

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 022203

(13) B1

(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. (BE);  
ГЛАКСО ГРУП ЛИМИТЕД (GB)

- (72) Изобретатель:  
**Браун Джеймс (US), Меттенс Паскаль  
(BE), Мерфи Денис (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), "SubNamθ: 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. NIPROTE: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 cell epitopes 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-cell epitopes 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

B1

022203

022203  
B1

- (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 (TB) 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 TB, примерно с 9,2 млн новых случаев TB и 1,7 млн смертей ежегодно. У 10% инфицированных бациллами TB развивается активный TB, при этом каждый человек с активным TB 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 TB.

Менее чем у 5% инфицированных индивидуумов активный TB 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 TB 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 TB и активным TB (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 серьезные 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 TB (MDR-TB) представляет собой форму, которая не отвечает на лекарственные средства первой линии. 5% всех случаев TB представляют собой MDR-TB, при этом в течение каждого года возникает приблизительно 490000 новых случаев MDR-TB. TB 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 TB 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 ТБ 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 ТБ и предупреждения реактивации ТБ.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

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

Согласно настоящему изобретению предложен выделенный полипептид, содержащий:

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

Согласно настоящему изобретению также предложен полипептид, содержащий:

- (1) последовательность белка Rv1753c;
- (2) вариант последовательности белка Rv1753c или
- (3) имmunогенный фрагмент последовательности белка Rv1753c для применения в качестве лекарственного средства.

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

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

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

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

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

  - (1) последовательность белка Rv1753c;
  - (2) вариант последовательности белка Rv1753c или
  - (3) имmunогенный фрагмент последовательности белка Rv1753c для применения в качестве лекарственного средства.

Следующий аспект изобретения относится к способу лечения или предупреждения ТБ, включающему введение безопасного и эффективного количества полинуклеотида, содержащего последовательность нукleinовой 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 нукleinовой 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 ТВ 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 нукleinовой кислоты, кодирующую полипептид из (а); и

(в) фармацевтически приемлемый носитель или эксципiente.

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 нукleinовой кислоты, кодирующую полипептид из (а); и

(в) неспецифический усилитель иммунного ответа.

Также предложен экспрессирующий вектор, содержащий последовательность нукleinовой 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 (мононуклеарные 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 CB6F1 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 CB6F1 мышей.

Фиг. 3. Цитокиновый профиль на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) антиген-специфического CD8-ответа у иммунизированных CB6F1 мышей.

Фиг. 4. Процент CD4 и CD8 клеток от иммунизированных CB6F1 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 CB6F1 мышей.

Фиг. 6. Цитокиновый профиль на 35-е сутки (то есть через 7 суток после третьей иммунизации) антиген-специфического CD8-ответа у иммунизированных CB6F1 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 конструкции M114.	последовательность	слитой
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.		











- 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 *M. tuberculosis*.
- SEQ ID No: 249: полипептидная последовательность Rv2707c из штамма H37Rv *M. tuberculosis*.

#### **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 ТВ 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 ТВ 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 ТВ (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 ТВ, тем самым усиливая контроль над ТВ или даже давая возможность устранения инфекции. Поэтому вакцина, нацеленная на латентный ТВ, могла бы значительно и экономично снизить общие уровни зараженности ТВ.

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 адоптивный перенос CD4+ Т-клеток, полученных на пике первичного иммунного ответа на *M. tuberculosis*, предоставляет защиту против *M. tuberculosis* дефицитным по Т-клеткам мышам (Ogme et al., J. Exp. Med., 1983, 158:74-83).

Показано, что *Mycobacterium*-реактивные CD4+ Т-клетки являются мощными продуцентами  $\gamma$ -интерферона (IFN- $\gamma$ ), для которого, в свою очередь, показано, что он запускает антимикробактериальные эффекты макрофагов у мышей (Flynn et al., J. Exp. Med., 1993, 178: 2249-2254). В то время как роль IFN- $\gamma$  у людей менее понятна, исследования показали, что 1,25-дигидроксивитамин D3, либо сам по себе, либо в комбинации с IFN- $\gamma$  или фактором некроза опухоли-альфа, активирует макрофаги человека для ингибирования инфекции *M. tuberculosis*. Кроме того, известно, что IFN- $\gamma$  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 применению 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 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 teste 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 инициированы 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 пиразинамилом).

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, аминосалициловую кислоту, капреомицин, циклосерин, этамбутол, этионамид, изониазид, канамицин, пиразинамид, 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 пиразинамид. 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, аминосалициловую 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 взаимозаменяющими 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,  $\gamma$ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Термин "аналоги аминокислот" относится к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, то есть  $\alpha$ -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 остатки, 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 осте, 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, хиальные метилфосфонаты, 2-O-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 дезоксирибонуклеиновой кислоты (Batzere 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 взаимозаменяется с терминами "ген", "кДНК", "мРНК", "олигонуклеотид" и "полинуклеотид".

Аминокислоты здесь могут быть обозначены либо в соответствии с их общепринятыми 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* комплекса, 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, состоящие 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(a) SEQ ID NO: 2 или фрагмент(a) 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 инициирующего 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 инициирующего 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 инициирующего 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-

щем изобретении слитая конструкция M72-Mtb9.9-Mtb9.8 возможно может включать два рядом расположенных гистидина после инициирующего 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 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 иммуногенные 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 Welcome Trust Sanger Institute ([www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis/](http://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, аминосалициловую кислоту, капреомицин, циклосерин, этамбутол, этионамид, изониазид, канамицин, пиразинамид, рифамицины (то есть рифампин, рифапентин и рифабутин), стрептомицин, оффлоксацин, 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 пиразинамид. 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 оффлоксацин, ципрофлоксацин, этионамид, аминосалициловую 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 Rv1753c, 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, шиншилл) 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 эпипотному картированию, которые хорошо известны специалисту в данной области техники (см., например, Paul, Fundamental Immunology, 3-е изд., 243-247 (1993); Veibbarth 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 Rv1753c, содержащие по меньшей мере один Т-клеточный эпипотоп, 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 аутбредной популяции, такой как люди, наличие различных типов HLA (антигенов тканевой совместимости человека) означает, что специфические эпипотопы 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 эпипотопов из полноразмерной последовательности (соответствующим образом все эпипотопы).

Конкретные фрагменты белка Rv1753c, которые могут быть использованы, включают фрагменты, содержащие по меньшей мере один CD4+ эпипотоп, соответственно по меньшей мере два CD4+ эпипотопа и в особенности все CD4+ эпипотопы (как например, эпипотопы, описанные в разделе Примеры и в SEQ ID No: 30-59, в частности эпипотопы, ассоциированные с большинством HLA-аллелей, например, эпипотопы, ассоциированные с 2, 3, 4, 5 или более аллелями).

Другие фрагменты белка Rv1753c, которые могут быть использованы, включают фрагменты, содержащие по меньшей мере один CD8 эпипотоп, соответственно по меньшей мере два CD8 эпипотопа и в особенности все CD8 эпипотопы (как например, эпипотопы, описанные в разделе примеры и в SEQ ID No: 60-247, в частности эпипотопы, ассоциированные с множеством HLA-аллелей, например эпипотопы, ассоциированные с 2, 3, 4, 5 или более аллелями).

Когда используют индивидуальный фрагмент полноразмерного полипептида, такой фрагмент считаю 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 лимфопролиферации, 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), TNFa (фактор некроза опухоли-а), IFNg (г-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 РВМС 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 консервативными вариантами (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 путем 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 делецииены 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 вариант 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 (1977) 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/](http://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; и математическое ожидание (E), равное 10; и выравнивания (B) по матрице баллов BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915 (1989)), 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. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5787 (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 нукleinовая кислота аналогична эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нукleinовой кислоты с эталонной нукleinовой 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 Tijsse, 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 M для ионов натрия, в типичном случае концентрация ионов натрия (или других солей) составляет примерно 0,01-1,0 M 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 путем 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 M 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 РВМС 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 лимфопrolиферации, продукции цитокинов в супернатанте культуры (измеряемых с помощью ELISA, СВА 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, TNFa, IFNg, 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 flankируют 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 гяРНК (гетерогенная ядерная РНК), которые содержат интроны и соответствуют молекуле ДНК по типу "один-к-одному" ("one-to-one"), и молекулы мРНК, которые не содержат инtronов. 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 инtronов и протяженных 5'-последовательностей.

Что касается методов гибридизации, то частичная последовательность может быть мечена (например, посредством "ник"-трансляции или концевого мечения с помощью  $^{32}\text{P}$ ) 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)). Гибридизующиеся 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, инициирующие 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 полиA 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 полуыведения, 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, общезвестные в данной области для того, чтобы изменять полипептид-кодирующую 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 нукleinовой кислоты могут быть лигированы с гетерологической 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 гетерологической 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 вариантового 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 транскриptionные 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 вириуса мозаики цветной капусты (CaMV); вириуса табачной мозаики (TMV)) или бактериальными векторами экспрессии (например, плазмидами Ti 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 предпочтительны 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 вириуса 40) или EBV (вириуса Эпштейна-Барра) с соответствующим селектируемым маркером.

В бактериальных системах количество экспрессирующихся 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 путем 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 (фосфоглицираткиназа), GAL (галакто-зидаза) 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, вириусные 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 путем 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 вириус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV). Последовательности, кодирующие полипептид, можно клонировать в несущественный участок вириуса, например полиэдриновый ген, и поместить под контроль полиэдринового промотора. Успешная вставка полипептид-кодирующей последовательности будет делать полиэдриновый ген неактивным и давать рекомбинантный вириус, не имеющий белка оболочки. Затем рекомбинантные вириусы 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 аденоовирус используется в качестве экспрессионного вектора, последовательности, кодирующие представляющий интерес полипептид, могут быть лигированы в аденоовирусный 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 Payса (RSV). Обзоры способов и протоколов для работы с аденоовирусными векторами приведены в Wold, Adenovirus Methods and Protocols, 1998. Дополнительные ссылки, касающиеся применения аденоовирусных векторов, можно найти в Adenovirus: A Medical Dictionary, Bibliography, and Annotated Research Guide to Internet References, 2004.

Для достижения более эффективной трансляции последовательностей, кодирующих представляющие интерес полипептид, также могут быть использованы специфические сигналы инициации. Такие сигналы включают инициирующий кодон ATG и примыкающие последовательности. В тех случаях, когда последовательности, кодирующие полипептид, его инициирующий кодон и расположенные выше последовательности встроены в соответствующий экспрессионный 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 инициирующий кодон ATG. Более того, инициирующий кодон должен находиться в правильной рамке считывания, чтобы гарантировать трансляцию всей вставки. Экзогенные трансляционные элементы и инициирующие 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 встроенных 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 СНО (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 селектируемый маркерный ген в том же или в отдельном векторе. После введения вектора клетки можно оставить растить в течение 1-2 суток в обогащенной среде, прежде чем перевести их в селективную среду. Задача селектируемого маркера заключается в том, чтобы придать устойчивость к селекции, и его присутствие делает возможным рост и выделение клеток, успешно экспрессирующих введенные последовательности. Устойчивые клонды 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));prt (неомицин-фосфотрансфераза), который придает устойчивость к аминогликозидам, неомицину и G-418 (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150: 1-14 (1981)); и als (ацетолактатсинтаза) или rat (фосфинотрицин-ацетилтрансфераза), которые придают устойчивость соответственно к хлорсульфурону и фосфинотрицину (Митгу, выше). Были описаны дополнительные селектируемые 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 эпигопами 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 нукleinовой кислоты включает применение аденовирусного экспрессионного вектора. Подразумевается, что "аденовирусный экспрессионный 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.

Экспрессионный 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 эпизомы 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 связанный, 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 клеток-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 осте 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, пермиссивных 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 аденоовириуса. 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 конфлюентности примерно 80%, после чего среду меняют (до 25% конечного объема) и добавляют аденоовириус 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 аденоовириусный вектор был дефектным или по меньшей мере условно дефектным по репликации, природа аденоовириусного вектора, по-видимому, не является решающей для успешного практического применения изобретения. Аденоовириус может представлять собой любой из 42 разных известных серотипов или подгрупп A-F. Аденоовириус 5 типа подгруппы C является предпочтительным исходным материалом для получения условно дефектного по репликации аденоовириусного вектора для применения в настоящем изобретении, поскольку аденоовириус 5 типа является человеческим аденоовириусом, о котором известно огромное количество биохимической и генетической информации, и исторически его используют для большинства конструкций, использующих аденоовириус в качестве вектора.

Как указано выше, типичный вектор по настоящему изобретению дефектен по репликации и не будет иметь аденоовириусного 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 аденоовириусных 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.

Аденоовириус 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 аденоовириуса не требует интеграции в геном клетки-хозяина. Чужеродные гены, доставляемые посредством аденоовириусных векторов, являются эпизомными и, следовательно, имеют низкую генотоксичность в отношении клеток хозяина. Не сообщалось ни о каких побочных эффектах при исследованиях вакцинации аденоовириусом дикого типа (Couch et al., 1963; Top et al., 1971), что демонстрирует их безопасность и терапевтический потенциал в качестве векторов для переноса генов *in vivo*.

Аденоовириусные 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 аденоовириус может быть использован для генной терапии (Stratford-Perricaudet & Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Rich et al., 1993). Исследования при введении рекомбинантного аденоовириуса 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).

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

Аденоовириус 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). Аденоовириус 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 цДНК, 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 сиалогликопротеиновые 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, эктропным вирусом *in vitro* (Roux et al., 1989).

### 3. Аденоассоциированные вирусы (AAV)

AAV (Ridgeway, 1988; Hermonat & Muzyczka, 1984) представляет собой парвовирус, открытый в виде контаминации аденоовирусных 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 депендовирус, поскольку его репликация зависит от присутствия хелперного вируса, такого как аденоовирус. 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 считываивания 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 шпилечную 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 аденоовирус 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 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 печень-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 нукleinовая кислота, кодирующая желающие олигонуклеотидные или полинуклеотидные последовательности, может располагаться и экспрессироваться в разных сайтах. В некоторых воплощениях нукleinовая 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 нукleinовая кислота может стабильно поддерживаться в клетке в виде отдельного эпизомного сегмента ДНК. Такие сегменты нукleinовой кислоты или "эпизомы" 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 нукleinовая 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 голой рекомбинантной ДНК или плазмиды. Перенос такой конструкции может быть осуществлен, например, любым способом, который физически или химически увеличивает проницаемость клеточной мембрани. Это особенно применимо для переноса *in vitro*, но также может быть использовано для применения *in vivo*. Dubensky et al. (1984) успешно инъектировали полиомавирусную ДНК в форме кальций-фосфатных преципитатов в печень и селезёнку 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 мембрани 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. Рекомбинантные 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 экспрессирующими 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 Меррифильду, 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 считываивания 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 influenzae* 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-хеллерные 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 амидазу 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, кодирующими такой полипептид, и/или антигенпрезентирующими клеткой (APC), 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, секрецируют 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 использовани-

ем меченного тритием тимицина и измерения количества меченного тритием тимицина, 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- $\gamma$ ) 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, донор-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 значительно-го неблагоприятного эффекта при контакте с клетками-мишениями 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, трансбукальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, супензий, 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 вышеупомянутого 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 и 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, трансбукальных 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, раскрытие здесь, парентерально, внутривенно, внутримышечно, 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 полизиленгликолях 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 экстремального 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 контаминации 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 полизиленгликоль и тому подобное), подходящие их смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов можно облегчить путем 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 путем 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 вакумной 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 аминогруппами 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, trimetilamin, гистидин, прокайн 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 суспензирования в жидкости перед инъекцией. Композиция также может быть эмульгирована.

### 3. Назальная и трансбукиральная доставка

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции можно доставлять посредством интраназальных спреев, трансбукиральных спреев, ингаляции и/или других приспособлений для доставки аэрозолей. Способы доставки генов, нуклеиновых кислот и пептидных композиций непосредственно в легкие, например, посредством назальных и трансбукиральных 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, нанокапсулами и микрочастицами

В некоторых воплощениях авторы изобретения предполагают применение липосом, нанокапсул, 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 Chouin, 1987; патент США 5741516, конкретно включеный 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; Coupe, 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 мультиламеллярные концентрические бислойные везикулы (также называемые мультиламеллярными везикулами (MLV)). Обычно MLV имеют диаметры от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию небольших униламеллярных 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 c, 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 униламеллярных везикул (LUV). Их получают путем 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 мембранны 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 селезёнки. 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 селезёнке. 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, селезёнку, 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-Guerreiro 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 (Couvreur 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 пластиры.

### **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 (антителный и/или клеточно-опосредованный) на экзогенный антиген. Примеры иммуностимуляторов включают адьюванты, 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 адьювантный 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 ссылках. 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 коровьей оспы или другого поксвируса, ретровируса или аденоовируса), 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 голой 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, интракраниальное, 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 микросфера (например, полилактат-полигликолят) также могут быть использованы в качестве носителей для фармацевтических композиций по данному изобретению. Подходящие биоразлагаемые микросфера 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, адьюванты (например, гидроксид алюминия), растворенные вещества, которые делают композицию изотонической, гипотонической или слабо гипертонической относительно крови реципиента, супспендирующие агенты, загустители и/или консерванты. Альтернативно, композиции по настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде лиофилизата. Соединения также могут быть инкапсульированы в липосомы с использованием хорошо известной технологии.

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

делипидизированный, дегликолипидизированный *M. vaccae* ("pVac"). Подходящие адьюванты имеются в продаже, например, неполный адьювант и полный адьювант Фрейнда (Difco Laboratories, Detroit, MI); адьювант 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 (дикориномиколат 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; полифосфаты; биоразлагаемые микросферы; монофосфориллипид А (MPL®); и quil A (например, QS-21). В качестве адьювантов также могут быть использованы цитокины, такие как GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) или интерлейкин-2, -7 или -12.

Термин "адьювант" 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)). Адьюванты индуцируют иммунные ответы Th1-типа и Th-2-типа. Цитокины Th1-типа (например, IFN- $\gamma$ , 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. Адьюванты, способные к предпочтительной стимуляции Th1 клеточно-опосредованного иммунного ответа, описаны в WO 94/00153 и WO 95/17209.

В иммуногенных композициях, предложенных здесь, адьювантная 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 адьювант, 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 (дикориномиколат трегалозы), аминоалкилглюказамиnid-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 адьювантом, 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). Адьювантные 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, адено-вирусном 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 адьюванты для применения с целью индукции преимущественно ответа Th1-типа включают, например, комбинацию монофосфориллипida А (MPL®), предпочтительно 3-O-деацетилированного монофосфориллипida А (3D-MPL®), возможно с солью алюминия (см., например, Ribi, 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 мм 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 адьюванты 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. Адьюванты на основе MPL® доступны от GlaxoSmithKline (см. патенты США №№ 4436727, 4877611, 4866034 и 4912094).

CpG-содержащие олигонуклеотиды (в которых динуклеотид CpG не метилирован) также индуцируют преимущественно Th1-ответ. CpG представляет собой аббревиатуру для цитозин-гуанозиновых 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). CpG, 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 конъюгиру-

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 адьювант, 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 адьювантом является сапонин или миметики либо производные сапонина, такие как Quil A, предпочтительно QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), которые могут быть использованы по отдельности или в комбинации с другими адьювантами. Например, усиленная система включает комбинацию монофосфориллиптида А (MPL®) и производного сапонина, 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 адьювантная композиция, включающая QS21, 3D-MPL® и токоферол в эмульсии типа масло-в-воде, описана в WO 95/17210. Дополнительные сапониновые адьюванты для применения в настоящем изобретении включают QS7 (описанный в WO 96/33739 и WO 96/11711) и QS17 (описанный в патенте США № 5057540 и ЕР 0362279 B1).

Альтернативно, сапониновые композиции могут быть скомбинированы с наполнителями для вакцин, в состав которых входит хитозан или другие поликатионные полимеры, частицы полилактида и со-полимера 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 (paucilamellar) 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 адьювантная система включает комбинацию монофосфориллиптида А и производного сапонина, такую как комбинация QS21 и адьюванта 3D-MPL®, которая описана в WO 94/00153, или менее реактогенную композицию, где QS21 погашен холестерин-содержащими липосомами, как описано в WO 96/33739. Другие подходящие композиции содержат эмульсию типа масло-в-воде и токоферол. Другая подходящая адьювантная композиция, в которой используют QS21, адьюvant 3D-MPL® и токоферол в эмульсии типа масло-в-воде, описана в WO 95/17210.

Другая усиленная адьювантная система включает комбинацию CpG-содержащего олигонуклеотида и производного сапонина, 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 адьюванты включают MONTANIDE® ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS® (CSL), MF-59 (Chiron), адьюванты серии SBAS (SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium), Detox (Corixa), RC-529 (Corixa) и другие аминоалкилглюкозаминид-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 адьюванты 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 адьюванты включают молекулы адьюванта общей формулы (I):



где n равно 1-50, А представляет собой связь или -C(O)-, R представляет собой C<sub>1-50</sub>алкил или фенил-C<sub>1-50</sub>алкил.

Другим представляющим интерес адьювантом 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 C<sub>1-50</sub>, предпочтительно C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>алкил и наиболее предпочтительно C<sub>12</sub>алкил, и А 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 адьювантные 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 экспрессии. Композиции, изложенные здесь, могут быть введены в виде части препарата с непрерывным высвобождением (т.е. такого препарата, как капсула, губка или гель (составные, 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 матриксе-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-ко-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 амфи菲尔ное 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 секретируемые 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, селезёнки, 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 $\alpha$ , 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 $\alpha$ , 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 $\gamma$ -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 МНС (главного комплекса гистосовместимости), молекулы адгезии (например, CD54 и CD11) и костимуляторные молекулы (например, CD40, CD80, CD86 и 4-1BB).

Обычно АРС 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 импульльному 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 "примирующее" 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, примирующее 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 активации 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 несметное количество генов вариабельных 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 тетramer. Каждый тетramer 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 вариабельную область приблизительно из 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена. Термины "вариабельная легкая цепь ( $V_L$ )" и "вариабельная 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 получеч-

нием F(ab)'<sub>2</sub>, димера Fab, который сам по себе представляет собой легкую цепь, соединенную с V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1 посредством дисульфидной связи. F(ab)'<sub>2</sub> можно восстановить в мягких условиях с разрывом дисульфидной связи в шарнирной области, превращая при этом димер F(ab)'<sub>2</sub> 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 методологий 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 (иммуноферментный спот-анализ) Т-клеток можно использовать для мониторинга таких цитокинов, как интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ), 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 сукцинимидовым 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 антигенней 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 80<sup>TM</sup>.

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 PBMC), 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 ТБ.

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 мишней 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) соответствие 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 <sup>a</sup>
Betts JC, et al. <i>Mol. Microbiol.</i> , 2002, 43: 717-731	Голодание в условиях контроля O <sub>2</sub>	96 ч: 3 24 ч: 2 4 ч: 1

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

<sup>b</sup>Соотношение *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 мишней, 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 получаются 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  $\text{MaxH} < 1,15$  классифицировали как цитоплазматические, тогда как белки с  $\text{MaxH} > 1,15$  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. bacterium использовали SignalP с параметрами для грамположительных бактерий с целью идентификации секреции 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: <a href="http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/">antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/</a>  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	вебсайт: <a href="http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC">www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC</a>  "Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC." Pierre Dönnes and Arne Elofsson in: BMC Bioinformatics, 2002, 3: 25.
CD4	ProPred	вебсайт: <a href="http://www.imtech.res.in/raghava/propred/">www.imtech.res.in/raghava/propred/</a>  Singh, H. and Raghava, G.P.S. (2001) "ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites". <i>Bioinformatics</i> , 17(12), 1236-37.
	Teritope2	Программа собственной разработки на основе: H. Bian, J. Hammer (2004) "Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T-cell epitopes with TEPITOPE." <i>Methods</i> , 34: 468-75.
CD8	nHLA	вебсайт: <a href="http://www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/">www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/</a>  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.
	NetCTL	вебсайт: <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/">www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/</a>  "An integrative approach to CTL epitope prediction. A combined algorithm integrating MHC-I binding, TAP transport efficiency and proteasomal cleavage predictions." Larsen M.V., Lundsgaard C., Kasper Lamberth, Buus S., Brunak S., Lund O. and Nielsen M. <i>European Journal of Immunology</i> . 35(8): 2295-303, 2005.
	EpiJen	вебсайт: <a href="http://www.jenner.ac.uk/EpiJen/">www.jenner.ac.uk/EpiJen/</a>  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.

	Syfpeithi	вебсайт: www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm  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.
	PredTAP	вебсайт: antigen.i2r.a-star.edu.sg/predTAP/  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.
	PAPROC	вебсайт: www.paproc2.de/paprocc1/paprocc1.html  C. Kuttler, A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.-G. Rammensee, H. Schild, K.P. Hadeler, "An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages", J. Mol. Biol. 298 (2000), 417-429.  A.K. Nussbaum, C. Kuttler, K.P. Hadeler, H.-G. Rammensee, H. Schild, "PAPROC: A Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW", Immunogenetics, 53 (2001), 87-94.

### Результаты

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

Номер предсказанного CD4 эпитопа	Положение амино-кислоты	Последовательность эпитопа	SEQ ID No:	HLA аллель
1	57	WQGASSSAM	SEQ ID No: 30	DRB1_0401
2	81	VQAEQTAQQ	SEQ ID No: 31	DRB1_0401
3	100	VKTAVQQPM	SEQ ID No: 32	DRB1_0301, DRB1_1301
4	105	VQPMLVAAN	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	LVSLLVMSNL	SEQ ID No: 35	DRB1_1501
7	120	LVMSNLFGQQ	SEQ ID No: 36	DRB1_0401, DRB1_1301
8	140	YEQMWAADV	SEQ ID No: 37	DRB1_0101
9	144	WAADVSAMS	SEQ ID No: 38	DRB1_0401
10	172	LQNLAGLPA	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	FGNNNGSGLS	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 амино-кислоты	Последовательность эпитопа	SEQ ID No:	HLA аллель
1	2	NFSVLPP EI	SEQ ID No: 60	A24
2	5	VL PPEIN SA	SEQ ID No: 61	A2, A_0201
3	6	L PPEIN SAL	SEQ ID No: 62	B7, B8, B_3501, B51
4	8	P EINSALIF	SEQ ID No: 63	B44
5	9	EINSALI FA	SEQ ID No: 64	A_0201, A_0301
6	18	GAGPEPMAA	SEQ ID No: 65	A_0101, B_3501
7	20	GPEPMAAA	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	AWDGLAME L	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	AAAPYAAWLA	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	YAAWLAAA	SEQ ID No: 79	A_0301, B8, B_3501
21	73	AAWLAAA AV	SEQ ID No: 80	A2, A_0201, B7, B51
22	75	WLA AAAVQA	SEQ ID No: 81	A2, A3, A_0201
23	82	QAEQTAAQQA	SEQ ID No: 82	A1, A_0301
24	83	AEQTAQQAA	SEQ ID No: 83	B44, B_4403
25	86	TAAQAAAMI	SEQ ID No: 84	A3, B8, B51
26	91	AAMIAEFEA	SEQ ID No: 85	A_0201, A_0301, B_3501
27	92	AMIAEFEAV	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	ANRADLVS L	SEQ ID No: 94	B7, B44
36	114	RADLVS LVM	SEQ ID No: 95	B7, B_3501
37	118	VSLVMSNL F	SEQ ID No: 96	A24, A_0101
38	124	NLFGQNAPA	SEQ ID No: 97	A2
39	130	APAI AAIEA	SEQ ID No: 98	B7, B_3501
40	132	AI AAIEAT Y	SEQ ID No: 99	A1, A_0101, A3, A_0301
41	138	ATYEQMWA A	SEQ ID No: 100	A_0101, A2, A_0301
42	142	QMWAA DVSA	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	GASA IASAL	SEQ ID No: 105	B7, B_3501
47	160	AI ASALSPF	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	NLAGLP AWL	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	APAAAAMTA	SEQ ID No: 115	A3, B_3501, B7
57	189	AAMTAAAGI	SEQ ID No: 116	A1, A_2402, B51
58	192	TAAGIPAL	SEQ ID No: 117	B7, B51, Cw_0602
59	193	AAAGIPALA	SEQ ID No: 118	A_0101, A_0301
60	199	LAGGPTAI	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	NLGSNNVGV	SEQ ID No: 125	A2, A_0201
67	383	SLNTGSYNM	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	GVGQQGSLQF	SEQ ID No: 130	B7, B_3501
72	456	SITTPDLTL	SEQ ID No: 131	A_0101, A_0201, A_0301
73	459	TPDLTLPPL	SEQ ID No: 132	B7, B_3501, B51
74	461	DLTLPPLQI	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	PPLSIPSVA	SEQ ID No: 171	B7, B_3501
113	640	IPSVAIAPPV	SEQ ID No: 172	B7, B51
114	645	IPPVTVPPPI	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	GTTGGFSL	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	PITVGQJGV	SEQ ID No: 182	A_0201
124	698	QIGVGQQFGL	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	TPRITVPFA	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	ALJGEFDL	SEQ ID No: 196	A_0101, A2, A_0201
138	758	GEFDLPQLV	SEQ ID No: 197	B44
139	762	LPQLVVHPY	SEQ ID No: 198	B7, B51

140	764	QLVHPTL	SEQ ID No: 199	A_0101, A2, A_0201, B8
141	768	HPTLTGPI	SEQ ID No: 200	B7, B8, B51
142	770	YTLTGPVI	SEQ ID No: 201	A_0101, A2, A_0201
143	774	GPIVGSSFF	SEQ ID No: 202	A24, B7, B_3501
144	775	PIVIGSFFL	SEQ ID No: 203	A_0101, A_0301
145	780	SFFLPFNI	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	VPAINVDGFI	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	PIVGCGFTL	SEQ ID No: 216	A_0101, A_0201, A_0301
158	828	LPQITTQEII	SEQ ID No: 217	B7, B51
159	829	PQITTQEII	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	SVASVVSFG	SEQ ID No: 246	A24, B7
188	1036	GFANIGTNL	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](http://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 С-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 жидким азотом до проведения тестирования (для дополнительных деталей см. Alvani 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 меченного тритием тимицина. В этом методе оценивают размножение клеток после стимуляции антигеном *in vitro*. На практике клеточную пролиферацию определяют, оценивая включение меченного тритием тимицина в ДНК, процесс, тесно связанный с последующими изменениями в количестве клеток.

Более подходит, если пролиферацию лимфоцитов можно провести с использованием сукцинидиолового 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 аминогруппами. 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 РМВС могут быть промыты и окрашены CFSE, после чего подвергнуты культивированию ( $2 \times 10^5$  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- $\gamma$  (или продуцирование других цитокинов, таких как, например, IL2, TNF-альфа, IL5, IL12 и так далее) можно измерить, используя твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). ELISA-планшеты могут быть покрыты мышиными моноклональными антителами против человеческого IFN- $\gamma$  (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- $\gamma$  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 Co., 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 TMB (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 CB6F1 мышах

Иммуногенность антигена оценивали на CB6F1 мышах (первое поколение скрещенных BALB/c и C57BL/6 мышей).

CB6F1 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, производящих IL-2, и/или IFN-гамма, и/или TNF-альфа) посредством проточного цитометрии после рестимуляции *in vitro* в течение ночи пулами 15-мерных пептидов, охватывающих представляющие интерес последовательности.

Детекцию мышиных Т-клеток, которые экспрессируют IL-2 и/или IFN-гамма, и/или TNF-альфа, выполняли, используя кратковременную инициируемую 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 представляющую 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 брефелдин-А (BD-Pharmingen) добавляли через 2 ч после начала культивирования при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и клетки поддерживали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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) цианин5.5 (Cy5.5) антитела против CD8 альфа (клон 53-6.7, BD-Pharmingen).

Затем клетки промывали, фиксировали, подвергали пермеабилизации (набор Cytofix-супортем, BD-Pharmingen) и окрашивали, используя аллофикацианин-связанные антитела против IFN-g (клон XMG1.2, BDPharmingen), флуоресцеин-изотиоцианат(FITC)-связанные антитела против IL-2 (клон JES 6-5H4, Beckman Coulter) и фикоэрритрин(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 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, производящих 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 (штрихи).

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 адьювантной системой AS01E (липосомной адьювантной 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 (штрихи).

На фиг. 7 показано, что на 21-е сутки (то есть через 7 суток после второй иммунизации) Pv1753c-специфические CD4 и CD8 Т-клеточные ответы детектируются у мышей, иммунизированных любой из двух доз Rv1753c/AS01E. Уровни Pv1753c-специфических CD4 Т-клеточных ответов одинаковы независимо от иммунизирующей дозы Rv1753c. И наоборот, мыши, иммунизированные 1 мкг Rv1753c/AS01E, проявляли более сильные Pv1753c-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 ТБ

Эксперименты проводили с целью оценки ответа периферических Т-клеток, специфического в отношении антигена по изобретению, у 4 ранее не подвергавшихся ТБ здоровых взрослых (кожная проба PPD = 0 мм) и у 8 латентно инфицированных ТБ 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 (СМИ) ответа выполняли путём измерения цитокинов на выделенных мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), 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)). PBMC стимулировали *in vitro* одним из пулов 15-мерных пептидов (с перекрыванием по 11 аминокислотам) охватывающих всю последовательность представляющего интерес антигена. Клетки стимулировали пептидами в течение 2 ч, затем культивировали в течение ночи в присутствии брефелдина A, обрабатывали для ICS и анализировали с использованием проточной цитометрии. Изменяли 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-IFNg 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 CB6F1, 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> ПРТ
<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 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 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 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	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	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 Pro Ile		
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 Pro Pro Ile Thr Pro Ile		
900	905	910	
Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly	Val 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	gcccggagatc	aattcagcgc	tgatattcg	cggggcagg	60
ccggaaaccga	tggccggccgc	cgcgcacggcc	tggacgggt	tggccatg	120
gcccgcagct	ctttcgatc	agtgcacatcc	ggactcg	ggggggcg	180
tcgtcgatcg	cgatggccgc	agcggcagcc	ccctatgcgg	cgtggctgc	240
gtccaggccg	agcagacggc	cgttcaggct	gcggcgatg	tagccgagg	300
aagacggccg	tggtgccagcc	gatgtgggt	gcggccaacc	gtggccgacc	360
gtgtatgtcga	acctgtttgg	acagaacgt	ccggcgatcg	gtgtcgctg	420
gagcaaatgt	gggtgtccgca	tgtgtccg	atgtctgcct	accatggccg	480

atcgccctcg	cgttgtcccc	gttcaagtaaa	cgcgtcaga	acctggctgg	cttgcggct	540
tggttggcca	gcggcgccc	tgcggccgc	atgaccgcag	ccgcaggcat	accggcgctt	600
gcgggcggac	ccacccgcatt	caacctggc	atagccaacg	tccggcggtgg	caacgtcgcc	660
aacgcaca	acggcgttc	caacatcgcc	aacgcacaacc	tggcaacta	caatttcggg	720
tccggaaat	tccggaaat	caatatcgcc	tccggaaacc	tggtaataa	caacatcgcc	780
ttcggaaacc	tccggcagcaa	caatgtcgcc	gtggaaaacc	ttggcaatct	caacaccggg	840
tttgcacaaca	cgggttggg	caacttcgge	tttgcacaaca	ctggcaacaa	caacatcgcc	900
atcggtctta	ccggcaacaa	ccagatcgga	atcggegggc	tcaactcggg	caccgggaat	960
ttcggattgt	tcaactcggg	caucggaaac	gtccgttct	tcaactcggg	caatggaaac	1020
tttgcatacg	gaaactcggg	taatttcaac	accgggtggct	gaaattctgg	acacgggaac	1080
acgggctct	tcaatcgccg	ctcggttaac	accggatgt	tggacgtcg	caacgcgaac	1140
acaggcagcc	tgaacacccg	cagtataac	atgggcgact	tcaatccggg	gtcgccaac	1200
accggcacgt	tcaacacccg	aatgtcta	acgggtttcc	tcaacgcgg	aaatatcaac	1260
actgggtgtct	tcaatattgg	ccacatgaat	aatgggtgt	tcaacacccg	tgacatgaac	1320
aatggcgtct	tctaccgggg	cgtggggcag	ggcagcctgc	agttcagtat	tacgacacct	1380
gatctgactc	tgcgcgcgt	gcaataatccg	gggatatacg	ttccgcgtt	cagtctgcg	1440
gcaataacgc	tgccgtcgct	gaaatcccg	gccgcacca	caccgcgg	catcaccgtc	1500
ggcgccctca	gcctgcccgg	gttgcgttg	ccgtcggtga	acatccggc	cgccaccaca	1560
ccagccaaaca	tcaccgtggg	tgccttcagc	ctgcccgggt	tgacgttgcc	gtcggtgaac	1620
atccccggcc	ccaccacacc	agoccaacatc	accgtcgccg	ccttcagcgt	gccccgggt	1680
acgttgcgt	cgttgacatc	cccggccggc	accacaccag	ccaaatcatc	cgtccggccc	1740
ttcagcgtc	ccgggttgc	gttgcgtcg	tttgcacatcc	ccggccggcc	cacaccaggc	1800
aacatcaccg	tcggcgctt	cagcctgccc	gggttgcgt	tgccgtcg	gaacatcccg	1860
gccgcacca	caccgccaa	catcaccgt	agccgttcc	agttgcctcc	gctgagtatt	1920
ccttccgttag	ccatccggcc	gttgacgtcg	ccggccattt	cggtgggtgc	ttttatttg	1980
cogccatttgc	agatccggg	agttactatt	cgcgcgt	ccatccggc	gggttatcaca	2040
atcggtgtct	ttatgtctca	tgcgcata	actcaaccc	taacgggtcg	ccagattgc	2100
gtggggccat	tttgcgttcc	ctccataggc	tggatgttt	ttctaaagcac	acctaggata	2160
acagtaccgg	cttttggaa	accctttacc	ctacaattcc	agaccaatgt	gcctgcgtt	2220
cagccggccg	ggggggggct	tagtacttcc	accaatggcg	ccctcatctt	cggtgagtt	2280
gacttaccac	aattgggtgt	tcacccatca	acatggaccg	gccctatttg	cattgggtca	2340
tttcttctgc	ccgccttcaa	cataccggg	atcgatgtcc	cgcgtatcaa	cgtcgatgc	2400
ttcacccgtc	cgcagatcac	caccccgat	atcaccaccc	ccggatgtcg	gatccctcg	2460
atcggtgtgg	ggggcttcc	tctgcgcag	atcaccaccc	aggaatcat	cacccggag	2520
ctaaccatca	actcgatcg	cgatggccgg	ttcaccctgc	cgcaatcac	cacccaccc	2580
atcaccaccc	cacccgtac	catcgacccc	atcaaccc	ccggcttcc	cctcccccaa	2640
atcaccaccc	cacccatcac	cacccaccc	ctgaccatcc	accccatcaa	cctcaccggc	2700
ttcacccctcc	cccaaatcac	cacccaccc	atcaccaccc	caccgtcac	catcgaccc	2760
atcggtgtgg	ggggcttcc	cacccccc	ctcaccgttc	ccggcatcca	cctgcccacg	2820
accacgtcg	ggggcttcc	gatcccccgg	ggggccggct	acttcaactc	gagcaccgcg	2880
ccttcgtcg	gtttcttcaa	ttccgtgtcg	ggccgcact	ccggcttcc	caacaacgc	2940
tcgggcctt	cgggttgg	caacccaac	ccggccgggc	tgttgggg	ctcggtctat	3000
cagaacttc	ccgggtctt	tccaaacctt	gcagccgt	ctcaggcttc	gccaacagg	3060
gccaacagg	gtatctgc	gttctcgta	gcaagcgtcg	tttcggctt	tgccaatata	3120
ggcacaacc	ttgggggtt	tttccaaaggc	accacgtct	aa		3162

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> WTA MM CDC1551  
  
<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 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 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 Gly Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu		
545	550	555
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 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	860
Thr Pro Glu Phe Ala Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu		
865	870	875
880		
Pro Gln Ile Thr Gln Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn		
885	890	895
Ser Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro		
900	905	910
Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe		
915	920	925
Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr		
930	935	940
Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr		
945	950	955
960		
Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly		
965	970	975
Gly Phe Thr Thr Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro Ser		
980	985	990
Thr Thr Ile Gly Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe Asn		
995	1000	1005

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> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Ήπαμμ F11

<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	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	
65							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							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							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
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 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
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
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 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 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> NPT  
 <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 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 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 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 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  
 705 710 715 720  
 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> RPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> *Wtamm 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
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
Leu	Val	Gly	Gly
Gly	Ala	Trp	Gln
Gly	Ala	Ser	Ser
Ser	Ala	Ala	Ala
50	55	60	
Met	Ala	Ala	Ala
Ala	Ala	Ala	Pro
Tyr	Ala	Ala	Trp
Ala	Leu	Ala	Ala
Ala	Ala	Ala	Ala
65	70	75	80
Val	Gln	Ala	Glu
Gln	Thr	Ala	Ala
Gln	Ala	Ala	Ala
Ala	Ala	Ala	Met
Ile	Ala	Ala	Glu
85	90	95	
Phe	Glu	Ala	Val
Lys	Thr	Ala	Val
Val	Gln	Pro	Met
Leu	Val	Ala	Ala
Ala	Ala	Ala	Ala
100	105	110	
Asn	Arg	Ala	Asp
Leu	Val	Ser	Leu
Ala	Ala	Ala	Met
Asn	Leu	Phe	Gly
Gln	115	120	125
Asn	Ala	Pro	Ala
Ile	Ala	Ala	Ile
Glu	Ala	Thr	Tyr
Glu	130	135	140
Ala	Ala	Asp	Val
Ser	Ala	Met	Ser
Ala	Tyr	His	Ala
Gly	145	150	155
Ala	Ala	Ser	Ala
Ile	Leu	Ser	Pro
Phe	Ser	Lys	Pro
Ala	Ala	Gln	Asn
Leu	Ala	Asn	Leu
Ala	Ala	Ala	Ala
165	170	175	
Gly	Leu	Pro	Ala
Trp	Leu	Ala	Ser
Gly	Ala	Pro	Ala
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	210	215	220
Gly	Leu	Ala	Asn
Ile	Gly	Ile	Asn
Asn	Ala	Asn	Leu
Asn	225	230	235
Phe	Gly	Asn	Asn
Gly	240	245	255
Ser	Gly	Asn	Phe
Gly	255	260	270
Asn	Asn	Ile	Gly
Phe	Gly	Asn	Asn
Asn	275	280	285
Asn	Leu	Gly	Asn
Leu	Asn	Asn	Thr
Gly	290	295	300
Phe	Gly	Asn	Asn
Gly	300	310	315
Asn	Asn	Asn	Ile
Gly	320	325	335
Ile	Gly	Ile	Gly
Gly	335	340	350
Asn	Asn	Gly	Asn
Phe	Gly	Ile	Gly
Asn	355	360	365
Gly	Trp	Asn	Ser
Gly	365	370	380
Asn	Asn	Asn	Asn
Asn	385	390	395
Asn	Asn	Asn	Asn
Asn	400	405	415
Asn	Asn	Asn	Asn
Asn	415	420	430
Asn	Asn	Asn	Asn
Asn	430	435	445
Asn	Asn	Asn	Asn
Asn	445	450	460
Asn	Asn	Asn	Asn
Asn	460	465	475
Asn	Asn	Asn	Asn
Asn	475	480	485
Asn	Asn	Asn	Asn
Asn	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 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 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> ПРТ  
<213> *Mycobacterium bovis*

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Штамм БЦК

<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 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 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 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 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 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
Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile		800
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
Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val		880
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
Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe		960
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> NPT  
<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> NPT  
<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> NPT  
<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> NPT  
<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 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 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 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 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> NPT  
 <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	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	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 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	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 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	

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 423

&lt;212&gt; ΠΡΤ

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

&lt;400&gt; 15

Met Asp Phe Gly Leu Leu Pro Pro Glu Val Asn Ser Ser Arg Met Tyr		
1	5	10
Ser Gly Pro Gly Pro Glu Ser Met Leu Ala 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
Ala Leu Ala Lys Glu Thr Ala Thr Gln Ala Arg 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 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> NPT  
 <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 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> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>																
<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	Aia	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	Pro	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	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 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 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> NPT  
 <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> IIPT  
<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 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 205	190	195
		200
<210> 21		
<211> 355		
<212> NPT		
<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
<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
Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu		
1	5	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
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
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
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
Pro Pro Ala		320

<210> 22  
 <211> 323  
 <212> ПРТ  
 <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 Gin 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> ПРТ  
 <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 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 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 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 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 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 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 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 Asn Gln

450	455	460
Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser	Leu Thr Ser	
465	470	475
Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu	Pro Val Gly	480
485	490	495
Gln Met Gly Ala Arg Ala 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
Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly	Ala Gly Thr	560
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
Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly	Asn Ser Gly	640
645	650	655
Gly Gln 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
Ala Ala Ser		720

<210>	26		
<211>	702		
<212>	ПРТ		
<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 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 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 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		
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 Glu Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly		
580	585	590
Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val Gly		
595	600	605

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 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 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 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 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 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 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

795	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> ПРТ  
<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 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 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
Ala Ala Val 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
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
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 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
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
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
Ala Ala Ser Ser Gly Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu		
725	730	735
Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln		
740	745	750

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 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> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> M114

<400> 29  
 Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln 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 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 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
Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly		640
645	650	655
Gly Gln 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
Ala Ala Ser Ser Thr Met Asp Phe Gly Leu Leu Pro Pro Glu Val Asn		720
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
Leu Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Lys Glu Thr Ala Thr Gln Ala Arg		800
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
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
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> PPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 30  
 Trp Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ala Met  
 1 5

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 31  
 Val Gln Ala Glu Gln Thr Ala Ala Gln  
 1 5

<210> 32  
 <211> 9  
 <212> PPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 32  
 Val Lys Thr Ala Val Val Gln Pro Met  
 1 5

<210> 33  
 <211> 9  
 <212> PPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 33  
 Val Gln Pro Met Leu Val Ala Ala Asn  
 1 5

<210> 34  
 <211> 9  
 <212> PPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 34  
 Leu Val Ala Ala Asn Arg Ala Asp Leu  
 1 5

<210> 35

<211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 35  
 Leu Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu  
 1 5  
  
 <210> 36  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 36  
 Leu Val Met Ser Asn Leu Phe Gly Gln  
 1 5  
  
 <210> 37  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 37  
  
 Tyr Glu Gln Met Trp Ala Ala Asp Val  
 1 5  
  
 <210> 38  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 38  
 Trp Ala Ala Asp Val Ser Ala Met Ser  
 1 5  
  
 <210> 39  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 39  
 Leu Gln Asn Leu Ala Gly Leu Pro Ala  
 1 5  
  
 <210> 40  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 40  
 Phe Gly Asn Leu Gly Ser Asn Asn Val  
 1 5  
  
 <210> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 47  
<211> 9

<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 53  
<211> 9  
<212> NPT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 71

Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala  
1 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 96  
 <211> 9  
 <212> NPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 96  
 Val Ser Leu Val Met Ser Asn Leu Phe  
 1 5  
  
 <210> 97  
 <211> 9  
 <212> NPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 97  
 Asn Leu Phe Gly Gln Asn Ala Pro Ala  
 1 5  
  
 <210> 98  
 <211> 9  
 <212> NPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 98  
 Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala  
 1 5  
  
 <210> 99  
 <211> 9  
 <212> NPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 99  
 Ala Ile Ala Ala Ile Glu Ala Thr Tyr  
 1 5  
  
 <210> 100  
 <211> 9  
 <212> NPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 100  
 Ala Thr Tyr Glu Gln Met Trp Ala Ala  
 1 5  
  
 <210> 101  
 <211> 9  
 <212> NPT  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
 <400> 101  
 Gln Met Trp Ala Ala Asp Val Ser Ala  
 1 5  
  
 <210> 102

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 108  
<211> 9

<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 108  
Pro Phe Ser Lys Pro Leu Gln Asn Leu  
1 5

<210> 109  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 109  
Lys Pro Leu Gln Asn Leu Ala Gly Leu  
1 5

<210> 110  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 110  
Asn Leu Ala Gly Leu Pro Ala Trp Leu  
1 5

<210> 111  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 111  
Leu Ala Gly Leu Pro Ala Trp Leu Ala  
1 5

<210> 112  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 112  
Leu Pro Ala Trp Leu Ala Ser Gly Ala  
1 5

<210> 113  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 113  
Trp Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala  
1 5

<210> 114  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 114  
Gly Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr Ala  
1 5

<210> 115  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 115  
Ala Pro Ala Ala Ala Met Thr Ala Ala  
1 5

<210> 116  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 116  
Ala Ala Met Thr Ala Ala Ala Gly Ile  
1 5

<210> 117  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 117  
Thr Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu  
1 5

<210> 118  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 118  
Ala Ala Ala Gly Ile Pro Ala Leu Ala  
1 5

<210> 119  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 119  
Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Ala Ile  
1 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 132

Thr Pro Asp Leu Thr Leu Pro Pro Leu  
1 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 138  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 138  
Ala Phe Ser Leu Pro Ala Ile Thr Leu

1 5

<210> 139  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
<400> 139  
Leu Pro Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu  
1 5

<210> 140  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
<400> 140  
Ala Ile Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile  
1 5

<210> 141  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
<400> 141  
Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala  
1 5

<210> 142  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
<400> 142  
Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala Ala  
1 5

<210> 143  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
<400> 143  
Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val  
1 5

<210> 144  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*  
  
<400> 144  
Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val Gly Ala  
1 5

<210> 145  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 145  
Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu  
1 5

<210> 146  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 146  
Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu  
1 5

<210> 147  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 147  
Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu  
1 5

<210> 148  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 148  
Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala  
1 5

<210> 149  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 149  
Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val  
1 5

<210> 150  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 150  
Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu  
1 5

<210> 151  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 151  
Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu  
1 5

<210> 152  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 152  
Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu  
1 5

<210> 153  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 153  
Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala  
1 5

<210> 154  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 154  
Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val  
1 5

<210> 155  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 155  
Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu  
1 5

<210> 156  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 156  
Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu  
1 5

<210> 157  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 157  
Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu  
1 5

<210> 158  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 158  
Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala  
1 5

<210> 159  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 159  
Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val  
1 5

<210> 160  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 160  
Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu  
1 5

<210> 161  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 161  
Ala Phe Ser Leu Pro Gly Leu Thr Leu  
1 5

<210> 162  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 162  
Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu  
1 5

<210> 163

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

<400> 163  
Thr Leu Pro Ser Leu Asn Ile Pro Ala  
1 5

<210> 164  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 164  
Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val  
1 5

<210> 165  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 165  
Asn Ile Thr Val Gly Ala Phe Ser Leu  
1 5

<210> 166  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 166  
Leu Pro Gly Leu Thr Leu Pro Ser Leu  
1 5

<210> 167  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 167  
Ala Thr Thr Pro Ala Asn Ile Thr Val  
1 5

<210> 168  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 168  
Pro Ala Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe  
1 5

<210> 169  
<211> 9

<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 169  
Asn Ile Thr Val Ser Gly Phe Gln Leu  
1 5

<210> 170  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 170  
Leu Pro Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val  
1 5

<210> 171  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 171  
Pro Pro Leu Ser Ile Pro Ser Val Ala  
1 5

<210> 172  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 172  
Ile Pro Ser Val Ala Ile Pro Pro Val  
1 5

<210> 173  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 173  
Ile Pro Pro Val Thr Val Pro Pro Ile  
1 5

<210> 174  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 174  
Val Pro Pro Ile Thr Val Gly Ala Phe  
1 5

<210> 175  
<211> 9  
<212> NPT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 175  
Pro Leu Gln Ile Pro Glu Val Thr Ile  
1 5

<210> 176  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 176  
Ile Pro Glu Val Thr Ile Pro Gln Leu  
1 5

<210> 177  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 177  
Thr Ile Pro Gln Leu Thr Ile Pro Ala  
1 5

<210> 178  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 178  
Leu Thr Ile Pro Ala Gly Ile Thr Ile  
1 5

<210> 179  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 179  
Gly Ile Thr Ile Gly Gly Phe Ser Leu  
1 5

<210> 180  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 180  
Leu Pro Ala Ile His Thr Gln Pro Ile  
1 5

<210> 181  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 181  
Ala Ile His Thr Gln Pro Ile Thr Val  
1 5

<210> 182  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 182  
Pro Ile Thr Val Gly Gln Ile Gly Val  
1 5

<210> 183  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 183  
Gln Ile Gly Val Gly Gln Phe Gly Leu  
1 5

<210> 184  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 184  
Gly Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val  
1 5

<210> 185  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 185  
Leu Pro Ser Ile Gly Trp Asp Val Phe  
1 5

<210> 186  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 186  
Asp Val Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile  
1 5

<210> 187  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 187  
Phe Leu Ser Thr Pro Arg Ile Thr Val  
1 5

<210> 188  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 188  
Thr Pro Arg Ile Thr Val Pro Ala Phe  
1 5

<210> 189  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 189  
Phe Gly Ile Pro Phe Thr Leu Gln Phe  
1 5

<210> 190  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 190  
Phe Thr Leu Gln Phe Gln Thr Asn Val  
1 5

<210> 191  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 191  
Gln Phe Gln Thr Asn Val Pro Ala Leu  
1 5

<210> 192  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 192  
Ala Leu Gln Pro Pro Gly Gly Gly Leu  
1 5

<210> 193  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 193

Leu Ser Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu  
 1 5

<210> 194  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 194  
 Ser Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile  
 1 5

<210> 195  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 195  
 Thr Phe Thr Asn Gly Ala Leu Ile Phe  
 1 5

<210> 196  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 196  
 Ala Leu Ile Phe Gly Glu Phe Asp Leu  
 1 5

<210> 197  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 197  
 Gly Glu Phe Asp Leu Pro Gln Leu Val  
 1 5

<210> 198  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 198  
 Leu Pro Gln Leu Val Val His Pro Tyr  
 1 5

<210> 199  
 <211> 9  
 <212> ΠΡΤ  
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 199  
 Gln Leu Val Val His Pro Tyr Thr Leu

1 5

<210> 200  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 200  
His Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile  
1 5

<210> 201  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 201  
Tyr Thr Leu Thr Gly Pro Ile Val Ile  
1 5

<210> 202  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 202  
Gly Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe  
1 5

<210> 203  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 203  
Pro Ile Val Ile Gly Ser Phe Phe Leu  
1 5

<210> 204  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 204  
Ser Phe Phe Leu Pro Ala Phe Asn Ile  
1 5

<210> 205  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 205  
Leu Pro Ala Phe Asn Ile Pro Gly Ile  
1 5

<210> 206  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 206  
Ile Pro Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile  
1 5

<210> 207  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 207  
Gly Ile Asp Val Pro Ala Ile Asn Val  
1 5

<210> 208  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 208  
Val Pro Ala Ile Asn Val Asp Gly Phe  
1 5

<210> 209  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 209  
Ala Ile Asn Val Asp Gly Phe Thr Leu  
1 5

<210> 210  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 210  
Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala  
1 5

<210> 211  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 211  
Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Ala Ile  
1 5

<210> 212  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 212  
Thr Pro Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe  
1 5

<210> 213  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 213  
Ala Ile Thr Thr Pro Glu Phe Ala Ile  
1 5

<210> 214  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 214  
Thr Pro Glu Phe Ala Ile Pro Pro Ile  
1 5

<210> 215  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 215  
Ile Pro Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe  
1 5

<210> 216  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 216  
Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu  
1 5

<210> 217  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 217  
Leu Pro Gln Ile Thr Thr Gln Glu Ile  
1 5

<210> 218  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 218  
Pro Gln Ile Thr Thr Gln Glu Ile Ile  
1 5

<210> 219  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 219  
Glu Ile Ile Thr Pro Glu Leu Thr Ile  
1 5

<210> 220  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 220  
Thr Pro Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile  
1 5

<210> 221  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 221  
Glu Leu Thr Ile Asn Ser Ile Gly Val  
1 5

<210> 222  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 222  
Ser Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Leu  
1 5

<210> 223  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 223  
Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile  
1 5

<210> 224

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

<400> 224  
Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu  
1 5

<210> 225  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 225  
Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile  
1 5

<210> 226  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 226  
Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile  
1 5

<210> 227  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 227  
Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu  
1 5

<210> 228  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 228  
Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile  
1 5

<210> 229  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 229  
Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val  
1 5

<210> 230  
<211> 9

<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 230  
Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe  
1 5

<210> 231  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 231  
Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His  
1 5

<210> 232  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 232  
Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu  
1 5

<210> 233  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 233  
Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile  
1 5

<210> 234  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 234  
His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala  
1 5

<210> 235  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 235  
Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly Ala Phe  
1 5

<210> 236  
<211> 9  
<212> NPT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 236  
Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr  
1 5

<210> 237  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 237  
Ser Thr Ala Pro Ser Ser Gly Phe Phe  
1 5

<210> 238  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 238  
Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala Gly Leu  
1 5

<210> 239  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 239  
Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser Gly Phe  
1 5

<210> 240  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 240  
Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ser Asn Leu  
1 5

<210> 241  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 241  
Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe  
1 5

<210> 242  
<211> 9  
<212> NPT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 242  
Phe Ala Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe  
1 5

<210> 243  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 243  
Asn Arg Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val  
1 5

<210> 244  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 244  
Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val  
1 5

<210> 245  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 245  
Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val  
1 5

<210> 246  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 246  
Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe  
1 5

<210> 247  
<211> 9  
<212> ΠΡΤ  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 247  
Gly Phe Ala Asn Ile Gly Thr Asn Leu  
1 5

<210> 248  
<211> 450  
<212> ΠΡΤ  
<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 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> ПРТ  
 <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 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 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 нукleinовой 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.

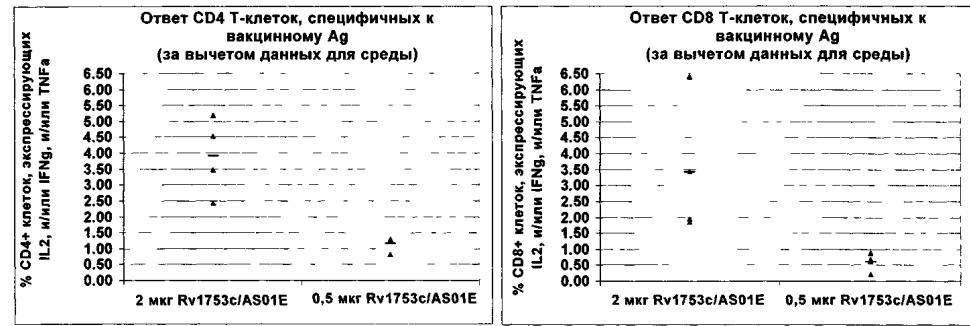
10. Полинуклеотид по п.6 для применения в замедлении реактивации туберкулеза.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая:
  - (а) полипептидный антиген, содержащий:
    - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
    - (2) вариант последовательности белка Rv1753c, имеющий по меньшей 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 нукleinовой 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 нукleinовой 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 нукleinовой 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;
 

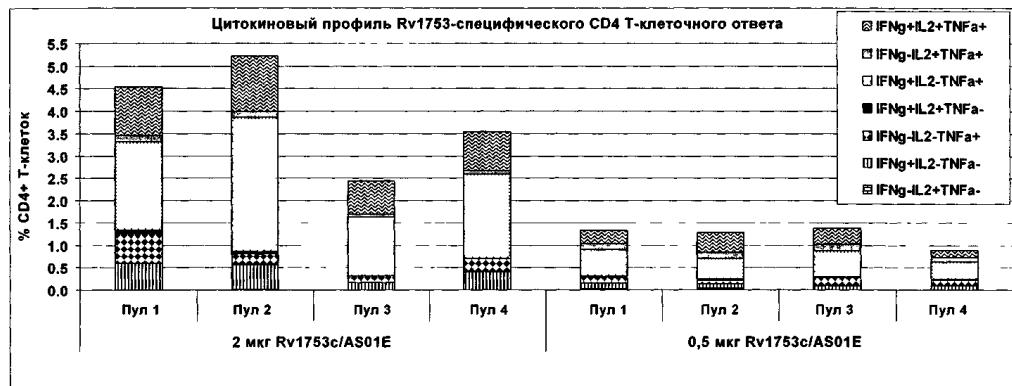
в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения туберкулеза.
    25. Применение полинуклеотида, содержащего последовательность нукleinовой кислоты, кодирующую полипептидный антиген, содержащий:
      - (1) последовательность белка Rv1753c с SEQ ID NO: 1 или 3-7;
      - (2) вариант 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.

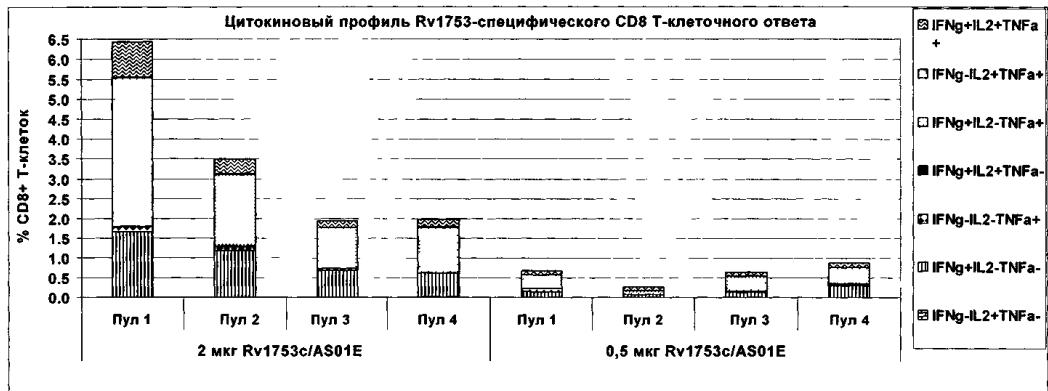


Ag = антиген

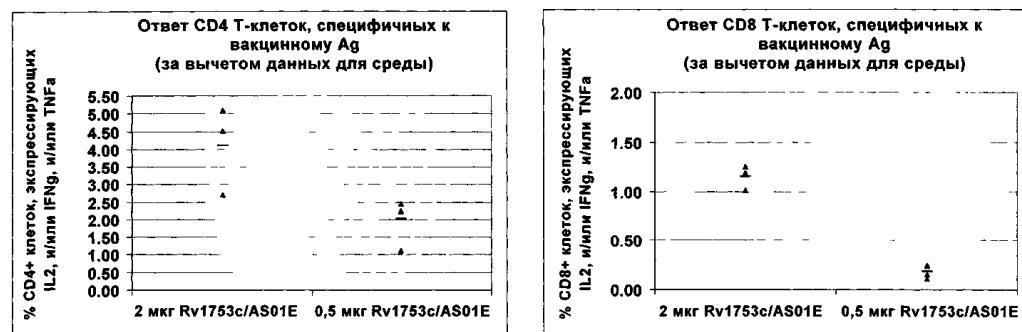
Фиг. 1



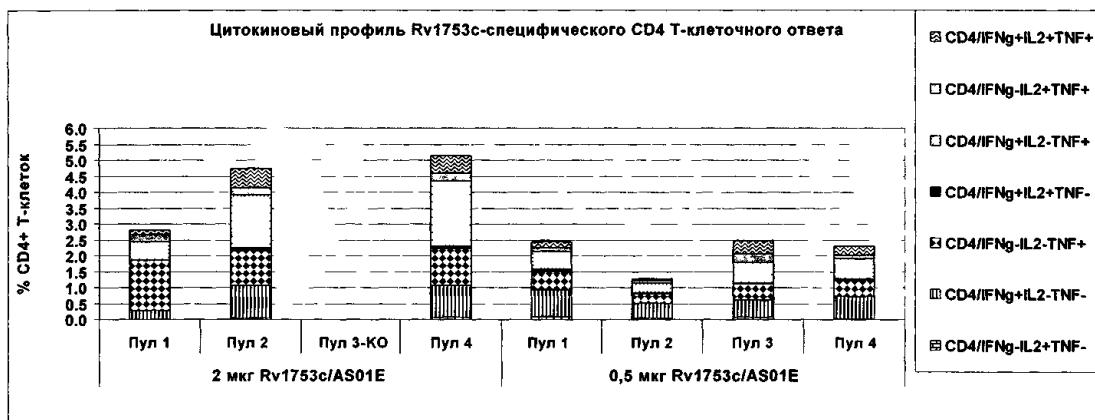
Фиг. 2



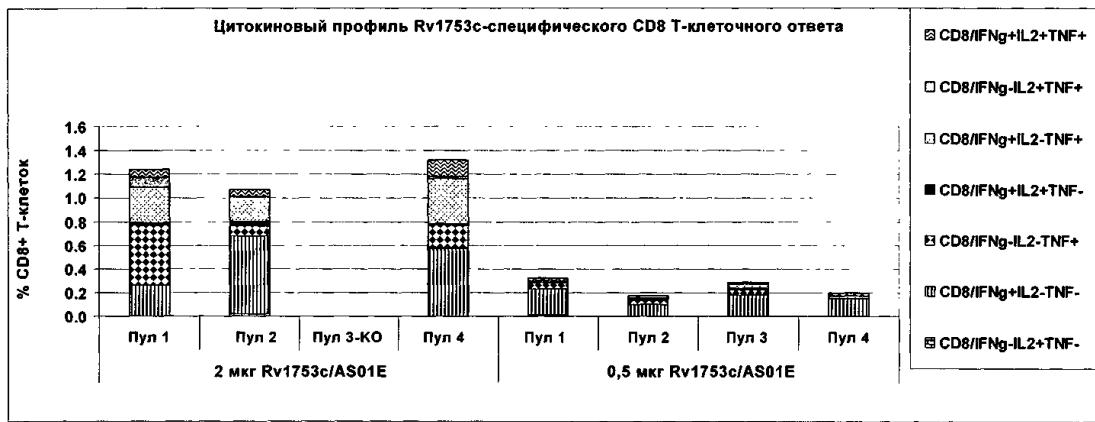
Фиг. 3



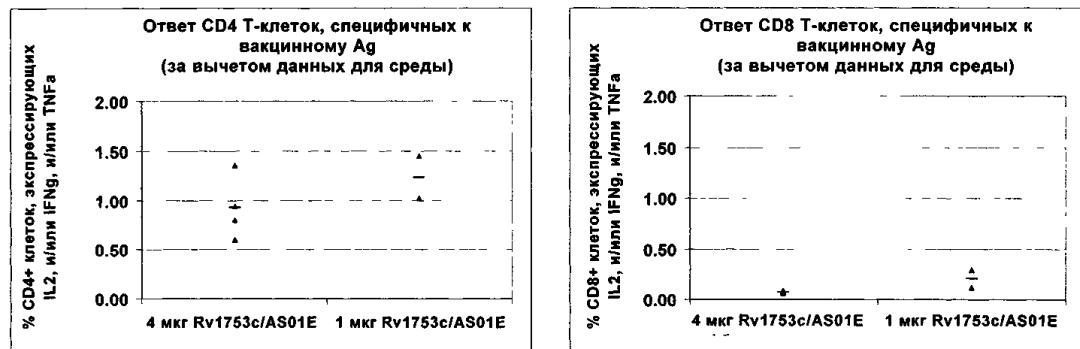
Фиг. 4



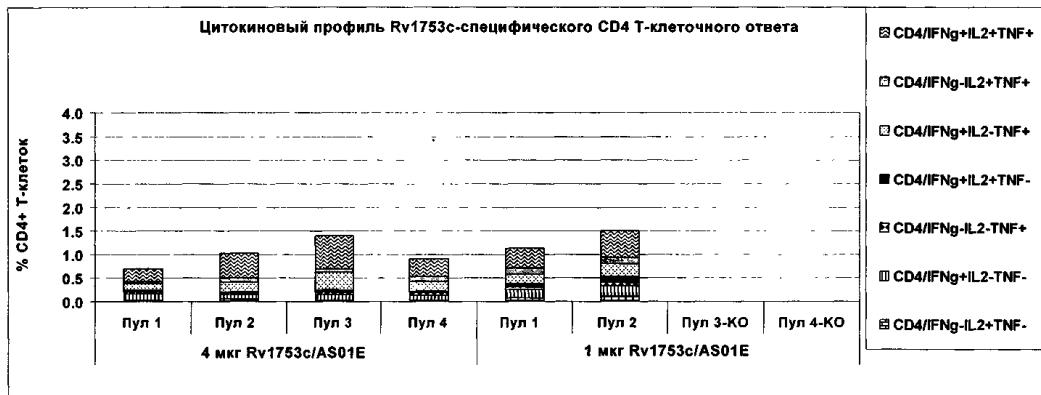
Фиг. 5



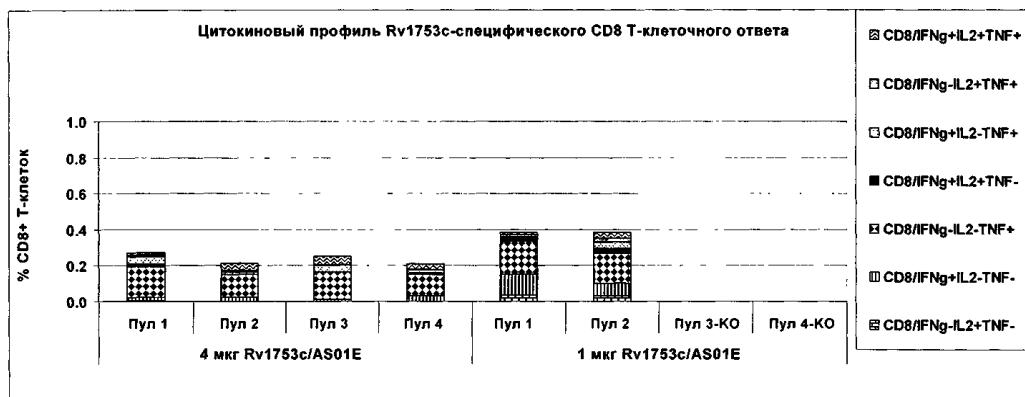
Фиг. 6



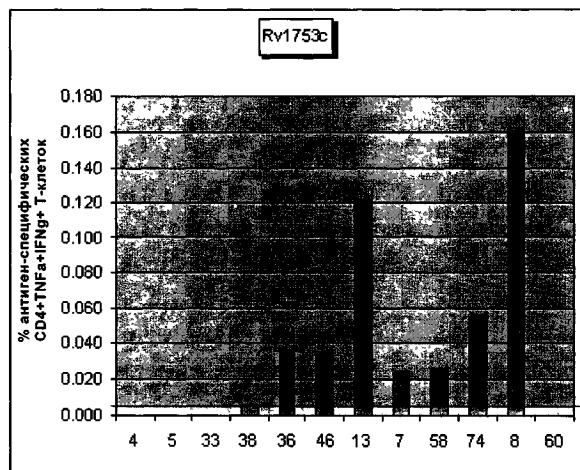
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2