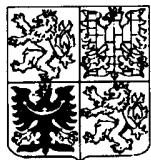


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30. 08. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.09.95,
22.09.95, 22.03.96, 05.06.96, 12.07.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/523436, 95/533634,
96/620874, 96/659683, 96/680574**

(33) Země priority: **US, US, US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 10. 99**
(Věstník č. 10/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/14674**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/09428**

(21) Číslo dokumentu:

628-98

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/31
C 12 N 15/62
C 12 N 5/10
C 12 N 1/21
C 07 K 14/35
A 61 K 38/16
G 01 N 33/569
C 12 G 1/68

// **A 61 K 39/04**

(71) Přihlášovatel:

CORIXA CORPORATION, Seattle, WA, US;

(72) Původce:

Reed Steven G., Bellevue, WA, US;
Skeiky Yasir A. W., Seattle, WA, US;
Dillon Davin C., Redmond, WA, US;
Campos-Neto Antonio, Bainbridge Island,
WA, US;
Houghton Raymond, Bothell, WA, US;
Vedvick Thomas H., Seattle, WA, US;
Twardzik Daniel R., Bainbridge Island, WA,
US;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Sloučeniny a způsoby pro imunoterapii
a diagnostiku tuberkulózy

(57) Anotace:

Detekce, léčby a prevence infekce Mycobacte-
rium tuberculosis. Polypeptidy obsahující
antigen Mycobacterium tuberculosis, nebo
jeho část nebo variantu, a použití takových
polypeptidů pro diagnostiku avakcinaci proti
infekci způsobené Mycobacterium tuberculo-
sis.

CZ 628-98 A3

Sloučeniny a způsoby pro imunoterapii a diagnostiku tuberkulózy

Oblast techniky

Předkládaný vynález se obecně týká detekce, léčby a prevence infekce *Mycobacterium tuberculosis*. Vynález se přesněji týká polypeptidů obsahujících antigen *Mycobacterium tuberculosis*, nebo jeho část nebo variantu, a použití takových polypeptidů pro diagnostiku a vakcinaci proti infekci způsobené *Mycobacterium tuberculosis*.

Dosavadní stav techniky

Tuberkulóza je chronické infekční onemocnění, které je obvykle způsobeno *Mycobacterium tuberculosis*. Je hlavním onemocněním v rozvojových zemích a stejně tak je narůstajícím problémem v rozvinutých oblastech světa, s asi 8 miliony nových případů a 3 miliony úmrtí za rok. Ačkoliv může být infekce asymptomatická po značně dlouhé časové období, nejčastěji se onemocnění manifestuje jako akutní plicní zánět, doprovázený horečkou a neproduktivním kašlem. Pokud není léčena, vede obvykle k závažným komplikacím a smrti.

Ačkoliv může být tuberkulóza obvykle kontrolována za použití intenzivní antibiotické terapie, není taková léčba dostatečná pro prevenci šíření onemocnění. Infikovaní jedinci mohou být po určitou dobu asymptomatictí, ale infekční. Kromě toho, ačkoliv je spolupráce nemocného při léčbě zásadní, je chování pacienta obtížně sledovatelné. Někteří pacienti nedokončí léčbu, což může vést k její nízké účinnosti a k vývoji resistance na léky.

Inhibice šíření tuberkulózy vyžaduje účinnou vakcinaci a přesnou, časnou diagnostiku onemocnění. V současné době je vakcinace živou bakterií nejúčinnějším způsobem pro indukci protektivní imunity. Nejčastěji používanou mykobakterií je pro tento účel *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), avirulentní kmen *Mycobacterium bovis*. Nicméně, bezpečnost a účinnost BCG je zdrojem kontroverze a některé země, jako například USA, nevakcinují populaci. Diagnosa je obvykle provedena za použití kožního testu, který obsahuje intradermální expozici tuberculin PPD (přečištěný proteinový derivát). Antigen specifická odpověď T-buněk vede k měřitelné induraci v místě injekce po 48 - 72 hodinách po injekci, což ukazuje na expozici mykobakteriálním antigenům. Sensitivita a specifita tohoto testu jsou však problematické a jedinci vakcinovaní BCG nemohou být tímto testem odlišení od infikovaných jedinců.

Ačkoliv bylo prokázáno, že makrofágy jsou hlavními efektorovými elementy v imunitě proti *M. tuberculosis*, jsou T-buňky převažujícími induktory takové imunity. Zásadní role T buněk v obraně proti infekci *M. tuberculosis* je doložena častým výskytem *M. tuberculosis* u pacientů s AIDS, díky depleci CD4 T buněk, která je spojena s infekcí virem lidské imunoeficiencie (HIV). *Mycobacterium*-reaktivní CD4 T buňky produkují ve značném množství interferon-gamma (IFN- γ), který, jak bylo prokázáno, spouští antimykobakteriální účinky makrofágů u myší. Ačkoliv je role IFN- γ u lidí méně jasná, ukazují studie, že 1,25-dihydroxy-vitamin D3, buď samostatně, nebo v kombinaci s IFN- γ nebo faktorem nekrosy nádorů alfa, aktivuje lidské makrofágy pro inhibici infekce *M. tuberculosis*. Kromě toho, je známo, že IFN- γ stimuluje lidské makrofágy k výrobě 1,25-dihydroxy vitaminu D3. Obdobně, bylo prokázáno, že IL-12 má

významnou úlohu při stimulaci resistance k infekci M. tuberculosis. Pro přehled imunologie infekce M. tuberculosis viz Chan a Kaufmann v "Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control", Bloom (vyd.), ASM Press, Washington, D.C., 1994.

V souladu s tím existuje v oboru potřeba vylepšené vakcíny a způsobů pro prevenci, léčbu a detekci tuberkulózy. Předkládaný vynález splňuje tyto potřeby a dále poskytuje s těmito potřebami související výhody.

Podstata vynálezu

Stručně, tento vynález poskytuje sloučeniny a způsoby pro prevenci a diagnostiku tuberkulózy. V jednom aspektu jsou poskytnuty polypeptidy obsahující imunogenní část solubilního antigenu M. tuberculosis, nebo varianty takového antigenu, která se liší pouze konzervativní substitucí a/nebo modifikací. V jednom provedení tohoto aspektu má solubilní antigen následující N-koncové sekvence:

- (a) Asp-Pro-Val-Asp-Ala-Val-Ile-Asn-Thr-Thr-Cys-Asn-Tyr-Gly-Gln-Val-Val-Ala-Ala-Leu; (SEQ ID No. 120)
- (b) Ala-Val-Glu-Ser-Gly-Met-Leu-Ala-Leu-Gly-Thr-Pro-Ala-Pro-Ser; (SEQ ID No. 121)
- (c) Ala-Ala-Met-Lys-Pro-Arg-Thr-Gly-Asp-Gly-Pro-Leu-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Gly-Arg; (SEQ ID No. 122)
- (d) Tyr-Tyr-Trp-Cys-Pro-Gly-Gln-Pro-Phe-Asp-Pro-Ala-Trp-Gly-Pro; (SEQ ID No. 123)
- (e) Asp-Ile-Gly-Ser-Glu-Ser-Thr-Glu-Asp-Gln-Gln-Xaa-Ala-Val; (SEQ ID No. 124)
- (f) Ala-Glu-Glu-Ser-Ile-Ser-Thr-Xaa-Glu-Xaa-Ile-Val-Pro; (SEQ ID No. 125)

15.07.99

- (g) Asp-Pro-Glu-Pro-Ala-Pro-Pro-Val-Pro-Thr-Thr-Ala-Ala-Ser-Pro-Pro-Ser; (SEQ ID No. 126)
- (h) Ala-Pro-Lys-Thr-Tyr-Xaa-Glu-Glu-Leu-Lys-Gly-Thr-Asp-Thr-Gly; (SEQ ID No. 127)
- (i) Asp-Pro-Ala-Ser-Ala-Pro-Asp-Val-Pro-Thr-Ala-Ala-Gln-Leu-Thr-Ser-Leu-Leu-Asn-Ser-Leu-Ala-Asp-Pro-Asn-Val-Ser-Phe-Ala-Asn; (SEQ ID No. 128)
- (j) Xaa-Asp-Ser-Glu-Lys-Ser-Ala-Thr-Ile-Lys-Val-Thr-Asp-Ala-Ser; (SEQ ID No. 134)
- (k) Ala-Gly-Asp-Thr-Xaa-Ile-Tyr-Ile-Val-Gly-Asn-Leu-Thr-Ala-Asp; (SEQ ID No. 135) or
- (l) Ala-Pro-Glu-Ser-Gly-Ala-Gly-Leu-Gly-Gly-Thr-Val-Gln-Ala-Gly; (SEQ ID No. 136)

kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina.

V souvisejícím aspektu jsou poskytnuty polypeptidy obsahující imunogenní část solubilního antigenu M. tuberculosis, nebo varianty takového antigenu, která se liší pouze konzervativní substitucí a/nebo modifikací, kde antigen má jednu z následujících N-koncových sekvencí:

- (m) Xaa-Tyr-Ile-Ala-Tyr-Xaa-Thr-Thr-Ala-Gly-Ile-Val-Pro-Gly-Lys-Ile-Asn-Val-His-Leu-Val; (SEQ ID No. 137) or
- (n) Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-His-Gln-Xaa-Asp-Met-Thr-Lys-Gly-Tyr-Tyr-Pro-Gly-Gly-Arg-Arg-Xaa-Phe; (SEQ ID No. 129)

kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina.

V jiném provedení obsahuje antigen aminokyselinovou sekvenci kodovanou DNA sekvencí vybranou ze skupiny skládající se ze SEQ ID NO: 1, 2, 4-10, 13-25, 52, 99 a 101, komplementů uvedených sekvencí a DNA sekvencí, které hybridizují na sekvenční SEQ ID NO: 1, 2, 4-10, 13-25, 52, 99 a 101 nebo komplementy uvedených sekvencí za podmínek střední přísnosti.

V souvisejícím aspektu polypeptidy obsahují imunogenní část antigenu *M. tuberculosis*, nebo varianty takového antigenu, která se liší pouze konzervativní substitucí a/nebo modifikací, kde antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci kodovanou DNA sekvencí vybranou ze skupiny skládající se ze SEQ ID NO: 26-51, komplementů uvedených sekvencí a DNA sekvencí, které hybridizují na sekvenční SEQ ID NO: 26-51 nebo komplementy uvedených sekvencí za podmínek střední přísnosti.

V souvisejícím aspektu jsou poskytnuty DNA sekvenční kódující výše uvedené polypeptidy, expresní vektory obsahující tyto DNA sekvenční a hostitelské buňky transformované nebo transfektované takovými expresními vektory.

V jiném aspektu předkládaný vynález poskytuje fúzní proteiny obsahující první a druhý polypeptid podle předkládaného vynálezu, nebo alternativně, polypeptid podle předkládaného vynálezu a známý antigen *M. tuberculosis*.

V dalších aspektech předkládaný vynález poskytuje farmaceutické přípravky, které obsahují jeden nebo více z výše uvedených polypeptidů nebo DNA molekul kódující takové polypeptidy, a fyziologicky přijatelný nosič. Vynález také poskytuje vakcínu obsahující jeden nebo více polypeptidů jak jsou

popsány výše a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi, spolu s vakcinami obsahujícími jednu nebo více DNA sekvencí kodujících takové polypeptidy a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi.

V ještě jiném aspektu jsou poskytnuty způsoby pro indukci protektivní imunity u pacienta, ve kterých je pacientovi podáno účinné množství jednoho nebo více z výše uvedených polypeptidů.

V ještě jiném aspektu předkládaného vynálezu jsou poskytnuty způsoby a diagnostické kity pro detekci tuberkulózy u pacienta. Způsoby obsahují kontaktování kožních buněk pacienta s jedním nebo více z uvedených polypeptidů a detekci imunitní odpovědi kůže pacienta. Diagnostické kity obsahují jeden nebo více z výše uvedených 7 polypeptidů v kombinaci s přístrojem dostatečným pro kontaktování polypeptidu s buňkami kůže pacienta.

Tyto a další aspekty předkládaného vynálezu budou jasné z následujícího podrobného popisu a připojených obrázků. Všechny zde citované odkazy jsou zde uvedeny jako odkaz ve své úplnosti.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázky 1A a 1B ilustrují stimulaci proliferace a produkce IFN- γ v T-buňkách odvozených od prvního a druhého M. tuberculosis-immuního dárce, v příslušném pořadí, za použití 14 kDa, 20 kDa a 26 kDa antigenů, kde tato stimulace je popsána v příkladu 1.

Obrázek 2 ilustruje stimulaci proliferace a produkce IFN- γ v T-buňkách odvozených od M. tuberculosis-immuního jedince za použití dvou reprezentativních polypeptidů TbRa3 a TbRa9.

SEQ ID NO: 1 je DNA sekvenca TbRa1.
SEQ ID NO: 2 je DNA sekvenca TbRa10.
SEQ ID NO: 3 je DNA sekvenca TbRa11.
SEQ ID NO: 4 je DNA sekvenca TbRa12.
SEQ ID NO: 5 je DNA sekvenca TbRa13.
SEQ ID NO: 6 je DNA sekvenca TbRa16.
SEQ ID NO: 7 je DNA sekvenca TbRa17.
SEQ ID NO: 8 je DNA sekvenca TbRa18.
SEQ ID NO: 9 je DNA sekvenca TbRa19.
SEQ ID NO: 10 je DNA sekvenca TbRa24.
SEQ ID NO: 11 je DNA sekvenca TbRa26.
SEQ ID NO: 12 je DNA sekvenca TbRa28.
SEQ ID NO: 13 je DNA sekvenca TbRa29.
SEQ ID NO: 14 je DNA sekvenca TbRa2A.
SEQ ID NO: 15 je DNA sekvenca TbRa3.
SEQ ID NO: 16 je DNA sekvenca TbRa32.
SEQ ID NO: 17 je DNA sekvenca TbRa35.
SEQ ID NO: 18 je DNA sekvenca TbRa36.
SEQ ID NO: 19 je DNA sekvenca TbRa4.
SEQ ID NO: 20 je DNA sekvenca TbRa9.
SEQ ID NO: 21 je DNA sekvenca TbRaB.
SEQ ID NO: 22 je DNA sekvenca TbRaC.
SEQ ID NO: 23 je DNA sekvenca TbRaD.
SEQ ID NO: 24 je DNA sekvenca YYWCPG.
SEQ ID NO: 25 je DNA sekvenca AAMK.
SEQ ID NO: 26 je DNA sekvenca TbL-23.
SEQ ID NO: 27 je DNA sekvenca TbL-24.
SEQ ID NO: 28 je DNA sekvenca TbL-25.
SEQ ID NO: 29 je DNA sekvenca TbL-28.
SEQ ID NO: 30 je DNA sekvenca TbL-29.
SEQ ID NO: 31 je DNA sekvenca TbH-5.

SEQ ID NO: 32 je DNA sekvence TbH-8.
SEQ ID NO: 33 je DNA sekvence TbH-9.
SEQ ID NO: 34 je DNA sekvence TbM-1.
SEQ ID NO: 35 je DNA sekvence TbM-3.
SEQ ID NO: 36 je DNA sekvence TbM-6.
SEQ ID NO: 37 je DNA sekvence TbM-7.
SEQ ID NO: 38 je DNA sekvence TbM-9.
SEQ ID NO: 39 je DNA sekvence TbM-12.
SEQ ID NO: 40 je DNA sekvence TbM-13.
SEQ ID NO: 41 je DNA sekvence TbM-14.
SEQ ID NO: 42 je DNA sekvence TbM-15.
SEQ ID NO: 43 je DNA sekvence TbH-4.
SEQ ID NO: 44 je DNA sekvence TbH-4-fwd.
SEQ ID NO: 45 je DNA sekvence TbH-12.
SEQ ID NO: 46 je DNA sekvence Tb38-1.
SEQ ID NO: 47 je DNA sekvence Tb38-4.
SEQ ID NO: 48 je DNA sekvence TbL-17.
SEQ ID NO: 49 je DNA sekvence TbL-20.
SEQ ID NO: 50 je DNA sekvence TbL-21.
SEQ ID NO: 51 je DNA sekvence TbH-16.
SEQ ID NO: 52 je DNA sekvence DPEP.
SEQ ID NO: 53 je odvozená aminokyselinová sekvence DPEP.
SEQ ID NO: 54 je proteinová sekvence DPV N-koncového antigenu.
SEQ ID NO: 55 je proteinová sekvence AVGS N-koncového antigenu.
SEQ ID NO: 56 je proteinová sekvence AAMK N-koncového antigenu.
SEQ ID NO: 57 je proteinová sekvence YYWC N-koncového antigenu.
SEQ ID NO: 58 je proteinová sekvence DIGS N-koncového antigenu.

SEQ ID NO: 59 je proteinová sekvence AEES N-koncového antigenu.

SEQ ID NO: 60 je proteinová sekvence DPEP N-koncového antigenu.

SEQ ID NO: 61 je proteinová sekvence APKT N-koncového antigenu.

SEQ ID NO: 62 je proteinová sekvence DPAS N-koncového antigenu.

SEQ ID NO: 63 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa1.

SEQ ID NO: 64 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa10.

SEQ ID NO: 65 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa11.

SEQ ID NO: 66 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa12.

SEQ ID NO: 67 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa13.

SEQ ID NO: 68 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa16.

SEQ ID NO: 69 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa17.

SEQ ID NO: 70 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa18.

SEQ ID NO: 71 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa19.

SEQ ID NO: 72 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa24.

SEQ ID NO: 73 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa26.

SEQ ID NO: 74 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa28.

SEQ ID NO: 75 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa29.

SEQ ID NO: 76 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa2A.

SEQ ID NO: 77 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa3.

SEQ ID NO: 78 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa32.

SEQ ID NO: 79 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa35.

SEQ ID NO: 80 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa36.

SEQ ID NO: 81 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa4.

SEQ ID NO: 82 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRa9.

SEQ ID NO: 83 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRaB.

SEQ ID NO: 84 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRaC.

SEQ ID NO: 85 je odvozená aminokyselinová sekvence TbRaD.

SEQ ID NO: 86 je odvozená aminokyselinová sekvence YYWCPG.
SEQ ID NO: 87 je odvozená aminokyselinová sekvence TbAAMK.
SEQ ID NO: 88 je odvozená aminokyselinová sekvence Tb38-1.
SEQ ID NO: 89 je odvozená aminokyselinová sekvence TbH-4.
SEQ ID NO: 90 je odvozená aminokyselinová sekvence TbH-8.
SEQ ID NO: 91 je odvozená aminokyselinová sekvence TbH-9.
SEQ ID NO: 92 je odvozená aminokyselinová sekvence TbH-12.
SEQ ID NO: 93 je aminokyselinová sekvence Tb38-1 peptid 1.
SEQ ID NO: 94 je aminokyselinová sekvence Tb38-1 peptid 2.
SEQ ID NO: 95 je aminokyselinová sekvence Tb38-1 peptid 3.
SEQ ID NO: 96 je aminokyselinová sekvence Tb38-1 peptid 4.
SEQ ID NO: 97 je aminokyselinová sekvence Tb38-1 peptid 5.
SEQ ID NO: 98 je aminokyselinová sekvence Tb38-1 peptid 6.
SEQ ID NO: 99 je DNA sekvence DPAS.
SEQ ID NO: 100 je odvozená aminokyselinová sekvence DPAS.
SEQ ID NO: 101 je DNA sekvence DPV.
SEQ ID NO: 102 je odvozená aminokyselinová sekvence DPV.
SEQ ID NO: 103 je DNA sekvence ESAT-6.
SEQ ID NO: 104 je odvozená aminokyselinová sekvence ESAT-6.
SEQ ID NO: 105 je DNA sekvence TbH-8-2.
SEQ ID NO: 106 je DNA sekvence TbH-9FL.
SEQ ID NO: 107 je odvozená aminokyselinová sekvence TbH-9FL.
SEQ ID NO: 108 je DNA sekvence TbH-9-1.
SEQ ID NO: 109 je odvozená aminokyselinová sekvence TbH-9-1.
SEQ ID NO: 110 je DNA sekvence TbH-9-4.
SEQ ID NO: 111 je odvozená aminokyselinová sekvence TbH-9-4.
SEQ ID NO: 112 je DNA sekvence Tb38-1F2 IN.
SEQ ID NO: 113 je DNA sekvence Tb38-2F2 RP.
SEQ ID NO: 114 je odvozená aminokyselinová sekvence Tb37-FL.
SEQ ID NO: 115 je odvozená aminokyselinová sekvence Tb38-IN.
SEQ ID NO: 116 je DNA sekvence Tb38-1F3.

- SEQ ID NO: 117 je odvozená aminokyselinová sekvence Tb38-1F3.
- SEQ ID NO: 118 je DNA sekvence Tb38-1F5.
- SEQ ID NO: 119 je DNA sekvence Tb38-1F6.
- SEQ ID NO: 120 je dedukovaná N-koncová aminokyselinová sekvence DPV.
- SEQ ID NO: 121 je dedukovaná N-koncová aminokyselinová sekvence AVGS.
- SEQ ID NO: 122 je dedukovaná N-koncová aminokyselinová sekvence AAMK.
- SEQ ID NO: 123 je dedukovaná N-koncová aminokyselinová sekvence YYWC.
- SEQ ID NO: 124 je dedukovaná N-koncová aminokyselinová sekvence DIGS.
- SEQ ID NO: 125 je dedukovaná N-koncová aminokyselinová sekvence AEES.
- SEQ ID NO: 126 je dedukovaná N-koncová aminokyselinová sekvence DPEP.
- SEQ ID NO: 127 je dedukovaná N-koncová aminokyselinová sekvence APKT.
- SEQ ID NO: 128 je dedukovaná aminokyselinová sekvence DPAS.
- SEQ ID NO: 129 je proteinová sekvence DPPN N-koncového antigenu.
- SEQ ID NO: 130 - 133 jsou proteinové sekvence čtyř DPPD bromkyanových fragmentů.
- SEQ ID NO: 134 je N-koncová proteinová sekvence XDS antigenu.
- SEQ ID NO: 135 je N-koncová proteinová sekvence AGD antigenu.
- SEQ ID NO: 136 je N-koncová proteinová sekvence APE antigenu.
- SEQ ID NO: 137 je N-koncová proteinová sekvence XYI antigenu.

Jak bylo uvedeno výše, předkládaný vynález je obecně zaměřen na přípravky a způsoby pro prevenci, léčbu a diagnostiku tuberkulózy. Přípravky podle předkládaného vynálezu zahrnují polypeptidy, které obsahují alespoň jednu imunogenní část antigenu *M. tuberculosis*, nebo varianty takového antigenu, která se liší pouze v konzervativních substitucích nebo modifikacích. Polypeptidy patřící do rozsahu předkládaného vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny na, imunogenní antigeny *M. tuberculosis*. "Solubilní protein *M. tuberculosis*" je protein pocházející z *M. tuberculosis*, který je přítomen ve filtrátu kultury *M. tuberculosis*. Jak je zde použito, termín "polypeptid" zahrnuje aminokyselinové řetězce jakékoliv délky, včetně kompletních proteinů (t.j. antigenů), ve kterých jsou aminokyselinové zbytky navázány peptidovými vazbami. Proto, polypeptid obsahující imunogenní část jednoho z výše uvedených antigenů se může skládat pouze z imunogenní části, nebo může obsahovat další sekvence. Další sekvence mohou být odvozeny od přirozených antigenů *M. tuberculosis*, nebo mohou být heterologní, a takové sekvence mohou (ale nemusí) být imunogenní.

"Imunogenní", jak je zde použito, označuje schopnost vyvolat imunitní odpověď (například buněčnou) u pacienta, jako je člověk, a/nebo v biologickém vzorku. Konkrétně, antigeny, které jsou imunogenní (a imunogenní části nebo jiné varianty takových antigenů) jsou schopné stimulovat proliferaci buněk, produkci interleukinu-12 a/nebo produkci interferonu- γ v biologickém vzorku obsahujícím jednu nebo více buněk vybraných ze skupiny skládající se z T-buněk, NK buněk, B-buněk a makrofágů, kde buňky jsou získány od jedince imunního proti *M. tuberculosis*. Polypeptidy obsahující alespoň imunogenní část jednoho nebo více antigenů *M. tuberculosis* mohou být, obecně, použity pro detekci

tuberkulosy nebo pro indukci protektivní imunity proti tuberkulóze u pacienta.

Přípravky a způsoby podle předkládaného vynálezu také zahrnují varianty výše uvedených polypeptidů. "Varianta", jak je zde použito, je polypeptid, který se liší od přirozeného antigenu pouze v konzervativních substitucích a/nebo modifikacích, takže je zachována schopnost polypeptidu indukovat imunitní odpověď. Takové varianty mohou být obecně identifikovány modifikací jedné z výše uvedených polypeptidových sekvencí a hodnocením imunogenních vlastností modifikovaného polypeptidu, za použití, například, reprezentativních postupů zde popsanych.

"Konzervativní substituce" je taková substituce, při které je jedna aminokyselina substituována za jinou aminokyselinu, která má podobné vlastnosti, takže odborník v oboru peptidové chemie může očekávat, že se sekundární struktura a hydropatický charakter polypeptidu významně nezmění. Obecně, následující skupiny aminokyselin představují konzervativní změny: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; a (5) phe, tyr, trp, his.

Varianty mohou být také (nebo alternativně) modifikovány, například, delecí nebo adicí aminokyselin, které mají minimální vliv na imunogenní vlastnosti, sekundární strukturu a hydropatický charakter polypeptidu. Například, polypeptid může být konjugován se signální (nebo leaderovou) sekvencí v oblasti N-konce proteinu, kde tato sekvence bude ko-translačně nebo post-translačně řídit přenos proteinu. Polypeptid může být také konjugován na spojovací sekvenci nebo na jinou sekvenci pro

usnadnění syntesy, přečištění nebo identifikace polypeptidu (například poly-His), nebo pro zvýšení vazby polypeptidu na pevný nosič. Například, polypeptid může být konjugován na Fc region imunoglobulinu.

V příbuzném aspektu jsou popsány kombinační polypeptidy. "Kombinační polypeptid" je polypeptid obsahující alespoň jednu z výše uvedených imunogenních částí a jednu nebo více dalších imunogenních sekvencí *M. tuberculosis*, které jsou na sebe navázány peptidovou vazbou za vzniku jednoho aminokyselinového řetězce. Sekvence mohou být navázány přímo (t.j. bez vmezeřených aminokyselin), nebo mohou být navázány prostřednictvím spojovací sekvence (například Gly-Cys-Gly), která nesnižuje významně imunogenní charakter složek polypeptidu.

Obecně, antigeny *M. tuberculosis* a DNA sekvence kodující takové antigeny, mohou být připraveny za použití jakéhokoliv z mnoha postupů. Například, solubilní antigeny mohou být izolovány z filtrátu kultury *M. tuberculosis* za použití postupů, které jsou odborníkům v oboru známe, včetně aniontové výměnné chromatografie a chromatografie na reversní fázi. Přečištěné antigeny jsou potom hodnoceny na svou schopnost vyvolávat vhodnou imunitní odpověď (například buněčnou) za použití, například, reprezentativních metod zde popsaných. Imunogenní antigeny mohou být částečně sekvencovány za použití technik jako je klasická Edmanova chemie (Viz Edman a Berg, *Eur. J. Biochem.*, 80: 116 - 132, 1967).

Imunogenní antigeny mohou také být produkovány rekombinantně za použití DNA sekvence, která koduje antigen, která je insertována do expresního vektoru a která je exprimována ve vhodného hostiteli. DNA molekuly kodující solubilní antigeny

mohou být izolovány vyšetřováním vhodných *M. tuberculosis* expresních knihoven s antiserem (například králičím) namířeným specificky proti solubilním antigenům *M. tuberculosis*. DNA sekvence kodující antigeny, které mohou nebo nemusí být solubilní, mohou být identifikovány vyšetřováním vhodných *M. tuberculosis* genomových nebo cDNA expresních knihoven sérem získaným od pacientů infikovaných *M. tuberculosis*. Takové vyšetření může být provedeno za použití technik dobře známých v oboru, jako jsou techniky popsané v Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

DNA sekvence kodující solubilní antigeny mohou být také získány vyšetřováním vhodných *M. tuberculosis* cDNA nebo genomových DNA knihoven na DNA sekvence, které hybridizují s degenerovanými oligonukleotidy odvozenými z částečných aminokyselinových sekvencí izolovaných solubilních antigenů. Degenerované oligonukleotidové sekvence pro použití v takovém vyšetřování mohou být navrženy a syntetizovány, a vyšetřování může být provedeno, například, jak je popsáno v Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (a odkazem tam uvedených). Také může být použita polymerasová řetězová reakce (PCR), za použití výše uvedených oligonukleotidů v metodě dobře v oboru známé, pro izolaci nukleokyselinové sondy z cDNA nebo genomové knihovny. Vyšetření knihovny může být potom provedeno za použití izolované sondy.

Alternativně, genomové nebo cDNA knihovny odvozené od *M. tuberculosis* mohou být vyšetřovány přímo za použití mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) nebo T buněčných

linií nebo klonů odvozených od jedinců imunních vůči *M. tuberculosis*. Obecně, PBMC a/nebo T buňky pro použití v takových vyšetřeních mohou být připraveny způsobem, který je popsán dále. Přímé vyšetřování knihovny může být obecně provedeno testováním souborů exprivovaných rekombinantních proteinů na jejich schopnost indukovat proliferaci a/nebo produkci interferonu- γ v T-buňkách odvozených od jedince imunního vůči *M. tuberculosis*. Alternativně, mohou být nejprve vybrány potenciální antigeny pro T-buňky na základě protilátkové reaktivity, jak je popsáno výše.

Bez ohledu na způsob přípravy mají antigeny (nebo jejich imunogenní část) podle předkládaného vynálezu (které mohou, ale nemusí být solubilní) schopnost indukovat imunitní odpověď. Přesněji, antigeny mají schopnost indukovat proliferaci a/nebo produkci cytokinů (t.j. interferonu- γ a/nebo interleukinu-12) v T-buňkách, NK buňkách, B-buňkách a/nebo makrofágách odvozených od jedinců imunních vůči *M. tuberculosis*. Výběr typu buněk pro hodnocení imunitní odpovědi na antigen bude, samozřejmě, záviset na požadované odpovědi. Například, produkce interleukinu-12 je nejlépe hodnocena za použití přípravků obsahujících B-buňky a/nebo makrofágy. Jedinec imunní vůči *M. tuberculosis* je takový jedinec, který je považován za resistantního na tuberkulosu díky tomu, že má účinnou odpověď T-buněk na *M. tuberculosis* (t.j. je v podstatě bez příznaků onemocnění). Takoví jedinci mohou být identifikováni na základě silně pozitivního (t.j. indurace o průměru větším než 10 mm) intradermálního kožního testu v odpovědi na tuberkulosní proteiny (PPD) a podle absence jakýchkoliv známek nebo příznaků tuberkulósy. T-buňky, NK buňky, B-buňky a makrofágy mohou být získány od jedinců imunních vůči *M. tuberculosis* za použití metod dobře známých v oboru. Například, může být použita příprava PBMC (t.j. mononukleárních buněk

periferní krve) bez další separace jednotlivých složek. PBMC mohou být připraveny, například, za použití densitní centrifugace v Ficoll™ (Winthrop Laboratories, NY). T-buňky použité v testech zde popsaných mohou být také přečištěny přímo z PBMC. Alternativně, mohou být použity obohacené linie buněk reaktivních s mykobakteriálními proteiny, nebo klony T-buněk reaktivní s jednotlivými mykobakteriálními proteiny. Takové klony T buněk mohou být získány, například, kultivací PBMC od jedince imunního vůči *M. tuberculosis* s mykobakteriálními proteiny po dobu 2-4 týdnů. Tento postup umožní expansi pouze T.buněk specifických pro mykobakteriální proteiny, za vzniku linie složené pouze z takových buněk. Tyto buňky mohou být potom klonovány a testovány s jednotlivými proteiny, za použití metod odborníkům známých, pro přesnější definici individuální specifity T-buněk. Obecně, antigeny, které jsou pozitivní v testech na proliferaci a/nebo produkci cytokinů (t.j. produkci interferonu- γ a/nebo interleukinu-12) provedených za použití T-buněk, NK-buněk, B-buněk a/nebo makrofágů získaných od jedince imunního vůči *M. tuberculosis* jsou považovány za imunogenní. Takové testy mohou být provedeny, například, za použití reprezentativních postupů popsaných dále. Imunogenní části takových antigenů mohou být identifikovány za použití stejných testů a mohou být presentovány spolu s polypeptidy podle předkládaného vynálezu.

Schopnost polypeptidu (například imunogenního antigenu, nebo jeho části nebo varianty) indukovat proliferaci buněk je hodnocena kontaktováním buněk (například T-buněk a/nebo NK-buněk) s polypeptidem a měřením proliferace buněk. Obecně, množství polypeptidu, které je dostatečné pro hodnocení asi 10^5 buněk, je v rozmezí od 10 ng/ml do asi 100 μ g/ml a výhodně je 10 μ g/ml. Inkubace polypeptidu s buňkami je typicky provedena při 37 °C po

dobu šesti dnů. Po inkubaci s polypeptidem jsou buňky testovány na proliferační odpověď, která může být hodnocena za použití metod dobře v oboru známých, jako je expozice buněk pulsu radioaktivně značeného thymidinu a měření inkorporace značeného thymidinu do buněčné DNA. Obecně, polypeptid, který způsobí alespoň trojnásobné zvýšení proliferace proti základní hodnotě (t.j. proliferace pozorované pro buňky kultivované bez polypeptidu) je považován za schopný vyvolání proliferace.

Schopnost polypeptidu stimulovat produkci interferonu- γ a/nebo interleukinu-12 může být hodnocena kontaktováním buněk s polypeptidem a měřením hladiny interferonu- γ nebo interleukinu-12 produkovaného buňkami. Obecně, množství polypeptidu, které je dostatečné pro hodnocení asi 10^5 buněk, je v rozmezí od 10 ng/ml do asi 100 μ g/ml a výhodně je 10 μ g/ml. Polypeptid může, ale nemusí, být imobilizován na pevném nosiči, jako jsou korálky nebo biodegradovatelné mikrosféry, například jak jsou popsány v US patentech č. 4897268 a 5075109. Inkubace polypeptidu je typicky provedena při 37 °C po dobu šesti dnů. Po inkubaci s polypeptidem jsou buňky testovány na produkci interferonu- γ a/nebo interleukinu-12 (nebo jedné nebo více jeho podjednotek), což může být provedeno za použití metod dobře v oboru známých, jako je enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA) nebo, v případě P70 podjednotky IL-12, biotest, například měřící proliferaci T-buněk. Obecně, polypeptid, který způsobí produkci alespoň 50 pg interferonu- γ na ml supernatantu kultury (obsahující 10^4 - 10^5 buněk na ml) je považován za schopný stimulace produkce interferonu- γ . Polypeptid, který stimuluje produkci alespoň 10 pg/ml P70 podjednotky IL-12 a/nebo alespoň 100 pg/ml P40 podjednotky IL-12, na 10^5 makrofágů nebo B-buněk (nebo na 3×10^5 PBMC) je považován za schopný stimulace produkce IL-12.

Obecně, imunogenní antigeny jsou takové antigeny, které stimulují proliferaci a/nebo produkci cytokinů (t.j. interferonu- γ a/nebo interleukinu-12) v T-buňkách, NK-buňkách, B-buňkách a/nebo makrofágách získaných od alespoň 25% jedinců imunních vůči *M. tuberculosis*. Mezi těmito imunogenními antigeny mohou být odlišeny polypeptidy mající výhodnější terapeutické vlastnosti na základě rozsahu odpovědi ve výše uvedených testech a na základě procenta jedinců, u kterých je odpověď pozorována. Kromě toho, antigeny, které mají nejvýhodnější terapeutické vlastnosti, nebudou stimulovat proliferaci a/nebo produkci cytokinů in vitro u buněk získaných od více než 25% jedinců, kteří nejsou imunní vůči *M. tuberculosis*, což eliminuje odpovědi, které nejsou specifické díky buňkách reaktivním vůči *M. tuberculosis*. Ty antigeny, které indukují odpověď ve vysokém procentu T-buněk, NK-buněk, B-buněk a/nebo makrofágů od jedinců imunních vůči *M. tuberculosis* (s nízkou odpovědí u přípravků buněk od jiných jedinců) mají nejvýhodnější terapeutické vlastnosti.

Antigeny s nejvýhodnějšími terapeutickými vlastnostmi mohou být také identifikovány na základě jejich schopnosti zmírňovat závažnost infekce *M. tuberculosis* u pokusných zvířat, pokud jsou podány jako vakcína. Vhodné přípravky pro vakcinaci pro použití u pokusných zvířat jsou podrobně popsány dále. Účinnost může být určena na základě schopnosti antigenu způsobit alespoň 50% redukci počtu bakterií a/nebo alespoň 40% snížení mortality po pokusné infekci. Vhodná pokusná zvířata zahrnují myši, morčata a primáty.

Antigeny mající nejvýhodnější terapeutické vlastnosti mohou být obecně identifikovány na základě schopnosti vyvolat odpověď v

intradermálním testu provedeném u jedince s aktivní tuberkulosou, ale nikoliv v testu provedeném na jedinci, který není infikován *M. tuberculosis*. Obecně mohou být kožní testy provedeny způsobem popsaným dále, kdy za pozitivní odpověď je považována alespoň 5 mm indurace.

Imunogenní části antigenů podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny a identifikovány za použití dobře známých technik, jako jsou techniky shrnuté v Paul, *Fundamental Immunology*, 3.vydání, Raven Press, 1993, str. 243 - 247, a v odkazech tam citovaných. Takové techniky zahrnují vyšetřování polypeptidových částí přirozeného antigenu na jejich imunogenní vlastnosti. Reprezentativní testy proliferace a produkce cytokinů mohou být použity v těchto vyšetřováních. Imunogenní část polypeptidu je část, která v takových reprezentativních testech vyvolává imunologickou odpověď (například proliferaci, produkci interferonu- γ a/nebo interleukinu-12), která je významně podobná odpovědi, která je vyvolána kompletním antigenem. Jinými slovy, imunogenní část antigenu může vyvolávat alespoň 20%, a lépe 100%, proliferaci indukovanou kompletním antigenem v testu proliferace zde popsaném. Imunogenní část antigenu může také, nebo alternativně, vyvolávat alespoň 20%, a lépe 100%, produkce interferonu- γ a/nebo interleukinu-12 indukovanou kompletním antigenem v testu proliferace zde popsaném.

Části a jiné varianty antigenů *M. tuberculosis* mohou být generovány prostřednictvím syntesy nebo rekombinantními prostředky. Syntetické polypeptidy mající méně než přibližně 100 aminokyselin, a obvykle méně než 50 aminokyselin, mohou být generovány za použití technik v oboru dobře známých. Například, takové polypeptidy mohou být syntetizovány za použití jakékoliv z

komerčně dostupných technik syntesy na pevné fázi, jako je Merrifieldova metoda syntesy na pevné fázi, ve které jsou aminokyseliny sekvenčně přidávány k rostoucímu aminokyselinovému řetězci (viz Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2146, 1963). Vybavení pro automatizovanou syntesu polypeptidů je komerčně dostupné od dodavatelů, jako například od Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, a může být použito podle návodu výrobce. Varianty přirozeného antigenu mohou být obecně připraveny za použití standartních technik mutagenese, jako je oligonukleotidy řízená místně specifická mutagenese. Sekce DNA sekvence mohou být také odstraněny za použití standartních technik pro přípravu zkrácených polypeptidů.

Rekombinantní polypeptidy obsahující části a/nebo varianty přirozeného antigenu mohou být snadno připraveny z DNA sekvence kodující polypeptid za použití mnoha technik dobře v oboru známých. Například, supernatant z vhodných systémů vektor/hostitel, které secernují rekombinantní protein do kultivačního media, může být nejprve koncentrován za použití komerčně dostupného filtru. Po koncentraci může být koncentrát aplikován na vhodnou matici pro přečištění jako je afinitní matrice nebo iontová výměnná pryskyřice. Nakonec, pro další přečištění rekombinantního proteinu může být použit jeden nebo více kroků HPLC s reversní fází.

Jakýkoliv z mnoha expresních vektorů známých v oboru může být použit pro expresi rekombinantních polypeptidů podle předkládaného vynálezu. Exprese může být provedena v jakékoliv vhodné hostitelské buňce, která byla transformována nebo transfektována expresním vektorem obsahujícím DNA molekulu, která koduje rekombinantní polypeptid. Vhodné hostitelské buňky zahrnují

prokaryoty, kvasinky a vyšší eukaryotické buňky. Výhodně jsou jako hostitelské buňky použity *E. coli*, kvasinky nebo savčí buněčné linie jako je COS nebo CHO. DNA sekvence exprivovaná tímto způsobem může kodovat přirozeně se vyskytující antigeny, části přirozeně se vyskytujících antigenů nebo jejich jiné varianty.

Obecně, bez ohledu na způsob přípravy, jsou polypeptidy podle předkládaného vynálezu připraveny ve významně přečištěné formě. Výhodně jsou polypeptidy alespoň 80% čistoty, lépe alespoň 90% čistoty a nejlépe alespoň 99% čistoty. V jistých výhodných provedeních, podrobněji popsanych dále, jsou významně přečištěné polypeptidy inkorporovány do farmaceutických přípravků nebo vakcin pro použití v jedné nebo více způsobech podle předkládaného vynálezu.

V určitých specifických provedeních popisuje vynález polypeptidy obsahující alespoň imunogenní část solubilního antigenu *M. tuberculosis*, který má následující N-koncové sekvence, nebo jeho varianty, které se liší pouze konzervativní substitucí a/nebo modifikací:

- (a) Asp-Pro-Val-Asp-Ala-Val-Ile-Asn-Thr-Thr-Cys-Asn-Tyr-Gly-Gln-Val-Val-Ala-Ala-Leu; (SEQ ID No. 120)
- (b) Ala-Val-Glu-Ser-Gly-Met-Leu-Ala-Leu-Gly-Thr-Pro-Ala-Pro-Ser; (SEQ ID No. 121)
- (c) Ala-Ala-Met-Lys-Pro-Arg-Thr-Gly-Asp-Gly-Pro-Leu-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Gly-Arg; (SEQ ID No. 122)
- (d) Tyr-Tyr-Trp-Cys-Pro-Gly-Gln-Pro-Phe-Asp-Pro-Ala-Trp-Gly-Pro; (SEQ ID No. 123)

- (e) Asp-Ile-Gly-Ser-Glu-Ser-Thr-Glu-Asp-Gln-Gln-Xaa-Ala-Val;
(SEQ ID No. 124)
- (f) Ala-Glu-Glu-Ser-Ile-Ser-Thr-Xaa-Glu-Xaa-Ile-Val-Pro; (SEQ ID
No. 125)
- (g) Asp-Pro-Glu-Pro-Ala-Pro-Pro-Val-Pro-Thr-Ala-Ala-Ala-Ser-
Pro-Pro-Ser; (SEQ ID No. 126)
- (h) Ala-Pro-Lys-Thr-Tyr-Xaa-Glu-Glu-Leu-Lys-Gly-Thr-Asp-Thr-
Gly; (SEQ ID No. 127)
- (i) Asp-Pro-Ala-Ser-Ala-Pro-Asp-Val-Pro-Thr-Ala-Ala-Gln-Leu-
Thr-Ser-Leu-Leu-Asn-Ser-Leu-Ala-Asp-Pro-Asn-Val-Ser-Phe-
Ala-Asn; (SEQ ID No. 128)
- (j) Xaa-Asp-Ser-Glu-Lys-Ser-Ala-Thr-Ile-Lys-Val-Thr-Asp-Ala-
Ser; (SEQ ID No. 134)
- (k) Ala-Gly-Asp-Thr-Xaa-Ile-Tyr-Ile-Val-Gly-Asn-Leu-Thr-Ala-
Asp; (SEQ ID No. 135) or
- (l) Ala-Pro-Glu-Ser-Gly-Ala-Gly-Leu-Gly-Gly-Thr-Val-Gln-Ala-
Gly; (SEQ ID No. 136)

kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina, výhodně cysteinový zbytek. DNA sekvence kodující antigen identifikovaný jako (g), výše, je uvedena v SEQ ID NO: 52 a polypeptid kodovaný SEQ ID NO: 52 je uveden v SEQ ID NO: 53. DNA sekvence kodující antigen označený (a) je uvedena v SEQ ID NO: 101; její odvozená aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID NO: 103. DNA sekvence odpovídající antigenu (d), výše, je uvedena v SEQ ID NO: 24 a DNA sekvence odpovídající antigenu (c) je uvedena v SEQ ID NO: 25 a DNA sekvence odpovídající antigenu (i) je uvedena v SEQ ID NO: 99; její odvozená aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID NO: 100.

V dalším specifickém provedení popisuje vynález polypeptidy obsahující alespoň imunogenní část antigenu *M. tuberculosis*, který má následující N-koncové sekvence, nebo jeho varianty, které se liší pouze konzervativní substitucí a/nebo modifikací:

- (m) Xaa-Tyr-Ile-Ala-Tyr-Xaa-Thr-Thr-Ala-Gly-Ile-Val-Pro-Gly-Lys-Ile-Asn-Val-His-Leu-Val; (SEQ ID No 137) or
- (n) Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-His-Gln-Xaa-Asp-Met-Thr-Lys-Gly-Tyr-Tyr-Pro-Gly-Gly-Arg-Arg-Xaa-Phe; (SEQ ID No. 129)

kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina, výhodně cysteinový zbytek.

V jiných specifických provedeních popisuje vynález polypeptidy obsahující alespoň jednu imunogenní část solubilního antigenu *M. tuberculosis* (nebo variantu takového antigenu), která obsahuje jednu nebo více aminokyselinových sekvencí kodovaných (a) DNA sekvencemi SEQ ID NO: 1, 2, 4-10, 13, 25 a 52; (b) sekvencemi komplementárními k takovým DNA sekvencím, nebo (c) DNA sekvencemi významně homologními k sekvencím v (a) a (b).

V ještě jiných specifických provedeních popisuje vynález polypeptidy obsahující alespoň jednu imunogenní část antigenu *M. tuberculosis* (nebo variantu takového antigenu), který nemusí být solubilní, která obsahuje jednu nebo více aminokyselinových sekvencí kodovaných (a) DNA sekvencemi SEQ ID NO: 26 a 51; (b) sekvencemi komplementárními k takovým DNA sekvencím, nebo (c) DNA sekvencemi významně homologními k sekvencím v (a) a (b).

Ve specifických provedeních uvedených výše zahrnuje antigen *M.*

tuberculosis varianty, které jsou kodovány DNA sekvencemi, které jsou významně homologní k jedné nebo více DNA sekvencemi zde uvedenými. "Významná homologie", jak je zde použito, označuje DNA sekvence, které jsou schopné hybridizace za podmínek střední přísnosti. Vhodné podmínky střední přísnosti zahrnují předpromytí v roztoku 5xSSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); hybridizaci při 50 °C - 65 °C, 5X SSC, přes noc, nebo, v případě mezidruhové homologie při 45 °C, 0,5X SSC; potom dvakrát promytí při 65 °C po dobu 20 minut každým z 2X, 0,5X a 0,2X SSC obsahujícím 0,1% SDS). Takové hybridizující sekvence spadají také do rozsahu předkládaného vynálezu, stejně jako nukleotidové sekvence, které vzhledem k degeneraci genetického kodu, kodují imunogenní polypeptid, který je kodován hybridizující DNA sekvencí.

V souvisejícím aspektu poskytuje předkládaný vynález fúsní proteiny obsahující první a druhý polypeptid podle předkládaného vynálezu, nebo, alternativně, polypeptid podle předkládaného vynálezu a známý antigen M. tuberculosis, jako je 38 kDa antigen popsán výše nebo ESAT-6 (SEQ ID NO: 103 a SEQ ID NO: 104), spolu s variantami takových fúsních proteinů. Fúsní proteiny podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat spojovací peptid mezi prvním a druhým polypeptidem.

DNA sekvence kodující fúsní protein podle předkládaného vynálezu je konstruována za použití známých rekombinantních DNA technik pro seřazení separátních DNA sekvencí kodujících první a druhý polypeptid do vhodného expresního vektoru. 3' konec DNA sekvence kodující první polypeptid je ligován, s nebo bez sekvence spojovacího peptidu, na 5' konec DNA sekvence kodující druhý polypeptid, takže čtecí rámečky sekvencí jsou ve fázi umožňující translaci mRNA dvou DNA sekvencí do fúsního proteinu,

který si uchovává biologickou aktivitu jak prvního, tak druhého polypeptidu.

Peptidová spojovací sekvence může být použita pro separaci prvního a druhého polypeptidu dostatečnou vzdáleností pro to, aby bylo zajištěno pro každý polypeptid správné složení jeho sekundární a terciární struktury. Taková peptidová spojovací sekvence je vložena do fúsního proteinu za použití technik v oboru dobře známých. Vhodné peptidové spojovací sekvence mohou být vybrány na základě následujících faktorů: (1) jejich schopnosti přijímat flexibilní roztaženou konformaci; (2) jejich neschopnosti přijímat sekundární strukturu, která by mohla interagovat s funkčními epitopy na prvním nebo na druhém polypeptidu; a (3) chybění hydrofobních nebo nabitých zbytků, které by mohly interagovat s funkčními epitopy polypeptidů. Výhodné peptidové spojovací sekvence obsahují Gly, Asn, a Ser zbytky. Jiné příbuzné neutrální aminokyseliny, jako je Thr a Ala, mohou být také použity ve spojovací sekvenci. Aminokyselinové sekvence, které mohou být výhodně použity jako spojovací sekvence, zahrnují ty, které jsou popsány v Marata et al., Gene 40: 39 - 46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8258 - 8262, 1986; US patent č. 4935233 a US patent č. 4751180. Spojovací sekvence může mít délku od 1 do 20 aminokyselin. Peptidové sekvence nejsou nutné, pokud první a druhé polypeptidy mají neesenciální N-koncové aminokyselinové regiony, které mohou být použity pro separaci funkčních domén a zabránění sterické interference.

Ligované DNA sekvence jsou operativně navázané na vhodné transkripční a translační regulační regulační elementy. Regulační elementy odpovídající za expresi DNA jsou umístěny pouze na 5'

konci DNA sekvence kodující první polypeptid. Podobně, stop kodony nutné pro ukončení translace a transkripční terminační signály jsou umístěny pouze na 3' konci DNA sekvence kodující druhý polypeptid.

V jiném aspektu poskytuje předkládaný vynález způsob pro použití jednoho nebo více z výše uvedených polypeptidů nebo fúsních proteinů (nebo DNA molekul kodujících takové polypeptidy) pro indukci protektivní imunity proti tuberkulóze u pacienta. Jak je zde použito, "pacient" označuje jakékoliv teplokrevného živočicha, výhodně člověka. Pacient může být postižen onemocněním, nebo může být bez detekovatelného onemocnění a/nebo infekce. Jinými slovy, protektivní imunita může být indukována pro prevenci nebo pro léčbu tuberkulózy.

V tomto aspektu je polypeptid, fúsní protein nebo molekula DNA obvykle přítomna ve farmaceutickém přípravku a/nebo vakcině. Farmaceutické přípravky mohou obsahovat jeden nebo více polypeptidů, z nichž každý může obsahovat jednu nebo více z výše uvedených sekvencí (nebo jejich variant) a fyziologicky přijatelný nosič. Vakciny mohou obsahovat jeden nebo více z výše uvedených polypeptidů a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi, jako je adjuvans nebo liposom (do kterého je polypeptid inkorporován). Takové farmaceutické přípravky a vakciny mohou také obsahovat další antigeny M. tuberculosis, buď v kombinovaném polypeptidu nebo v jiném separátním polypeptidu.

Alternativně může vakcína obsahovat DNA kodující jeden nebo více polypeptidů popsaných výše, jako jsou polypeptidy generované in situ. V takových vakcínách může být DNA přítomna v jakémkoliv z mnoha systémů pro podání v oboru známých, včetně expresních

systémů nukleových kyselin, bakteriálních a virových expresních systémů. Vhodné expresní systémy nukleových kyselin obsahují nezbytné DNA sekvence pro expresi u pacienta (jako je vhodný promotor a terminační signál). Bakteriální systémy pro podání obsahují podání bakterie (jako je *Bacillus Calmette-Guerrin*), která exprivuje imunogenní část polypeptidu na svém povrchu. Ve výhodném provedení může být DNA zavedena do organismu za použití virového expresního systému (například viru vakcinie nebo pox viru, retroviru nebo adenoviru), což může obsahovat použití nepatogenních (defektních), replikace-kompetentních virů. Techniky pro vložení DNA do takových expresních systémů jsou odborníkům v oboru dobře známé. DNA může také být "nahá", jak je to popsáno, například, v Ulmer et al., *Science* 259: 1745 - 1749, 1993 a Cohen, *Science* 259: 1691 - 1692, 1993. Vychytávání nahé DNA může být zvýšeno potažením DNA na biodegradovatelné korálky, které jsou účinně transportovány do buněk.

V souvisejícím aspektu může být DNA vakcina jak je popsána výše podána simultáně nebo sekvenčně s polypeptidem podle předkládaného vynálezu a nebo známým antigenem *M. tuberculosis*, jako je 38 kDa antigen popsáný výše. Například, podání DNA kodující polypeptid podle předkládaného vynálezu, buď "nahé", nebo v systému pro podání popsáném výše, může být následováno podáním antigenu pro zvýšení protektivního imunitního účinku vakciny.

Způsoby a frekvence podání, stejně jako dávkování, se bude velmi lišit mezi jednotlivci a může být paralelní k v současné době používané imunizaci za použití BCG. Obecně, farmaceutické kompozice a vakciny mohou být podány injekčně (například intrakutánně, intramuskulárně, intravenosně nebo subkutánně),

intranasálně (například aspirací) nebo orálně. 1 až 3 dávky mohou být podány v průběhu 1 - 36 týdnů. Výhodně jsou podány 3 dávky, v intervalu 3 až 4 měsíců, a dosycovací imunizace mohou být potom podávány periodicky. Alternativní protokoly mohou být vhodné pro jednotlivé pacienty. Vhodnou dávkou je množství DNA nebo polypeptidu, které, při podání popsaném výše, vyvolá imunitní odpověď u imunizovaného pacienta, která je dostatečná pro ochranu pacienta před infekcí *M. tuberculosis* po dobu alespoň 1-2 let. Obecně, množství polypeptidu v dávce (nebo produkované *in situ* DNA) je v rozsahu od asi 1 pg do asi 100 mg na kg hostitele, typicky od asi 10 pg do asi 1 mg, a výhodně od asi 100 pg do asi 1 µg. Vhodná velikost dávky se bude velmi lišit podle velikosti pacienta, ale typicky bude v rozmezí od asi 0,1 ml do asi 5 ml.

Ačkoliv ve farmaceutickém přípravku podle předkládaného vynálezu může být použit jakýkoliv vhodný nosič v oboru známý, bude se typ nosiče velmi lišit podle způsobu podání. Pro parenterální podání, jako je subkutánní injekce, bude nosič výhodně zahrnovat vodu, fyziologický roztok, alkohol, tuk, vosk nebo pufr. Pro orální podání může být použit jakýkoliv z výše uvedených nosičů nebo pevný nosič, jako je manitol, laktosa, škrob, steran hořečnatý, sacharin sodný, talek, celuloza, gluoosa, sacharosa a uhličitán hořečnatý. Biodegradovatelné mikrosféry (například galaktan kyseliny polymléčné) mohou být také použity jako nosiče pro farmaceutické přípravky podle předkládaného vynálezu. Vhodné biodegradovatelné mikrosféry jsou popsány, například, v US patentech č. 4897268 a 5075109.

Ve vakcínách podle předkládaného vynálezu může být pro nespecifické posílení imunitní odpovědi použito jakékoliv z mnoha adjuvans. Většina adjuvans obsahuje sloučeniny navržené pro

ochranu antigenu před rychlým katabolismem, jako je hydroxid hlinitý a minerální olej, a nespecifické stimulátory imunitní odpovědi, jako je lipid A, Bordetella pertussis nebo Mycobacterium tuberculosis. Vhodná adjuvans jsou komerčně dostupná jako, například, Freundovo nekompletní adjuvans a Freundovo kompletní adjuvans (Difco laboratories) a Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ). Další vhodná adjuvans zahrnují síran hlinitodraselný, biodegradovatelné mikrosféry, monofosforyl lipid A a quil A.

V jiném aspektu vynález poskytuje metody pro použití jednoho nebo více polypeptidů podle předkládaného vynálezu pro diagnostiku tuberkulózy za použití kožního testu. Jak je zde použito, "kožní test" je test provedený přímo na pacientovi, ve kterém je měřena reakce oddáleného typu přecitlivělosti (DTH) (jako je otok, zčervenání nebo dermatitis) po intradermální injekci jednoho nebo více polypeptidů podle předkládaného vynálezu. Taková injekce může být provedena za použití jakéhokoli vhodného prostředku dostatečného pro kontaktování polypeptidu nebo polypeptidů s buňkami dermis pacienta, jako je například tuberkulinová injekční stříkačka nebo 1 ml injekční stříkačka. Výhodně je reakce měřena alespoň 48 hodin po injekci, lépe 48 - 72 hodin.

DTH reakce je imunitní odpověď zprostředkovaná buňkami, která je největší u pacientů, kteří byly dříve vystaveni testovanému antigenu (t.j. imunogenní části použitého polypeptidu, nebo jeho varianty). Odpověď může být měřena vizuálně, za použití pravítka. Obecně, odpověď větší než 0,5 cm v průměru, lépe větší než 1,0 cm v průměru, je pozitivní odpověď, ukazující na tuberkulózní infekci, která se může nebo nemusí projevovat jako aktivní

onemocnění.

Polypeptidy podle předkládaného vynálezu jsou výhodně formulovány, pro použití v kožním testu, jako farmaceutické přípravky obsahující polypeptid a fyziologicky přijatelný nosič, jak je popsáno výše. Takové přípravky typicky obsahují jeden nebo více z výše uvedených polypeptidů v množství od asi 1 μ do asi 100 μ g, výhodně od 10 μ g do asi 50 μ g v objemu 0,1 ml. Výhodně je nosičem použitým v takových farmaceutických přípravcích fyziologický roztok s vhodnými konzervačními činidly, jako je fenol a/nebo Tween 80TM.

Ve výhodném provedení je polypeptid použitý v kožním testu dostatečné velikosti, aby zůstal v místě injekce po dobu trvání reakce. Obecně, dostatečný je polypeptid o délce alespoň 9 aminokyselin. Polypeptid je také výhodně zpracován makrofágy během několika hodin po injekci pro presentaci T-buňkám. Takové polypeptidy mohou obsahovat opakující se úseky jedné nebo více z výše uvedených sekvencí a/nebo další imunogenní nebo neimunogenní sekvence.

Následující příklady jsou uvedeny pro ilustraci, nikoliv jako omezení předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 - Přečištění a charakterizace polypeptidů z filtrátu kultury M. tuberculosis

Tento příklad ilustruje přípravu solubilních polypeptidů M. tuberculosis z filtrátu kultury. Pokud není uvedeno jinak, jsou

všechna procenta uvedena jako hmotnost na objem.

M. tuberculosis (buď H37Ra, ATCC č. 25177, nebo H37Rv, ATCC č. 25618) bylo kultivováno ve sterilním GAS mediu při 37 °C po dobu čtrnácti dnů. Medium bylo potom vakuově filtrováno (s ponecháním objemu buněk) přes 0.45 μ filtr do sterilní 2,5 l nádoby. Medium bylo potom filtrováno přes 0,2 μ filtr do sterilní 4 l nádoby a k filtrátu kultury byl přidán NaN_3 v koncentraci 0,04%. Lahve byly potom umístěny v místnosti s teplotou 4 °C.

Filtrát kultury byl koncentrován umístěním filtrátu do 12 l reservoáru, který byl potom autoklavován a vložením filtrátu do Amicron míchací kyvety, která byla vypláchnuta ethanolem a obsahovala 10000 kDa MWCO membránu. Tlak byl udržován na 60 psi za použití plynného dusíku. Tento postup redukoval 12 l objem na přibližně 50 ml.

Filtrát kultury byl dialyzován do 0,1% hydrogenuhlíčitanu amonného za použití 8000 kDa MWCO membrány z esteru celulosy, se dvěma výměnami roztoku hydrogenuhlíčitanu amonného. Koncentrace proteinu byla určena komerčně dostupným BCA testem (Pierce, Rocford, IL).

Dialyzovaný filtrát kultury byl potom lyofilizován a polypeptidy byly resuspendovány v destilované vodě. Polypeptidy byly znovu dialyzovány proti 0,01 mM 1,3 bis(tris(hydroxymethyl)-methylamino)propanu, pH 7,5 (Bis-Tris propanový pufr), což bylo východiskem pro aniontovou výměnnou chromatografii. Frakcionace byla provedena za použití gelové vylučovací chromatografie na POROS 146 II Q/M aniontové výměnné koloně 4,6 x 100 mm (Perseptive BioSystems, Framingham, MA)

uvedené do rovnováhy v 0,01 mM Bis-Tris propanového pufru pH 7,5. Polypeptidy byly eluovány lineárními gradienty 0 - 0,5 M NaCl ve výše uvedeném pufrovací systému. Eluent z kolony byl sledován při vlnové délce 220 nm.

Soubory polypeptidů eluující z iontové výměnné kolony byly znovu dialyzovány proti destilované vodě a lyofilizovány. Výsledná materiál byl rozpuštěn v 0,1% kyselině trifluoroctové (TFA) pH 1,9 ve vodě a polypeptidy byly přečištěny na Delta-Pak C18 koloně (Waters, Milford, MA) s velikostí pórů 300 Angstromů, velikostí částic 5 mikronů (3,9 x 150 mm). Polypeptidy byly eluovány z kolony lineárním gradientem 0-60% ředícího pufru (0,1% TFA v acetonitrilu). Rychlost průtoku byla 0,75 ml/minutu a HPLC eluent byl sledován při 214 nm. Frakce obsahující eluované polypeptidy byly odebrány pro maximalizaci čistoty jednotlivých vzorků. Bylo získáno asi 200 přečištěných polypeptidů.

Přečištěné polypeptidy byly potom vyšetřovány na schopnost indukovat proliferaci T-buněk v PBMC přípravcích. PBMC od dárců s pozitivním PPD kožním testem a ty T-buňky, které proliferovaly v odpovědi na PPD a surové solubilní proteiny od MTB byly kultivovány v mediu obsahujícím RPMI 1640 doplněné 10% odebraným lidským sérem a 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicinu. Přečištěné polypeptidy byly přidány ve dvojím provedení v koncentracích 0,5 až 10 $\mu\text{g/ml}$. Po šesti dnech kultivace v 96-jamkových plotnách s plochým dnem v objemu 200 μl , bylo 50 μl media odebráno z každé jamky pro určení hladin IFN- γ , jak je popsáno výše. Plotny byly potom pulsovány 1 $\mu\text{Ci/jamku}$ tritiem značeného thymidinu po dobu dalších 18 hodin, potom byly sklizeny a byly určeno vychytávání tritia za použití plynne scintilační kamery. Frakce, které způsobovaly v obou provedeních proliferaci trojnásobně vyšší, než je pozorována u

buněk kultivovaných pouze za přítomnosti media, byly považovány za pozitivní.

IFN- γ byl měřen za použití enzymově vázaného imunosorbentního testu (ELISA). ELISA plotny byly potaženy myší monoklonální protilátkou namířenou proti lidskému IFN- γ (PharMingen, San Diego, CA) v PBS po dobu 4 hodin při pokojové teplotě. Jamky byly potom blokovány PBS obsahujícím 5% (hmotnost/objem) odtučněné sušené mléko po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Plotny byly potom šestkrát promyty v PBS/0,2% Tween-20 a vzorky ředěné 1:2 v kultivačním mediu na ELISA plotnách byly inkubovány přes noc při pokojové teplotě. Plotny byly znovu promyty a do každé jamky bylo přidáno polyklonální králičí anti-lidský IFN- γ sérum ředěné 1:3000 v PBS/10% normální kozí sérum. Plotny byly potom inkubovány po dobu 2 hodin při pokojové teplotě, byly promyty a byly přidány anti-králičí IgG s navázanou křenovou peroxidasou (Sigma Chemicals So., St. Louis, MO) v ředění 1:2000 v PBS/5% odtučněné sušené mléko. Po dvou hodinách inkubace při pokojové teplotě byly plotny promyty a byl přidán TMB substrát. Optická densita byla určena při 450 nm za použití 570 nm jako referenční vlnové délky. Frakce, které měly v obou provedeních OD dvakrát vyšší než je průměrná OD pro buňky kultivované v mediu samotném, plus 3 standartní odchylky, byly považovány za pozitivní.

Pro sekvencování byly polypeptidy jednotlivě sušeny na BiobreneTM (Perkin Elmer/Applied BioSystems Division, Foster City, CA) ošetřených filtrech ze skelných vláken. Filtry s polypeptidem byly vloženy do Perkin Elmer/Applied BioSystems Division Procise 492 proteinového sekvenátoru. Polypeptidy byly sekvencovány z amino konce za použití tradiční Edmanovi chemie. Aminokyselinová sekvence byla určena pro každý polypeptid

srovnáním retenční doby PTH aminokyselinového derivátu s vhodnými standardy PTH derivátu.

Za použití postupů popsaných výše byly izolovány antigeny mající následující N-koncové sekvence:

- (a) Asp-Pro-Val-Asp-Ala-Val-Ile-Asn-Thr-Thr-Xaa-Asn-Tyr-Gly-Gln-Val-Val-Ala-Ala-Leu; (SEQ ID No. 54)
- (b) Ala-Val-Glu-Ser-Gly-Met-Leu-Ala-Leu-Gly-Thr-Pro-Ala-Pro-Ser; (SEQ ID No. 55)
- (c) Ala-Ala-Met-Lys-Pro-Arg-Thr-Gly-Asp-Gly-Pro-Leu-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Gly-Arg; (SEQ ID No. 56)
- (d) Tyr-Tyr-Trp-Cys-Pro-Gly-Gln-Pro-Phe-Asp-Pro-Ala-Trp-Gly-Pro; (SEQ ID No. 57)
- (e) Asp-Ile-Gly-Ser-Glu-Ser-Thr-Glu-Asp-Gln-Gln-Xaa-Ala-Val; (SEQ ID No. 58)
- (f) Ala-Glu-Glu-Ser-Ile-Ser-Thr-Xaa-Glu-Xaa-Ile-Val-Pro; (SEQ ID No. 59)
- (g) Asp-Pro-Glu-Pro-Ala-Pro-Pro-Val-Pro-Thr-Ala-Ala-Ala-Ala-Pro-Pro-Ala; (SEQ ID No. 60) and
- (h) Ala-Pro-Lys-Thr-Tyr-Xaa-Glu-Glu-Leu-Lys-Gly-Thr-Asp-Thr-Gly; (SEQ ID No. 61)

kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina.

Další antigen byl získán za použití kroku přečištění na microbore HPCL navíc k postupu popsanému výše. Konkrétně, 20 μ l frakce obsahující směs antigenů z dříve popsaného kroku chromatografického přečištění bylo přečištěno na Aquapore C18 koloně (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City,

CA) s pory velikosti 7 mikronů, kolonou velikosti 1 mm x 100 mm, na Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Model 172 HPLC. Frakce byly eluovány z kolony za použití lineárního gradientu 1%/minutu acetonitrilu (obsahujícího 0,05% TFA) ve vodě (0,05% TFA) rychlostí toku 80 μ l/minutu. Eluent byl monitorován při 250 nm. Originální frakce byla separována do 4 hlavních píků plus dalších menších složek a byl získán polypeptid, který měl molekulovou hmotnost 12.054 kDa (podle hmotové spektrometrie) a který měl následující N-koncovou sekvenci:

- (i) Asp-Pro-Ala-Ser-Ala-Pro-Asp-Val-Pro-Thr-Ala-Ala-Gln-Gln-Thr-Ser-Leu-Leu-Asn-Asn-Leu-Ala-Asp-Pro-Asp-Val-Ser-Phe-Ala-Asp (SEQ ID No. 62).

Bylo prokázáno, že tento polypeptid indukuje proliferaci a produkci IFN- γ v přípravcích PBMC za použití testů popsanych výše.

Další solubilní antigeny byly izolovány z filtrátu kultury M. tuberculosis následujícím způsobem. Filtrát kultury M. tuberculosis byl připraven stejným způsobem jako výše. Po dialýze proti Bis-Tris propanovému pufru, při pH 5,5, byla provedena frakcionace za použití aniontové výměnné chromatografie na Poros QE koloně 4,6 x 100 mm (Perseptive Biosystems) uvedené do rovnováhy Bis-Tris propanovým pufrem pH 5,5. Polypeptidy byly eluovány lineárním gradientem 0 - 1,5 M NaCl ve výše uvedeném pufrovacím systému při průtoku 10 ml/minutu. Eluens kolony byl monitorován při vlnové délce 214 nm.

Frakce eluující z iontové výměnné kolony byly shromážděny a byly podrobeny chromatografii na reversní fázi za použití Poros

R2 kolony 4,6 x 100 mm (Perseptive Biosystems). Polypeptidy byly eluovány z kolony lineárním gradientem od 0 - 100% acetonitrilu (0,1% TFA) při průtoku 5 ml/minutu. Eluens byl monitorován při 214 nm.

Frakce obsahující eluované polypeptidy byly lyofilizovány a resuspendovány v 80 μ l vodného 0,1% TFA a dále byly podrobeny chromatografii na reversní fázi na Vydac C4 koloně 4,6 x 150 mm (Western Analytical, Temecula, CA) s lineárním gradientem od 0 - 100% acetonitrilu (0,1% TFA) při průtoku 2 ml/minutu. Eluens byl monitorován při 214 nm.

Frakce s biologickou aktivitou byla separována do jednoho hlavního píku plus dalších menších složek. Western blot tohoto píku na PVDF membráně ukázal tři hlavní proužky o molekulové hmotnosti 14 kDa, 20 kDa a 26 kDa. U těchto polypeptidů byly určeny následující N-koncové sekvence, v příslušném pořadí:

- (j) Xaa-Asp-Ser-Glu-Lys-Ser-Ala-Thr-Ile-Lys-Val-Thr-Asp-Ala-Ser; (SEQ ID No. 134)
- (k) Ala-Gly-Asp-Thr-Xaa-Ile-Tyr-Ile-Val-Gly-Asn-Leu-Thr-Ala-Asp; (SEQ ID No. 135) and
- (l) Ala-Pro-Glu-Ser-Gly-Ala-Gly-Leu-Gly-Gly-Thr-Val-Gln-Ala-Gly; (SEQ ID No. 136),

kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina.

Za použití testů popsaných výše bylo prokázáno, že tyto polypeptidy indukují proliferaci a produkci IFN- γ u PBMC. Obrázky 1A a 1B ukazují výsledky takových testů za použití přípravků PBMC

od prvního a druhého dárce, v příslušném pořadí.

DNA sekvence, které kodují antigeny označené jako (a), (c), (d) a (g), výše, byly získány vyšetřením genomové *M. tuberculosis* knihovny za použití ^{32}P koncově značených degenerovaných oligonukleotidů odpovídajících N-koncové sekvenci a obsahující *M. tuberculosis* chybné kodony. Vyšetření provedené za použití sondy odpovídající antigenu (a), výše, identifikovalo klon mající sekvence uvedenou v SEQ ID NO: 101. Polypeptid kodovaný SEQ ID NO: 101 je uveden v SEQ ID NO: 102. Vyšetření provedené za použití sondy odpovídající antigenu (g), výše, identifikovalo klon mající sekvence uvedenou v SEQ ID NO: 52. Polypeptid kodovaný SEQ ID NO: 52 je uveden v SEQ ID NO: 53. Vyšetření provedené za použití sondy odpovídající antigenu (d), výše, identifikovalo klon mající sekvence uvedenou v SEQ ID NO: 24 a vyšetření provedené za použití sondy odpovídající antigenu (c), výše, identifikovalo klon mající sekvence uvedenou v SEQ ID NO: 25.

Výše uvedené aminokyselinové sekvence byly srovnávány se známými aminokyselinovými sekvencemi v genové bance za použití DNA STAR systému. Prozkoumávaná database obsahovala okolo 173000 proteinů a byla kombinována se Swiss, PIR databasemi spolu s translatovanými proteinovými sekvencemi (Verse 87). Nebyly detekovány žádné signifikantní homologie s aminokyselinovými sekvencemi pro antigeny (a) - (h) a (l).

Bylo zjištěno, že aminokyselinová sekvence pro antigen (i) je homologní se sekvencí z *M. leprae*. Kompletní sekvence *M. leprae* byla amplifikována z genomové DNA za použití sekvence získané z GENBANK. Tato sekvence byla potom použita pro vyšetřování *M.*

tuberculosis knihovny popsané dále v příkladu 2 a byla získána kompletní kopie homologu *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 99).

Bylo zjištěno, že aminokyselinová sekvence pro antigen (j) je homologní k známému proteinu *M. tuberculosis* translatovanému z DNA sekvence. Podle vědomostí vynálezců nebylo doposud popsáno, že by tento protein měl stimulační aktivitu pro T-buňky. Bylo zjištěno, že aminokyselinové sekvence (k) je příbuzná sekvenci z *M. leprae*.

Výsledky pro reprezentativní antigeny uvedené výše v testech proliferace a IFN- γ produkce provedených za použití tří PPD pozitivních dárců jsou uvedeny v tabulce 1:

Tabulka 1 - Výsledky testu proliferace PBMC a produkce IFN- γ

Sekvence	Proliferace	IFN- γ
(a)	+	-
(c)	+++	+++
(d)	++	++
(g)	+++	+++
(h)	+++	+++

V tabulce 1 byla odpověď, která dávala stimulační index (SI) mezi 2 a 4 (vzhledem k buňkám kultivovaným pouze v mediu) počítána jako +, SI 4 - 8 nebo 2 - 4 v koncentraci 1 μ g nebo menší byla počítána jako ++ a SI vyšší než 8 byla počítána jako +++. Antigen sekvence (c) měl vysoký SI (+++) pro jednoho dárce a nižší SI (++ a +) pro další dva dárce v proliferačním i IFN- γ

testu. Tyto výsledky ukazují, že tyto antigeny jsou schopné indukce proliferace a/nebo produkce IFN- γ .

Příklad 2 - Použití séra od pacienta pro izolaci antigenů *M. tuberculosis*

Tento příklad popisuje izolaci antigenů z lyzátů *M. tuberculosis* za pomoci vyšetřování sérem od jedinců infikovaných *M. tuberculosis*.

Vysušené *M. tuberculosis* H37Ra (Difco Laboratories) bylo přidáno k 2% roztoku NP40 a třikrát byla provedena střídavě homogenizace a sonikace. Vzniklá suspenze byla centrifugována při 13000 rpm v mikrocentrifugových tubách a supernatant byl protlačen přes 0,2 mikronový stříkačkový filtr. Filtrát byl navázán na Macro Prep DEAE korálky (BioRad, Hercules, CA). Korálky byly důkladně promyty 20 mM Tris pH 7,5 a navázané proteiny byly eluovány 1 M NaCl. 1 M NaCl eluát byl dialyzován přes noc proti 10 mM Tris, pH 7,5. Dialyzovaný roztok byl ošetřen DNAsou a RNAsou při koncentraci 0,05 mg/ml po dobu 30 minut při pokojové teplotě a potom α -D-manosidasou, 0,5 U/mg při pH 4,5 po dobu 3 - 4 hodin při pokojové teplotě. Po návratu k pH 7,5 byl materiál frakcionován pomocí FPLC na Bio Scale Q-20 koloně (BioRad). Frakce byly kombinovány do 9 souborů, byly koncentrovány na Centriprep 10 (Amicon, Beverley, MA) a byly vyšetřovány ve Western blotu na svou serologickou aktivitu za použití séra od pacientů infikovaných *M. tuberculosis*, které nebylo imunoreaktivní s jinými antigeny podle předkládaného výsledku.

Nejvíce reaktivní frakce byla potom podrobena SDS-PAGE a byla

přenesena do PVDF. Byl vyříznut proužek o přibližně 85 kDa za zisku sekvence:

(m) Xaa-Tyr-Ile-Ala-Tyr-Xaa-Thr-Thr-Ala-Gly-Ile-Val-Pro-Gly-Lys-Ile-Asn-Val-His-Leu-Val: (SEQ ID No. 137),

kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina.

Srovnání této sekvence se sekvencemi v genové bance jak bylo popsáno výše neukázalo žádnou signifikantní homologii se známými sekvencemi.

Příklad 3 - Příprava DNA sekvencí kodujících antigeny M. tuberculosis

Tento příklad popisuje přípravu DNA sekvencí kodujících antigeny M. tuberculosis za pomoci vyšetřování M. tuberculosis expresní knihovny sérem od pacientů infikovaných M. tuberculosis, nebo anti-séra proti solubilním antigenům M. tuberculosis.

A. Příprava solubilních antigenů M. tuberculosis za použití králičího antiséra

Genomová DNA byla izolována z M. tuberculosis kmene H37Ra. DNA byla náhodně rozstřižena a byla použita pro konstrukci expresní knihovny za použití Lambda ZAP expresního systému (Stratagene, La Jolla, CA). Bylo generováno králičí antisérum proti sekrečním proteinům M. tuberculosis kmenů H37Ra, H37Rv a Erdman imunizací králíků koncentrovaným supernatantem kultur M. tuberculosis. Přesněji, králíci byli nejprve imunizováni podkožně 200 µg proteinového antigenu v celkovém objemu 2 ml obsahujícím 10 µg

muramyl dipeptidu (Calbiochem, La Jolla, CA) a 1 ml nekompletního Freundova adjuvans. O čtyři týdny později byla králíkům podána dosycovací dávka 100 μ g antigenu v nekompletním Freundově adjuvans. Nakonec byli králíci imunizováni subkutánně 50 μ g proteinového antigenu. Anti-sérum bylo použito pro vyšetřování expresní knihovny, jak je to popsáno v Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Bakteriofágové plaky exprivující imunoreaktivní antigen byly přečištěny. Byly získány fagemidy z plaků a byla odvozena nukleotidová sekvence klonů M. tuberculosis.

Bylo přečištěno 32 klonů. Z těchto 25 představovalo sekvence, které nebyly dříve identifikovány u lidského M. tuberculosis. Rekombinantní antigeny byly exprivovány a přečištěné antigeny byly použity v imunologické analýze popsané v příkladu 1. Proteiny byly indukovány IPTG a byly přečištěny gelovou elucí, jak je popsáno v Skeiky et al., J. Exp. Med. 181: 1527 - 1537, 1995. Reprezentativní sekvence DNA molekul identifikovaných v tomto vyšetření jsou uvedeny v SEQ ID NO: 1 - 25. Odpovídající předpokládané aminokyselinové sekvence jsou uvedeny v SEQ ID NO: 63 - 87.

Při srovnání těchto sekvencí se známými sekvencemi v genové bance za použití database uvedené výše bylo zjištěno, že klony, které jsou zde označeny TbRA2A, TbRA16, TbRA18 a TbRA29 (SEQ ID NO: 76, 68, 70, 75) vykazují určitou homologii se sekvencemi dříve identifikovanými v Mycobacterium leprae, ale nikoliv v M. tuberculosis. TbRA11, TbRA26, TbRA28 a TbDPEP (SEQ ID NO: 65, 73, 74 a 53) byly dříve identifikovány v M. tuberculosis. Žádná signifikantní homologie nebyla nalezena pro TbRA1, TbRA3, TbRA4,

TbRA9, TbRA10, TbRA13, TbRA17, TbRA19, TbRA29, TbRA32, TbRA36 a překrývající se klony TbRA35 a TbRA12 (SEQ ID NO: 63, 77, 81, 82, 64, 67, 69, 71, 75, 78, 80, 79, 66). Klon TbRa24 se překrývá s klonem TbRa29.

Výsledky testů proliferace PBMC a produkce IFN- γ provedených pro reprezentativní rekombinantní antigeny za použití přípravků T-buněk od několika různých pacientů imunních vůči M. tuberculosis jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3, v příslušném pořadí.

Tabulka 2 - Výsledky proliferace PBMC v odpovědi na
representativní solubilní antigeny

[illegible]

Tabulka 3 - Výsledky produkce IFN- γ v PBMC v odpovědi na
representativní solubilní antigeny

Antigen	Pacient												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TbRa1	+	++		+++	+	-		±	-	-	+	±	-
TbRa3	-	±	++	-	±	-	-	++	±	-	-	-	-
TbRa9	++	+	nt	nt	++	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
TbRa10	+	+	±	±	±	+	nt	±	-	+	±	±	-
TbRa11		±	+	++	++	+	nt	-	++	++	++	±	nt
TbRa12	-	-	+	+	±	+++	+	±	±	-	+	-	-
TbRa16	nt	nt	nt	nt	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
TbRa24	nt	nt	nt	nt	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
TbRa26	++	++	nt	nt	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
TbRa29	nt	nt	nt	nt	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
TbRa35	++	nt	++	++	+++	+++	nt	++	++	+++	+++	++	nt
TbRaB	nt	nt	nt	nt	++	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
TbRaC	nt	nt	nt	nt	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
TbRaD	nt	nt	nt	nt	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
AAMK	-	-	±	-	-	-	nt	-	-	-	nt	±	nt
YY	-	-	-	-	-	-	nt	-	-	-	nt	+	nt
DPEP	+	+	+	+++	+	-	nt	+++	±	+	±	±	nt
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

V tabulkách 1 a 2 byly odpovědi, které dávaly stimulační index (SI) mezi 1,2 a 2 (vzhledem k buňkám kultivovaným v mediu samotném) počítány jako ±, SI mezi 2-4 byly počítány jako +, SI 4-8 nebo 2-4 při koncentraci 1 μ g nebo menší byly počítány jako

++ a SI vyšší než 8 byly počítány jako +++ . Kromě toho, účinek koncentrace na proliferaci a produkci interferonu- γ je pro dva z výše uvedených antigenů ukázán na připojených obrázcích. Pro proliferaci i produkci interferonu- γ byl TbRa3 počítán jako ++ a TbRa9 jako +.

Tyto výsledky naznačují, že tyto solubilní antigeny mohou indukovat proliferaci a/nebo produkci interferonu- γ v T-buňkách získaných od jedinců imunních vůči M. tuberculosis.

B. Použití séra od pacienta pro identifikaci DNA sekvence kodující antigeny M. tuberculosis

Genomová DNA knihovna popsaná výše a další H37Rv knihovna byly vyšetřovány za použití souborů séra získaného od pacientů s aktivní tuberkulosou. Pro přípravu H37Rv knihovny byla izolována genomová DNA M. tuberculosis kmene H37Rv, byla podrobena částečnému trávení Sau3A a byla použita pro konstrukci expresní knihovny za použití Lambda Zap expresního systému (Stratagene, La Jolla, Ca). Tři různé soubory séra, každé obsahující sérum získané od tří jedinců s aktivním plicním nebo pleurálním onemocněním, byly použity při expresním vyšetřování. Soubory byly označeny TbL, TbM a TbH, s ohledem na reaktivitu s H37Ra lyzátem (t.j. TbL = nízká reaktivita, TbM = střední reaktivita a TbH = vysoká reaktivita) v ELISA i imunoblotovém testu. Také byly použity čtyři soubory séra od sedmi pacientů s aktivní plicní tuberkulosou. Žádné sérum nemělo zvýšenou reaktivitu s 38 kDa fosfátovým vazebným proteinem od M. tuberculosis H37Ra.

Všechny soubory byly pre-adsorbovány lyzátem E. coli a byly použity pro vyšetřování H37Ra a H37Rv expresních knihoven, jak je

popsáno v Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Bakteriofágové plaky exprimující imunoreaktivní antigen byly přečištěny. Byly získány fagemidy z plaků a byla odvozena nukleotidová sekvence klonů *M. tuberculosis*.

Bylo přečištěno 32 klonů. Z těchto klonů 31 představuje sekvence, které nebyly dříve identifikovány u lidského *M. tuberculosis*. Reprezentativní sekvence identifikovaných DNA molekul jsou uvedeny v SEQ ID NO: 26 - 51 a 105. Z těchto sekvencí, TbH-8 a TbH-8-2 (SEQ ID NO: 105) jsou nesousedící DNA sekvence ze stejného klonu, a TbH-4 (SEQ ID NO: 43) a TbH-4-FWD (SEQ ID NO: 44) jsou nesousedící sekvence ze stejného klonu. Aminokyselinové sekvence pro antigeny zde identifikované jako Tb38-1, TbH-4, TbH-8, TbH-9 a TbH-12 jsou uvedeny v SEQ ID NO: 88 - 92. Srovnání těchto sekvencí se známými sekvencemi v genové bance za použití databází uvedených výše neukázalo žádnou signifikantní homologii s TbH-4, TbH-8, TbH-9 a TbM-3, ačkoliv byly nalezeny slabé homologie s TbH-9. Bylo zjištěno, že TbH12 je homologní k 34 kDa antigennímu proteinu dříve identifikovanému u *M. paratuberculosis* (Acc. č. S28515). Bylo zjištěno, že Tb38-1 je umístěn 34 párů bazí upstream od otevřeného čtecího rámečku pro antigen ESAT-6 dříve identifikovaný u *M. bovis* (Acc. č. U34848) a u *M. tuberculosis* (Sorensen et al., Infect. Immun. 63: 1710 - 1717, 1995).

Sondy odvozené od Tb38-1 a TbH-9, obě izolované z H37Ra knihovny, byly použity pro identifikaci klonů v H37Rv knihovně. Tb38-1 hybridizovala na Tb38-1F2, Tb38-1F3, Tb38-1F5 a Tb38-1F6 (SEQ ID NO: 112, 113, 116, 118 a 119). (SEQ ID NO: 112 a 113 jsou nesousedící sekvence z klonu Tb38-1F2). V Tb38-1F2 byly odvozeny

dva otevřené čtecí rámečky; jeden odpovídající Tb37FL (SEQ ID NO: 114), druhý, částečná sekvence, může být homologní k Tb38-1 a je nazván Tb38-IN (SEQ ID NO: 115). Odvozená aminokyselinová sekvence Tb38-1F3 je uvedena v SEQ ID NO: 117. TbH-9 sonda identifikovala tři klony v H37Rv knihovně: TbH-9-FL (SEQ ID NO: 106), který může být homologní k TbH-9 (R37Ra), TbH-9-1 (SEQ ID NO: 108) a TbH-9-4 (SEQ ID NO: 110), kde všechny tyto klony jsou těsně příbuzné sekvence k TbH-9. Odvozené aminokyselinové sekvence pro tyto klony jsou uvedeny v SEQ ID NO: 107, 109 a 111.

Výsledky testů na T-buňkách provedených s Tb38-1, ESAT-6 a jinými reprezentativními rekombinantními antigeny jsou uvedeny v tabulkách 4A, B a 5, v příslušném pořadí, dále:

Tabulka 4A - Výsledky proliferace PBMC v odpovědi na reprezentativní solubilní antigeny

Antigen	Dárce										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tb38-1	+++	+	-	-	-	++	-	+	-	++	+++
ESAT-6	+++	+	+	+	-	+	-	+	+	++	+++
TbH-9	++	++	-	++	±	±	++	++	++	++	++

Tabulka 4B - Výsledky produkce interferonu- γ PBMC v odpovědi na reprezentativní solubilní antigeny

Antigen	Dárce										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tb38-1	+++	+	-	+	+	+++	-	++	-	+++	+++
ESAT-6	+++	+	+	+	+	+	-	+	+	+++	+++
TbH-9	++	++	-	+++	±	±	+++	+++	++	+++	++

Tabulka 5 - Souhrn odpovědi T-buněk na reprezentativní antigeny

Antigen	Proliferace			Interferon- γ			celkem
	pac.4	pac.5	pac.6	pac.4	pac. 5	pac.6	
TbH9	++	++	++	+++	++	++	13
TbM7	-	+	-	++	+	-	4
TbH5	-	+	+	++	++	++	8
TbL23	-	+	±	++	++	±	7,5
TbH4	-	++	±	++	++	±	7
kontrola	-	-	-	-	-	-	0

Tyto výsledky naznačují, že oba antigeny *M. tuberculosis* a ESAT-6 podle předkládaného vynálezu mohou indukovat proliferaci a/nebo produkci interferonu- γ v T-buňkách získaných od jedinců imunních vůči *M. tuberculosis*. Podle znalostí vynálezců nebylo o ESAT-6 dříve známo, že by stimuloval imunitní odpověď u lidí.

Tabulka 6 - Výsledky proliferace PBMC v odpovědi na Tb38-1 peptidy

[illegible]

Tabulka 7 - Výsledky produkce interferonu- γ PBMC v odpovědi na Tb38-1 peptidy

Peptid	Pacient												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
pep1	+	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	+
pep2		-	-	-	±	-	-	-	±	±	-	-	+
pep3	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±
pep4	++	-	-	-	-	-	+	-	±	±	-	-	+
pep5	++	±	-	-	-	-	+	-	±	-	-	-	+
pep6	+	++	-	-	-	-	±	-	±	+	-	-	+
kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Příklad 4 - Přečištění a charakterizace polypeptidu z tuberkulinového přečištěného proteinového derivátu

Polypeptid M. tuberculosis byl izolován z tuberkulinového přečištěného proteinového derivátu (PPD) následujícím způsobem.

PPD byl připraven podle publikovaného postupu s některými modifikacemi (Seibert, F. et al., Tuberculin purified protein derivative. Preparation and analyses of large quantity for standart. The American Review of Tuberculosis 44: 9 - 25, 1941).

M. tuberculosis kmen Rv byl kultivován po dobu 6 týdnů v syntetickém mediu ve válcových lahvích při 37 °C. Nádoby obsahující bakteriální kulturu byly potom zahřáty na 100 °C ve vodní páře po dobu 3 hodin. Kultury byly potom sterilně filtrovány za

použití 0,22 μ filtru a kapalná fáze byla koncentrována 20-krát za použití membrány s rozlišovací schopností 3 kDa. Proteiny byly jedenkrát sráženy 50% roztokem síranu amonného a 8-krát 25% roztokem síranu amonného. Vzniklé proteiny (PPD) byly frakcionovány kapalinovou chromatografií na reversní fázi (RP-HPLC) za použití C18 kolony (7,8 x 300 mM; Waters, Milford, MA) v Biocad HPLC systému (Perseptive Biosystems, Framingham, MA). Frakce byly eluovány z kolony lineárním gradientem od 0 - 100% pufru (0,1% TFA v acetonitrilu). Průtok byl 10 ml/minutu a eluent byl monitorován při 214 nm a při 280 nm.

Bylo získáno šest frakcí, byly sušeny, suspendovány v PBS a byly individuálně testovány na morčatech infikovaných *M. tuberculosis* na indukci reakce oddálené přecitlivělosti (DTH). Bylo zjištěno, že jedna frakce indukuje silnou DTH reakci a ta byla dále frakcionována RP-HPLC na microbore Vydac C18 koloně (katalogové č. 218TP5115) na Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Model 172 HPLC. Frakce byly eluovány lineárním gradientem 5 - 100% pufru (0,05% TFA v acetonitrilu) s průtokem 80 μ l/minutu. Eluent byl monitorován při 215 nm. Bylo získáno 8 frakcí a byly testovány na indukci DTH u morčat infikovaných *M. tuberculosis*. Bylo zjištěno, že jedna frakce indukuje silnou DTH s asi 16 mm indurací. Další frakce neindukovaly detekovatelnou DTH. Pozitivní frakce byla podrobena SDS-PAGE gelové elektroforese a bylo zjištěno, že obsahuje jediný proteinový proužek o molekulové hmotnosti přibližně 12 kDa.

Tento polypeptid, zde označený jako DPPD, byl sekvencován z amino konce za použití Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Procise 492 proteinového sekvenátoru jak bylo popsáno výše a bylo zjištěno, že má N-koncovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 129.

Srovnání této sekvence se známými sekvencemi v genové bance jak je popsáno výše neukázalo žádné homologie. Byly izolovány čtyři bromkyanové fragmenty DPPD a bylo zjištěno, že mají sekvence uvedené v SEQ ID NO: 130 - 133.

Schopnost antigenu DPPD stimulovat lidské PBMC k proliferaci a k produkci IFN- γ byla testována způsobem popsaným v příkladu 1. Jak ukazuje tabulka 8, bylo zjištěno, že DPPD stimuluje proliferaci a vyvolává produkci velkých množství IFN- γ ; větších než vyvolává komerční PPD.

Tabulka 8 - Výsledky testu proliferace a produkce IFN- γ v odpovědi na DPPD

Dárce PBMC	Stimulátor	Proliferace (CPM)	IFN- γ (OD ₄₅₀)
A	medium	1,089	0,17
	PPD (komerční)	8,394	1,29
	DPPD	13,451	2,21
B	medium	450	0,09
	PPD (komerční)	3,929	1,26
	DPPD	6,184	1,49
C	medium	541	0,11
	PPD (komerční)	8,907	0,76
	DPPD	23,024	>2,70

Příklad 5 - Syntesa syntetických polypeptidů

Polypeptidy mohou být syntetizovány na Millipore 9050 sytezátoru peptidů za použití FMOC chemikálií s HPTU (o-benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorfosfat) aktivací. Gly-Cys-Gly sekvence může být navázána na amino-konec peptidu pro umožnění konjugace nebo značení peptidu. Odštěpení peptidů ze solidního nosiče může být provedeno za použití následující štěpící směsi: kyselina trifluoroctová:ethandithiol: thioanisol:voda:fenol (40:1:2:2:3). Po štěpení po dobu 2 hodin mohou být peptidy vysráženy v chladném methyl-t-butyl-etheru. Peptidové pelety mohou potom být rozpuštěny ve vodě obsahující 0,1% kyselinu trifluoroctovou (TFA) a mohou být lyofilizovány před přečištěním C18 HPCL na reversní fázi. Gradient 0-60% acetonitrilu (obsahujícího 0,1% TFA) ve vodě (obsahující 0,1% TFA) může být použit pro eluci peptidů. Po lyofilizaci přečištěných frakcí mohou být peptidy charakterizovány za použití elektroprayové hmotové spektrometrie a aminokyselinovou analýzou.

Z předešlého popisu je zřejmé, že ačkoliv byla pro ilustraci popsána specifická provedení vynálezu, mohou být provedeny jejich různé modifikace, bez narušení rozsahu a duchu předkládaného vynálezu.

2. Polypeptid obsahující imunogenní část antigenu M. tuberculosis, nebo variantu uvedeného antigenu, která se liší pouze v konzervativní substituci a/nebo modifikaci, kde uvedený antigen má N-koncovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z:

- (a) Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-His-Gln-Xaa-Asp-Met-Thr-Lys-Gly-Tyr-Tyr-Pro-Gly-Gly-Arg-Arg-Xaa-Phe; (SEQ ID No. 129) and
- (b) Xaa-Tyr-Ile-Ala-Tyr-Xaa-Thr-Thr-Ala-Gly-Ile-Val-Pro-Gly-Lys-Ile-Asn-Val-His-Leu-Val; (SEQ ID No. 137),

kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina.

3. Polypeptid obsahující imunogenní část solubilního antigenu M. tuberculosis, nebo variantu uvedeného antigenu, která se liší pouze v konzervativní substituci a/nebo modifikaci, kde uvedený antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci kodovanou DNA sekvencí vybranou ze skupiny sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 1, 2, 4-10, 13-25, 52, 99 a 101, sekvencí komplementárních k uvedeným sekvencím a DNA sekvencí, které hybridizují na sekvence uvedené v SEQ ID NO: 1, 2, 4-10, 13-25, 52, 99 a 101 nebo jejich komplementární sekvence za podmínek střední přísnosti.

4. Polypeptid obsahující imunogenní část antigenu M. tuberculosis, nebo variantu uvedeného antigenu, která se liší pouze v konzervativní substituci a/nebo modifikaci, kde uvedený antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci kodovanou DNA sekvencí vybranou ze skupiny sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 26-51, sekvencí komplementárních k uvedeným sekvencím a DNA sekvencí, které hybridizují na sekvence uvedené v SEQ ID NO: 26-51 nebo jejich komplementární sekvence za podmínek střední přísnosti.

5. DNA molekula obsahující nukleotidovou sekvenci kodující polypeptid podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4.

6. Expresní vektor obsahující DNA molekulu podle nároku 5.

7. Hostitelská buňka transformovaná expresním vektorem podle nároku 6.

8. Hostitelská buňka podle nároku 7, kde hostitelská buňka je vybrána ze skupiny skládající se z E. coli, kvasinek a savčích buněk.

9. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jeden nebo více polypeptidů podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4 a fyziologicky přijatelný nosič.

10. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo více molekul DNA podle nároku 5 a fyziologicky přijatelný nosič.

11. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo více DNA sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 3, 11 a 12; a fyziologicky přijatelný nosič.

12. Vakcína obsahující jeden nebo více polypeptidů podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4 a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi.

13. Vakcína obsahující:

polypeptid mající N-koncovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se ze sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 134 a 135; a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi.

14. Vakcína obsahující:

jeden nebo více polypeptidů kodovaných DNA sekvencí vybranou ze skupiny skládající se ze SEQ ID NO: 3, 11 a 12, sekvencí komplementárních k uvedeným sekvencím a DNA sekvencí, které hybridizují na sekvence uvedené v SEQ ID NO: 3, 11 a 12; a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi.

15. Vakcína podle nároků 12 až 14, kde nespecifickým zesilovačem imunitní odpovědi je adjuvans.

16. Vakcína obsahující jednu nebo více molekul DNA podle nároku 5 a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi.

17. Vakcína obsahující jednu nebo více DNA sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 3, 11 a 12; a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi.

18. Vakcína podle nároků 16 nebo 17, kde nespecifickým zesilovačem imunitní odpovědi je adjuvans.

19. Způsob pro indukci protektivní imunity u pacienta v y z n a č u j í c í s e t í m, že pacientovi je podán farmaceutický přípravek podle jakéhokoliv z nároků 9 až 11.

20. Způsob pro indukci protektivní imunity u pacienta v y z n a č u j í c í s e t í m, že pacientovi je podána vakcína podle jakéhokoliv z nároků 12 až 18.

21. Fúsní protein obsahující dva nebo více polypeptidů podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4.

22. Fúsní protein obsahující jeden nebo více polypeptidů podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4 a ESAT-6.

23. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje fúsní protein podle nároku 21 nebo 22 a fyziologicky přijatelný nosič.

24. Vakcína obsahující fúsní protein podle nároku 21 nebo 22 a nespecifický zesilovač imunitní odpovědi.

25. Vakcína podle nároku 24, kde nespecifickým zesilovačem imunitní odpovědi je adjuvans.

26. Způsob pro indukci protektivní imunity u pacienta v y z n a č u j í c í s e t í m, že pacientovi je podán farmaceutický přípravek podle nároku 23.

27. Způsob pro indukci protektivní imunity u pacienta v y z n a č u j í c í s e t í m, že pacientovi je podána vakcína podle nároků 24 nebo 25.

28. Způsob pro detekci tuberkulózy u pacienta v y z n a - č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(a) kontaktování kožních buněk pacienta s jedním nebo více polypeptidy podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4; a

(b) detekování imunitní odpovědi kůže pacienta a tak detekování tuberkulózy u pacienta.

29. Způsob pro detekci tuberkulózy u pacienta v y z n a - č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(a) kontaktování kožních buněk pacienta s polypeptidem majícím N-koncovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 134 a 135; a

(b) detekování imunitní odpovědi kůže pacienta a tak detekování tuberkulósy u pacienta.

30. Způsob pro detekci tuberkulósy u pacienta v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) kontaktování kožních buněk pacienta s jedním nebo více polypeptidy kodovanými DNA sekvencí vybranou ze skupiny skládající se ze SEQ ID NO: 3, 11 a 12, sekvencí komplementárních k uvedeným sekvencím a DNA sekvencí, které hybridizují na sekvence uvedené v SEQ ID NO: 3, 11 a 12; a

(b) detekování imunitní odpovědi kůže pacienta a tak detekování tuberkulósy u pacienta.

31. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 28 až 30 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní odpovědí je indurace.

32. Diagnostický kit v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) polypeptid podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4; a

(b) přístroj umožňující kontaktování uvedeného polypeptidu s kožními buňkami pacienta.

33. Diagnostický kit v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) polypeptid mající N-koncovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z sekvencí uvedených v SEQ ID NO: 134

15.07.99

175

a 135; a

(b) přístroj umožňující kontaktování uvedeného polypeptidu s kožními buňkami pacienta.

34. Diagnostický kit v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

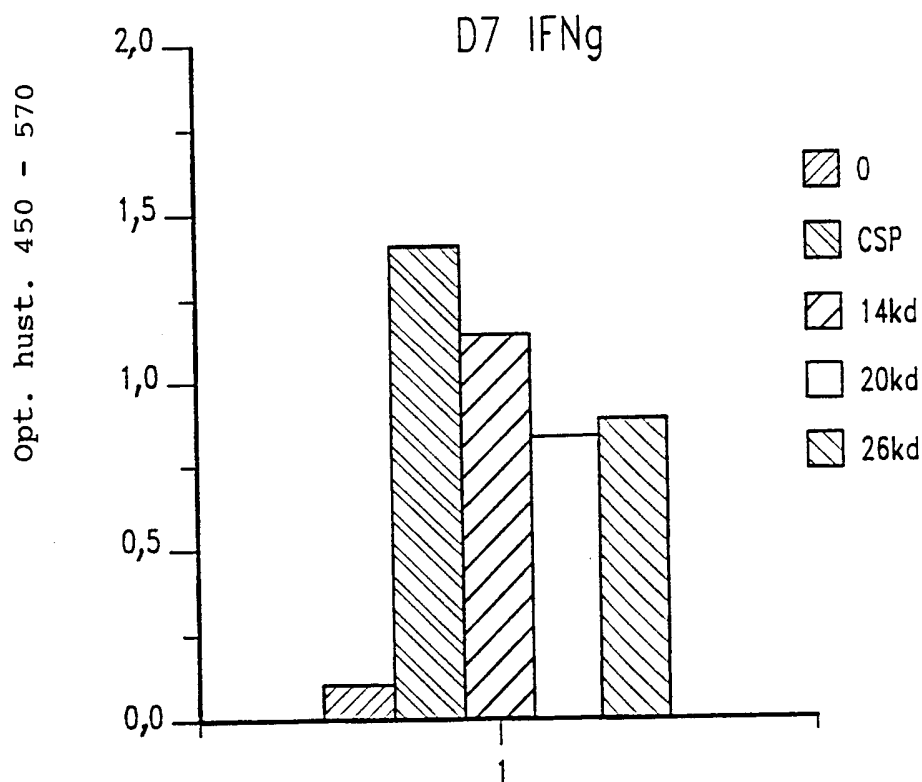
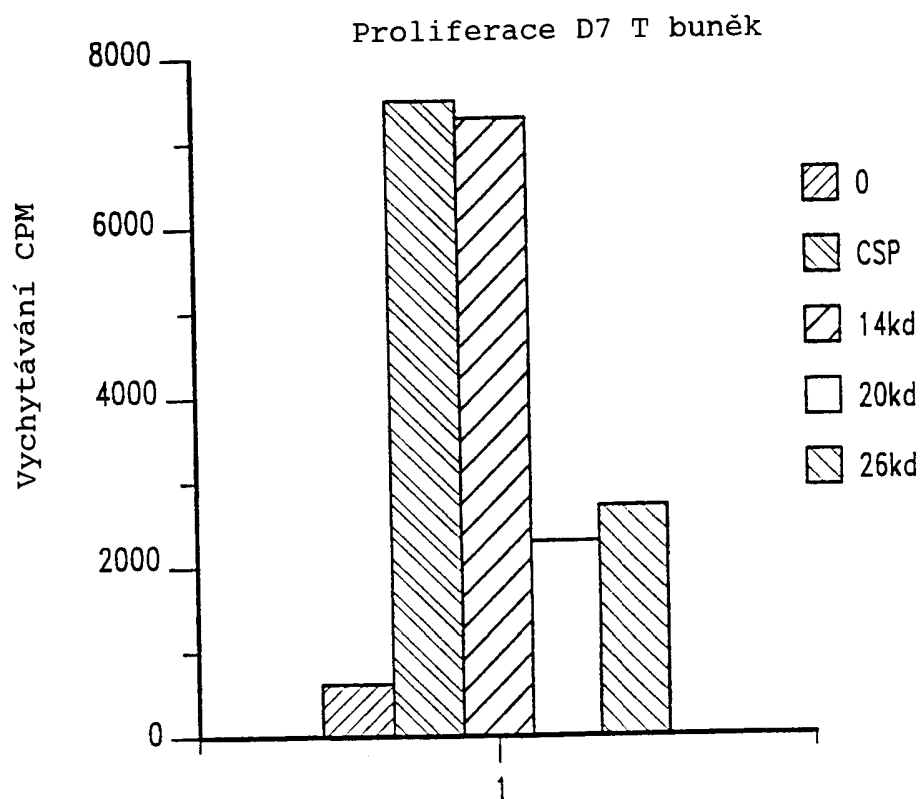
(a) polypeptid kodovaný DNA sekvencí vybranou ze skupiny skládající se ze SEQ ID NO: 3, 11 a 12, sekvencí komplementárních k uvedeným sekvencím a DNA sekvencí, které hybridizují na sekvence uvedené v SEQ ID NO: 3, 11 a 12; a

(b) přístroj umožňující kontaktování uvedeného polypeptidu s kožními buňkami pacienta.

16.07.99

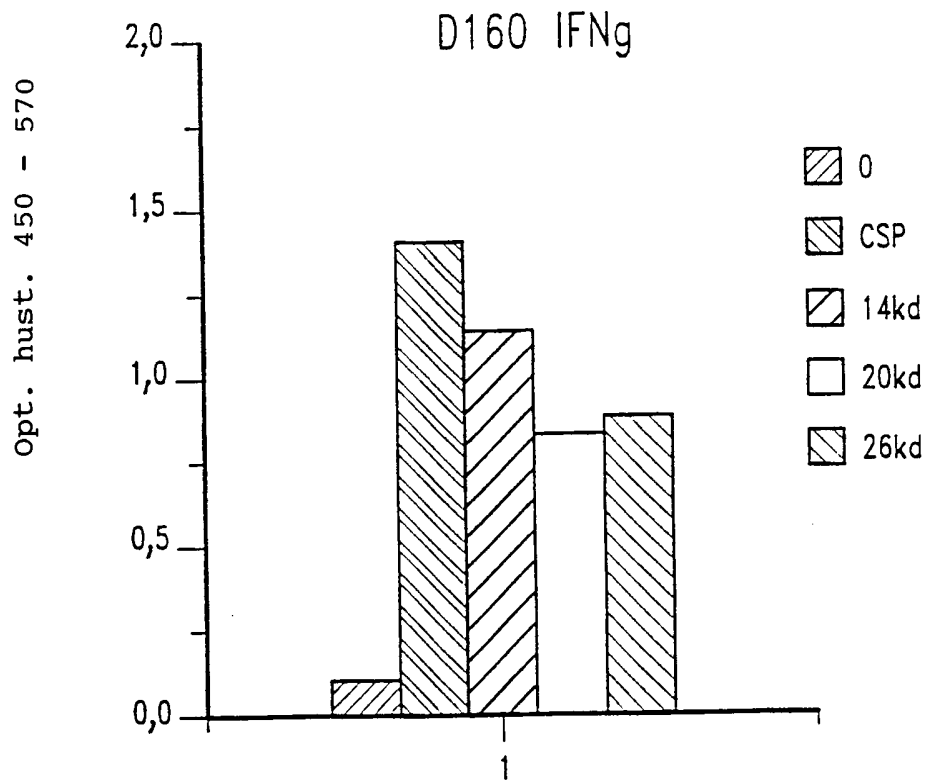
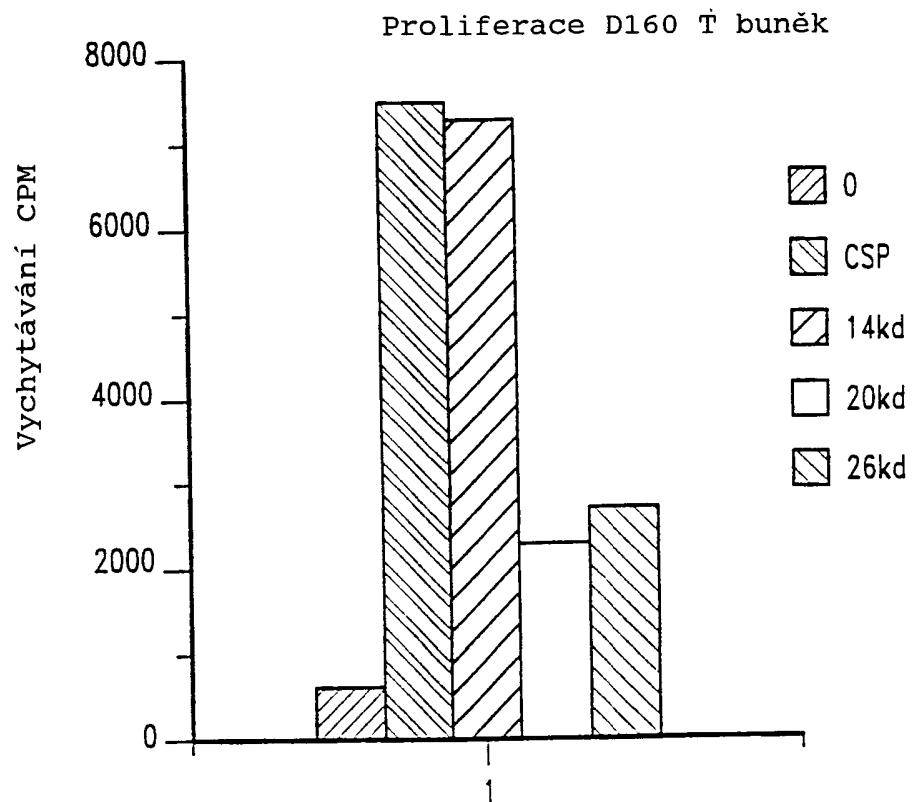
PV628-98

10236



[Signature]

18.07.99



18.07.99

