala Thr Asp Glu Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly
          1025          1030          1035
Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val
          1040          1045          1050
Gly Ala Leu Ser Val Pro His Ser Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu
          1055          1060          1065
Ile Gln Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro Thr Phe Ser Ser Ser Ala
          1070          1075          1080
Gly Ala Asp Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met Pro Ala Gly Leu Leu
          1085          1090          1095

```

Ser Gly Met Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Gly Thr Thr Gly
 1100 1105 1110
 Gly Gly Gly Thr Arg Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly Gln Glu Asp
 1115 1120 1125
 Gly Arg Lys Pro Pro Val Val Val Ile Arg Glu Gln Pro Pro Pro
 1130 1135 1140
 Gly Asn Pro Pro Arg
 1145

<210> 30
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 30
 Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala Met
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 31
 Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 32
 Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 33
 Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala Asn
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 34
 Leu Val Ala Ala Asn Arg Ala Asp Leu
 1 5

<210> 35

<211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 35
 Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu
 1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 36
 Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 37
 Tyr Glu Gln Met Trp Ala Ala Asp Val
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 38
 Trp Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser
 1 5

<210> 39
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 39
 Leu Gln Asn Leu Ala Gly Leu Pro Ala
 1 5

<210> 40
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 40
 Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val
 1 5

<210> 41

<211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 41
 Phe Gly Asn Thr Gly Asn Asn Asn Ile
 1 5

 <210> 42
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 42
 Phe Leu Asn Ala Gly Asn Ile Asn Thr
 1 5

 <210> 43
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 43
 Leu Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp
 1 5

 <210> 44
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 44
 Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile
 1 5

 <210> 45
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 45
 Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe
 1 5

 <210> 46
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 46
 Leu Gln Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala
 1 5

 <210> 47
 <211> 9

<212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 47
 Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala Leu Gln
 1 5

 <210> 48
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 48
 Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile
 1 5

 <210> 49
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 49
 Phe Leu Pro Ala Phe Asn Ile Pro Gly
 1 5

 <210> 50
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 50
 Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr
 1 5

 <210> 51
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 51
 Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr
 1 5

 <210> 52
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 52
 Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser
 1 5

 <210> 53
 <211> 9
 <212> ПРТ

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 53
Phe Asn Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ser
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 54
Phe Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 55
Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 56
Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 57
Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 58
Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 59
 Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala
 1 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 60
 Asn Phe Ser Val Leu Pro Pro Glu Ile
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 61
 Val Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala
 1 5

<210> 62
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 62
 Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu
 1 5

<210> 63
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 63
 Pro Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe
 1 5

<210> 64
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 64
 Glu Ile Asn Ser Ala Leu Ile Phe Ala
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 65
 Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 66
 Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 67
 Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 68
 Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp Gly Leu
 1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 69
 Ala Thr Ala Trp Asp Gly Leu Ala Met
 1 5

<210> 70
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 70
 Ala Trp Asp Gly Leu Ala Met Glu Leu
 1 5

<210> 71
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 71

Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 72
Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 73
Val Thr Ser Gly Leu Val Gly Gly Ala
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 74
Ala Met Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 75
Ala Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 76
Ala Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 77
Ala Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala

1 5

<210> 78
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 78
 Ala Pro Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala
 1 5

<210> 79
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 79
 Tyr Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala
 1 5

<210> 80
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 80
 Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala Ala Val
 1 5

<210> 81
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 81
 Trp Leu Ala Ala Ala Val Gln Ala
 1 5

<210> 82
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 82
 Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala
 1 5

<210> 83
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 83
 Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln Ala Ala
 1 5

<210> 84
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 84
 Thr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Met Ile
 1 5

<210> 85
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 85
 Ala Ala Met Ile Ala Glu Phe Glu Ala
 1 5

<210> 86
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 86
 Ala Met Ile Ala Glu Phe Glu Ala Val
 1 5

<210> 87
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 87
 Ala Glu Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala
 1 5

<210> 88
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 88
 Phe Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 89
 Glu Ala Val Lys Thr Ala Val Val Gln
 1 5

<210> 90
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 90
 Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met Leu
 1 5

<210> 91
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 91
 Gln Pro Met Leu Val Ala Ala Asn Arg
 1 5

<210> 92
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 92
 Pro Met Leu Val Ala Ala Asn Arg Ala
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 93
 Leu Val Ala Ala Asn Arg Ala Asp Leu
 1 5

<210> 94
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 94
 Ala Asn Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu
 1 5

<210> 95
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 95
 Arg Ala Asp Leu Val Ser Leu Val Met
 1 5

<210> 96
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 96
 Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe
 1 5

<210> 97
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 97
 Asn Leu Phe Gly Gln Asn Ala Pro Ala
 1 5

<210> 98
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 98
 Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala
 1 5

<210> 99
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 99
 Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr
 1 5

<210> 100
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 100
 Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp Ala Ala
 1 5

<210> 101
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 101
 Gln Met Trp Ala Ala Asp Val Ser Ala
 1 5

<210> 102

<211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 102
 Ala Met Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala
 1 5

 <210> 103
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 103
 Ser Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala
 1 5

 <210> 104
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 104
 Ala Tyr His Ala Gly Ala Ser Ala Ile
 1 5

 <210> 105
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 105
 Gly Ala Ser Ala Ile Ala Ser Ala Leu
 1 5

 <210> 106
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 106
 Ala Ile Ala Ser Ala Leu Ser Pro Phe
 1 5

 <210> 107
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 107
 Ala Leu Ser Pro Phe Ser Lys Pro Leu
 1 5

 <210> 108
 <211> 9

<212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 108
 Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu
 1 5

<210> 109
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 109
 Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala Gly Leu
 1 5

<210> 110
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 110
 Asn Leu Ala Gly Leu Pro Ala Trp Leu
 1 5

<210> 111
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 111
 Leu Ala Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala
 1 5

<210> 112
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 112
 Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala
 1 5

<210> 113
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 113
 Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala
 1 5

<210> 114
 <211> 9
 <212> ПРТ

<213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 114
 Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr Ala
 1 5

<210> 115
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 115
 Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr Ala Ala
 1 5

<210> 116
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 116
 Ala Ala Met Thr Ala Ala Ala Gly Ile
 1 5

<210> 117
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 117
 Thr Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu
 1 5

<210> 118
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 118
 Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala
 1 5

<210> 119
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 119
 Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile
 1 5

<210> 120
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 120
 Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile Asn Leu
 1 5

<210> 121
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 121
 Gly Pro Thr Ala Ile Asn Leu Gly Ile
 1 5

<210> 122
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 122
 Ala Ile Asn Leu Gly Ile Ala Asn Val
 1 5

<210> 123
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 123
 Asn Ala Asn Leu Gly Asn Tyr Asn Phe
 1 5

<210> 124
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 124
 Asn Tyr Asn Phe Gly Ser Gly Asn Phe
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 125
 Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val Gly Val
 1 5

<210> 126
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 126
 Ser Leu Asn Thr Gly Ser Tyr Asn Met
 1 5

<210> 127
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 127
 Asn Ala Asn Thr Gly Phe Leu Asn Ala
 1 5

<210> 128
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 128
 Phe Leu Asn Ala Gly Asn Ile Asn Thr
 1 5

<210> 129
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 129
 Asn Ile Asn Thr Gly Val Phe Asn Ile
 1 5

<210> 130
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 130
 Gly Val Gly Gln Gly Ser Leu Gln Phe
 1 5

<210> 131
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 131
 Ser Ile Thr Thr Pro Asp Leu Thr Leu
 1 5

<210> 132
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 132

Thr Pro Asp Leu Thr Leu Pro Pro Leu
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 133
Asp Leu Thr Leu Pro Pro Leu Gln Ile
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 134
Pro Leu Gln Ile Pro Gly Ile Ser Val
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 135
Ile Pro Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 136
Gly Ile Ser Val Pro Ala Phe Ser Leu
1 5

<210> 137
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 137
Val Pro Ala Phe Ser Leu Pro Ala Ile
1 5

<210> 138
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 138
Ala Phe Ser Leu Pro Ala Ile Thr Leu

```

1                               5

<210> 139
<211> 9
<212> IPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 139
Leu Pro Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu
1                               5

<210> 140
<211> 9
<212> IPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 140
Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile
1                               5

<210> 141
<211> 9
<212> IPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 141
Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala
1                               5

<210> 142
<211> 9
<212> IPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 142
Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala
1                               5

<210> 143
<211> 9
<212> IPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 143
Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val
1                               5

<210> 144
<211> 9
<212> IPT
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 144
Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala
1                               5

```

<210> 145
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 145
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu
 1 5

<210> 146
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 146
 Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu
 1 5

<210> 147
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 147
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu
 1 5

<210> 148
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 148
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala
 1 5

<210> 149
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 149
 Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val
 1 5

<210> 150
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 150
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu
 1 5

<210> 151
 <211> 9
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 151
 Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu
 1 5

<210> 152
 <211> 9
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 152
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu
 1 5

<210> 153
 <211> 9
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 153
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala
 1 5

<210> 154
 <211> 9
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 154
 Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val
 1 5

<210> 155
 <211> 9
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 155
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu
 1 5

<210> 156
 <211> 9
 <212> NPPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 156
 Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu
 1 5

<210> 157
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 157
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu
 1 5

<210> 158
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 158
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala
 1 5

<210> 159
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 159
 Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val
 1 5

<210> 160
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 160
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu
 1 5

<210> 161
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 161
 Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu
 1 5

<210> 162
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 162
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu
 1 5

<210> 163

<211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 163
 Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala
 1 5

<210> 164
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 164
 Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val
 1 5

<210> 165
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 165
 Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu
 1 5

<210> 166
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 166
 Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu
 1 5

<210> 167
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 167
 Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val
 1 5

<210> 168
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 168
 Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe
 1 5

<210> 169
 <211> 9

<212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 169
 Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu
 1 5

 <210> 170
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 170
 Leu Pro Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val
 1 5

 <210> 171
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 171
 Pro Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val Ala
 1 5

 <210> 172
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 172
 Ile Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val
 1 5

 <210> 173
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 173
 Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile
 1 5

 <210> 174
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 174
 Val Pro Pro Ile Thr Val Gly Ala Phe
 1 5

 <210> 175
 <211> 9
 <212> ПРТ

<213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 175
 Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile
 1 5

<210> 176
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 176
 Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln Leu
 1 5

<210> 177
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 177
 Thr Ile Pro Gln Leu Thr Ile Pro Ala
 1 5

<210> 178
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 178
 Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile
 1 5

<210> 179
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 179
 Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu
 1 5

<210> 180
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 180
 Leu Pro Ala Ile His Thr Gln Pro Ile
 1 5

<210> 181
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 181
Ala Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val
1 5

<210> 182
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 182
Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val
1 5

<210> 183
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 183
Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe Gly Leu
1 5

<210> 184
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 184
Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val
1 5

<210> 185
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 185
Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe
1 5

<210> 186
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 186
Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile
1 5

<210> 187
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 187
Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile Thr Val
1 5

<210> 188
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 188
Thr Pro Arg Ile Thr Val Pro Ala Phe
1 5

<210> 189
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 189
Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe
1 5

<210> 190
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 190
Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn Val
1 5

<210> 191
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 191
Gln Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala Leu
1 5

<210> 192
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 192
Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu
1 5

<210> 193
<211> 9
<212> ПРТ
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 193

Leu Ser Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu
1 5

<210> 194
<211> 9
<212> PPT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 194
Ser Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile
1 5

<210> 195
<211> 9
<212> PPT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 195
Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile Phe
1 5

<210> 196
<211> 9
<212> PPT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 196
Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu
1 5

<210> 197
<211> 9
<212> PPT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 197
Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val
1 5

<210> 198
<211> 9
<212> PPT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 198
Leu Pro Gln Leu Val Val His Pro Tyr
1 5

<210> 199
<211> 9
<212> PPT
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 199
Gln Leu Val Val His Pro Tyr Thr Leu

1 5

<210> 200
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 200
 His Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile
 1 5

<210> 201
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 201
 Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile
 1 5

<210> 202
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 202
 Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe
 1 5

<210> 203
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 203
 Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu
 1 5

<210> 204
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 204
 Ser Phe Phe Leu Pro Ala Phe Asn Ile
 1 5

<210> 205
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 205
 Leu Pro Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile
 1 5

<210> 206
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 206
 Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile
 1 5

<210> 207
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 207
 Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val
 1 5

<210> 208
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 208
 Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly Phe
 1 5

<210> 209
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 209
 Ala Ile Asn Val Asp Gly Phe Thr Leu
 1 5

<210> 210
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 210
 Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala
 1 5

<210> 211
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 211
 Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile
 1 5

<210> 212
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 212
 Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe
 1 5

<210> 213
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 213
 Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe Ala Ile
 1 5

<210> 214
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 214
 Thr Pro Glu Phe Ala Ile Pro Pro Ile
 1 5

<210> 215
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 215
 Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe
 1 5

<210> 216
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 216
 Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu
 1 5

<210> 217
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 217
 Leu Pro Gln Ile Thr Thr Gln Glu Ile
 1 5

<210> 218
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 218
 Pro Gln Ile Thr Thr Gln Glu Ile Ile
 1 5

<210> 219
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 219
 Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile
 1 5

<210> 220
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 220
 Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile
 1 5

<210> 221
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 221
 Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val
 1 5

<210> 222
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 222
 Ser Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu
 1 5

<210> 223
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 223
 Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile
 1 5

<210> 224

<211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 224
 Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu
 1 5

 <210> 225
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 225
 Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile
 1 5

 <210> 226
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 226
 Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile
 1 5

 <210> 227
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 227
 Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu
 1 5

 <210> 228
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 228
 Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile
 1 5

 <210> 229
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

 <400> 229
 Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val
 1 5

 <210> 230
 <211> 9

<212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 230
 Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe
 1 5

<210> 231
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 231
 Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His
 1 5

<210> 232
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 232
 Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu
 1 5

<210> 233
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 233
 Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile
 1 5

<210> 234
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 234
 His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala
 1 5

<210> 235
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 235
 Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala Phe
 1 5

<210> 236
 <211> 9
 <212> ПРТ

<213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 236
 Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr
 1 5

<210> 237
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 237
 Ser Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe
 1 5

<210> 238
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 238
 Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu
 1 5

<210> 239
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 239
 Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe
 1 5

<210> 240
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 240
 Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu
 1 5

<210> 241
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*
 <400> 241
 Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe
 1 5

<210> 242
 <211> 9
 <212> IPT
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 242
 Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe
 1 5

<210> 243
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 243
 Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val
 1 5

<210> 244
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 244
 Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val
 1 5

<210> 245
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 245
 Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val
 1 5

<210> 246
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 246
 Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe
 1 5

<210> 247
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 247
 Gly Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn Leu
 1 5

<210> 248
 <211> 450
 <212> ПРТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*


```

<400> 248
Met Ser Glu Leu Ser Val Ala Thr Gly Ala Val Ser Thr Ala Ser Ser
1      5      10      15
Ser Ile Pro Met Pro Ala Gly Val Asn Pro Ala Asp Leu Ala Ala Glu
20      25      30
Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Ser Val Asp Glu Asp Tyr Leu Leu Tyr
35      40      45
Glu Cys Asp Gly Gln Trp Val Leu Ala Ala Gly Val Gln Ala Met Val
50      55      60
Glu Leu Asp Ser Asp Glu Leu Arg Val Ile Arg Asp Gly Val Thr Arg
65      70      75      80
Arg Gln Gln Trp Ser Gly Arg Pro Gly Ala Ala Leu Gly Glu Ala Val
85      90      95
Asp Arg Leu Leu Leu Glu Thr Asp Gln Ala Phe Gly Trp Val Ala Phe
100     105     110
Glu Phe Gly Val His Arg Tyr Gly Leu Gln Gln Arg Leu Ala Pro His
115     120     125
Thr Pro Leu Ala Arg Val Phe Ser Pro Arg Thr Arg Ile Met Val Ser
130     135     140
Glu Lys Glu Ile Arg Leu Phe Asp Ala Gly Ile Arg His Arg Glu Ala
145     150     155     160
Ile Asp Arg Leu Leu Ala Thr Gly Val Arg Glu Val Pro Gln Ser Arg
165     170     175
Ser Val Asp Val Ser Asp Asp Pro Ser Gly Phe Arg Arg Arg Val Ala
180     185     190
Val Ala Val Asp Glu Ile Ala Ala Gly Arg Tyr His Lys Val Ile Leu
195     200     205
Ser Arg Cys Val Glu Val Pro Phe Ala Ile Asp Phe Pro Leu Thr Tyr
210     215     220
Arg Leu Gly Arg Arg His Asn Thr Pro Val Arg Ser Phe Leu Leu Gln
225     230     235     240
Leu Gly Gly Ile Arg Ala Leu Gly Tyr Ser Pro Glu Leu Val Thr Ala
245     250     255
Val Arg Ala Asp Gly Val Val Ile Thr Glu Pro Leu Ala Gly Thr Arg
260     265     270
Ala Leu Gly Arg Gly Pro Ala Ile Asp Arg Leu Ala Arg Asp Asp Leu
275     280     285
Glu Ser Asn Ser Lys Glu Ile Val Glu His Ala Ile Ser Val Arg Ser
290     295     300
Ser Leu Glu Glu Ile Thr Asp Ile Ala Glu Pro Gly Ser Ala Ala Val
305     310     315     320
Ile Asp Phe Met Thr Val Arg Glu Arg Gly Ser Val Gln His Leu Gly
325     330     335
Ser Thr Ile Arg Ala Arg Leu Asp Pro Ser Ser Asp Arg Met Ala Ala
340     345     350
Leu Glu Ala Leu Phe Pro Ala Val Thr Ala Ser Gly Ile Pro Lys Ala
355     360     365
Ala Gly Val Glu Ala Ile Phe Arg Leu Asp Glu Cys Pro Arg Gly Leu
370     375     380
Tyr Ser Gly Ala Val Val Met Leu Ser Ala Asp Gly Gly Leu Asp Ala
385     390     395     400
Ala Leu Thr Leu Arg Ala Ala Tyr Gln Val Gly Gly Arg Thr Trp Leu
405     410     415
Arg Ala Gly Ala Gly Ile Ile Glu Glu Ser Glu Pro Glu Arg Glu Phe
420     425     430
Glu Glu Thr Cys Glu Lys Leu Ser Thr Leu Thr Pro Tyr Leu Val Ala
435     440     445
Arg Gln
450

```

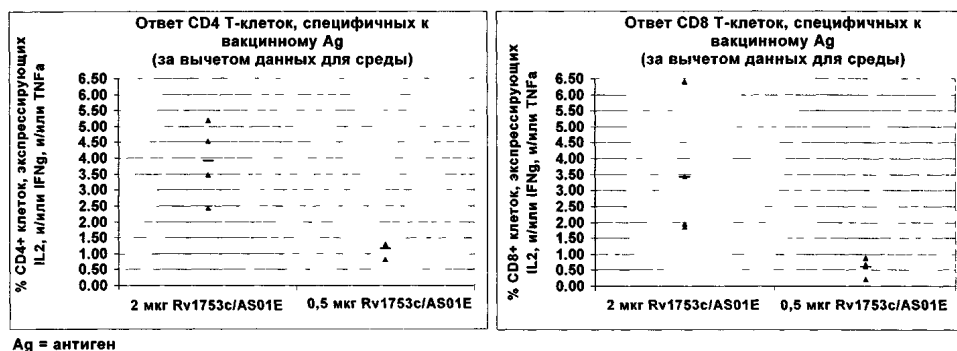
<210> 249
 <211> 324
 <212> ППТ
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 249
 Met Ser Asp Gln Val Pro Lys Pro His Arg His His Ile Trp Arg Ile
 1 5 10 15
 Thr Arg Arg Thr Leu Ser Lys Ser Trp Asp Asp Ser Ile Phe Ser Glu
 20 25 30
 Ser Ala Gln Ala Ala Phe Trp Ser Ala Leu Ser Leu Pro Leu Leu
 35 40 45
 Leu Gly Met Leu Gly Ser Leu Ala Tyr Val Ala Pro Leu Phe Gly Pro
 50 55 60
 Asp Thr Leu Pro Ala Ile Glu Lys Ser Ala Leu Ser Thr Ala His Ser
 65 70 75 80
 Phe Phe Ser Pro Ser Val Val Asn Glu Ile Ile Glu Pro Thr Ile Gly
 85 90 95
 Asp Ile Thr Asn Asn Ala Arg Gly Glu Val Ala Ser Leu Gly Phe Leu
 100 105 110
 Ile Ser Leu Trp Ala Gly Ser Ser Ala Ile Ser Ala Phe Val Asp Ala
 115 120 125
 Val Val Glu Ala His Asp Gln Thr Pro Leu Arg His Pro Val Arg Gln
 130 135 140
 Arg Phe Phe Ala Leu Phe Leu Tyr Val Val Met Leu Val Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Ala Thr Ala Pro Val Met Val Val Gly Pro Arg Lys Val Ser Glu His
 165 170 175
 Ile Pro Glu Ser Leu Ala Asn Leu Leu Arg Tyr Gly Tyr Tyr Pro Ala
 180 185 190
 Leu Ile Leu Gly Leu Thr Val Gly Val Ile Leu Leu Tyr Arg Val Ala
 195 200 205
 Leu Pro Val Pro Leu Pro Thr His Arg Leu Val Leu Gly Ala Val Leu
 210 215 220
 Ala Ile Ala Val Phe Leu Ile Ala Thr Leu Gly Leu Arg Val Tyr Leu
 225 230 235 240
 Ala Trp Ile Thr Arg Thr Gly Tyr Thr Tyr Gly Ala Leu Ala Thr Pro
 245 250 255
 Ile Ala Phe Leu Leu Phe Ala Phe Phe Gly Gly Phe Ala Ile Met Leu
 260 265 270
 Gly Ala Glu Leu Asn Ala Ala Val Gln Glu Glu Trp Pro Ala Pro Ala
 275 280 285
 Thr His Ala His Arg Leu Gly Asn Trp Leu Lys Ala Arg Ile Gly Val
 290 295 300
 Gly Thr Thr Thr Tyr Ser Ser Thr Ala Gln His Ser Ala Val Ala Ala
 305 310 315 320
 Glu Pro Pro Ser

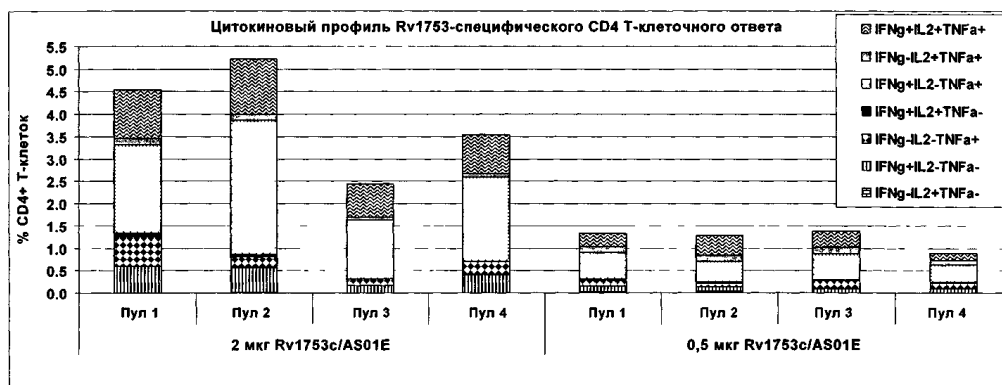
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептидный антиген, содержащий:
 - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; или
 - (3) иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 10 аминокислотных остатков из последовательности белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1, для применения в качестве лекарственного средства в лечении или предупреждении туберкулеза.
2. Полипептид по п.1 для применения в лечении латентного туберкулеза.
3. Полипептид по п.1 для применения в предупреждении латентного туберкулеза.
4. Полипептид по п.1 для применения в предупреждении реактивации туберкулеза.
5. Полипептид по п.1 для применения в замедлении реактивации туберкулеза.
6. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептидный антиген, содержащий:
 - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; или
 - (3) иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 10 аминокислотных остатков из последовательности белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1, для применения в качестве лекарственного средства в лечении или предупреждении туберкулеза.
7. Полинуклеотид по п.6 для применения в лечении латентного туберкулеза.
8. Полинуклеотид по п.6 для применения в предупреждении латентного туберкулеза.
9. Полинуклеотид по п.6 для применения в предупреждении реактивации туберкулеза.

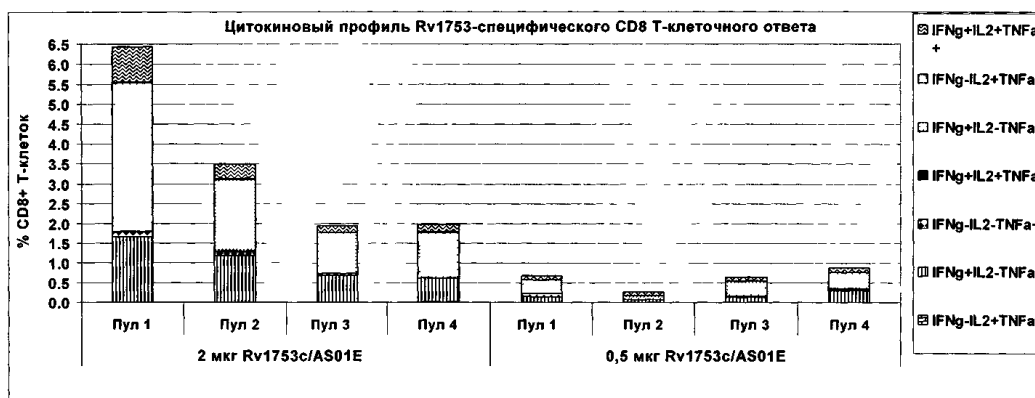
10. Полинуклеотид по п.6 для применения в замедлении реактивации туберкулеза.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая:
 - (а) полипептидный антиген, содержащий:
 - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; или
 - (3) иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 10 аминокислотных остатков из последовательности белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1; или
 - (б) полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид из (а); и
 - (в) фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.
12. Иммуногенная композиция, содержащая:
 - (а) полипептидный антиген, содержащий:
 - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; или
 - (3) иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 10 аминокислотных остатков из последовательности белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1; или
 - (б) полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид из (а); и
 - (в) неспецифический усилитель иммунного ответа.
13. Способ лечения или предупреждения туберкулеза, включающий введение безопасного и эффективного количества полипептидного антигена, содержащего:
 - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; или
 - (3) иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 10 аминокислотных остатков из последовательности белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1;
 субъекту, нуждающемуся в этом, где указанный полипептид вызывает иммунный ответ.
14. Способ лечения или предупреждения туберкулеза, включающий введение безопасного и эффективного количества полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептидный антиген, содержащий:
 - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; или
 - (3) иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 10 аминокислотных остатков из последовательности белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1;
 субъекту, нуждающемуся в этом, где указанный полинуклеотид вызывает иммунный ответ.
15. Способ по п.13 или 14, где субъект имеет активный туберкулез.
16. Способ по п.13 или 14, где субъект имеет латентный туберкулез.
17. Способ по п.13 или 14, где у субъекта нет туберкулеза.
18. Способ по любому из пп.13-17, который относится к лечению туберкулеза.
19. Способ по любому из пп.13-17, который относится к предупреждению туберкулеза.
20. Способ по любому из пп.13-17, который относится к лечению латентного туберкулеза.
21. Способ по любому из пп.13-17, который относится к предупреждению латентного туберкулеза.
22. Способ по любому из пп.13-17, который относится к предупреждению реактивации туберкулеза.
23. Способ по любому из пп.13-17, который относится к замедлению реактивации туберкулеза.
24. Применение полипептидного антигена, содержащего:
 - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; или
 - (3) иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 10 аминокислотных остатков из последовательности белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1;
 в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения туберкулеза.
25. Применение полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептидный антиген, содержащий:
 - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
 - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; или
 - (3) иммуногенный фрагмент по меньшей мере из 10 аминокислотных остатков из последовательности белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1;
 в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения туберкулеза.



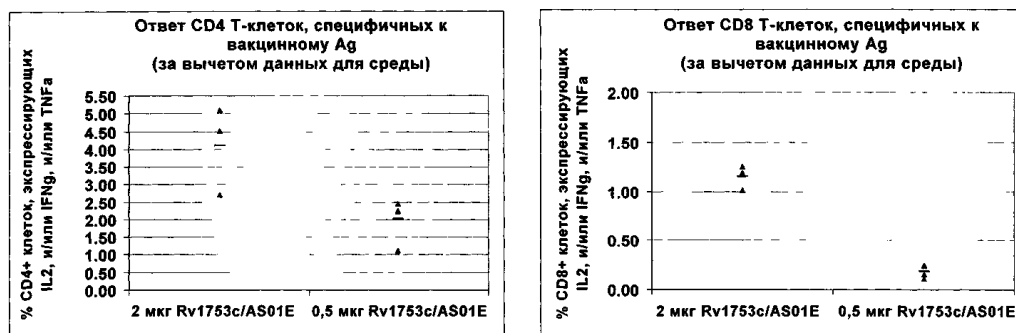
Фиг. 1



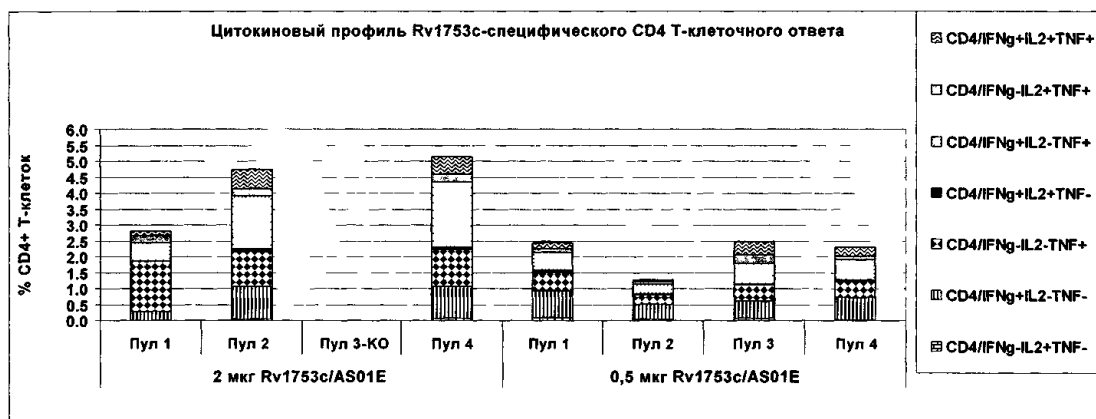
Фиг. 2



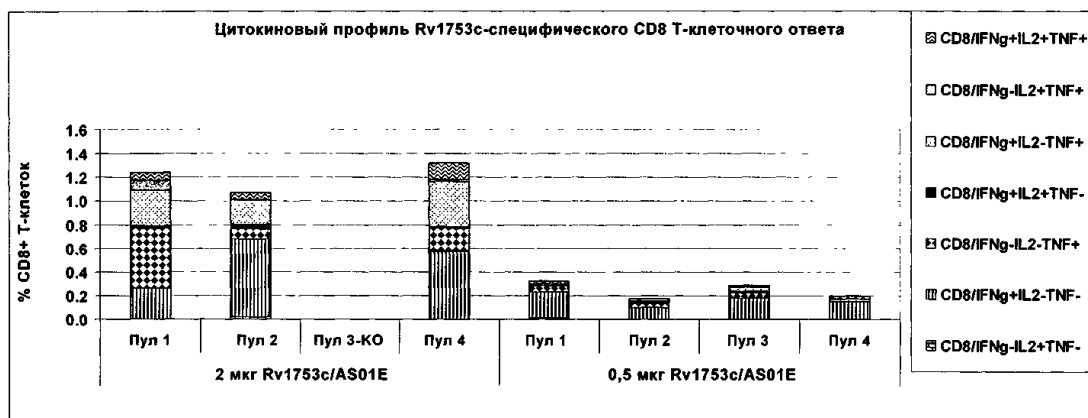
Фиг. 3



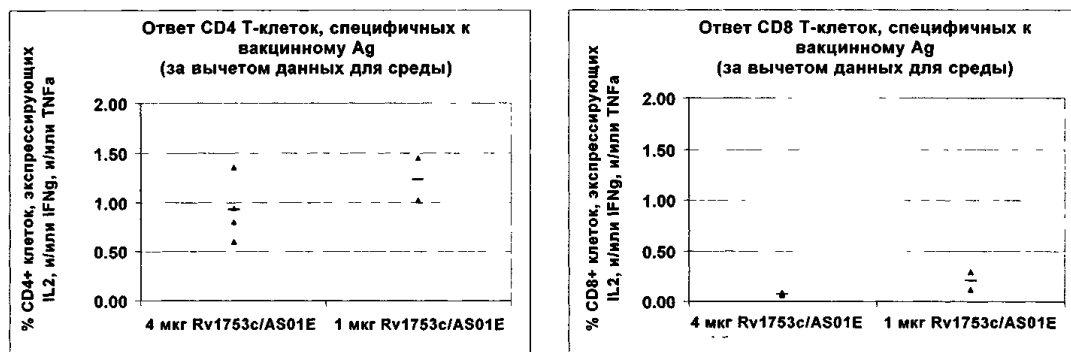
Фиг. 4



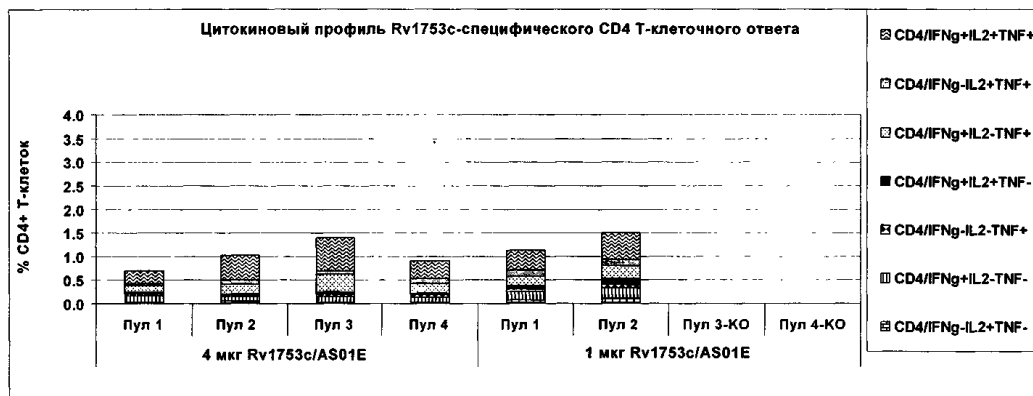
Фиг. 5



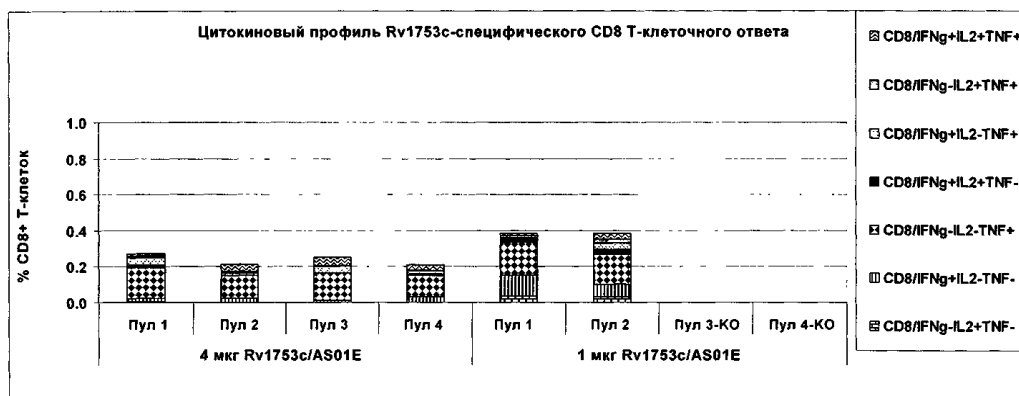
Фиг. 6



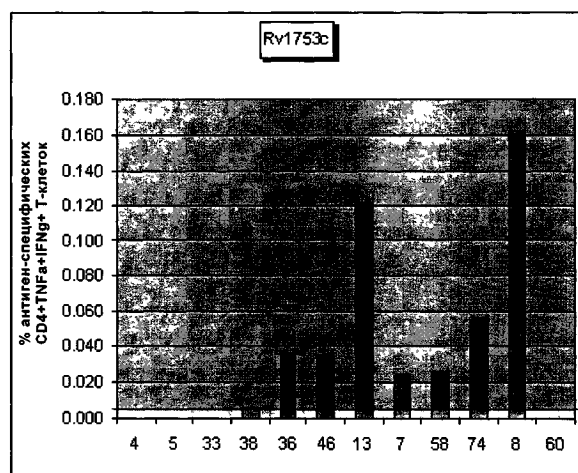
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

