



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 119228

(13) C2

(51) МПК

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 01068  
(22) Дата подання заявки: 10.07.2013  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.05.2019  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12305825.7, 12306539.3, 13305737.2  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 10.07.2012, 07.12.2012, 03.06.2013  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP, EP, EP  
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.06.2015, Бюл.№ 12  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.05.2019, Бюл.№ 10  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2013/064624, 10.07.2013

(72) Винахідник(и):  
Тюпен Еммануель (SE),  
Міколь Ромен (FR),  
Купе Шарль Антуан (FR),  
Іншопс Женевсьєв (FR),  
Гуанвік Марі (FR),  
Сільвестр Наталі (FR),  
Маршан Жан-Батіст (FR),  
Бені Сесіль (FR)  
(73) Власник(и):  
ТРАНСГЕН СА,  
Parc d'innovation Boulevard Gonthier  
d'Andernach, F-67400 Illkirch Graffenstaden,  
France (FR)  
(74) Представник:  
Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
WO 2009070700 A1, 04.06.2009  
WO 2012057904 A1, 03.05.2012  
WO 2011144951 A1, 24.11.2011  
WO 2006136162 A2, 28.12.2006  
Baldwin S. L. et al. Intradermal immunization improves protective efficacy of a novel TB vaccine candidate. Vaccine, 2009, vol. 27, no. 23, P. 3063-3071  
Houghton Raymond L. et al. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 2002, vol. 9, no. 4, P. 883-891  
Chen Lei et al. The development and preliminary evaluation of a new Mycobacterium tuberculosis vaccine comprising Ag85b, HspX and CFP-10:ESAT-6 fusion protein with CpG DNA and aluminium hydroxide adjuvants. Fems immunology and medical microbiology, 2010, vol. 59, no. 1, P. 42-52  
Andersen P. et al. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. Trends in microbiology, 2007, vol. 15, no. 1, P. 7-13

UA 119228 C2

## (54) ВАКЦИНА НА ОСНОВІ МІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ АНТИГЕНІВ

**(57) Реферат:**

Винахід стосується вектора на основі вірусу віспи або комбінації двох або більше векторів на основі вірусу віспи, який містить одну або більше ніж одну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодують щонайменше 5 мікобактеріальних антигенів, які незалежно отримані з видів роду мікобактерій, де молекула(и) нуклеїнової кислоти кодує щонайменше ESAT-6 (Rv3875), Ag85B (Rv1886) та TB10.4 (Rv0288) активної фази; кодує щонайменше один антиген з фази латентної інфекції, вибраний з групи, що складається з Rv0111, Rv0569, Rv1733с, Rv1807, Rv1813, Rv2029с, Rv2626 і Rv3407; та кодує щонайменше RpfB і RpfD з фази пожвавлення інфекції. Винахід також стосується композиції, що містить вектор на основі вірусу віспи, для застосування для попередження або лікування інфекції мікобактерією, особливо *M. tuberculosis*, або будь-якого захворювання і патологічного стану, викликаного або асоційованого з такою інфекцією мікобактерією.

## Область винаходу

Даний винахід, загалом, належить до нових імуногенних комбінацій, що містять щонайменше п'ять антигенів від видів роду мікобактерій, а також до їх гібридів і молекул нуклеїнових кислот, що кодують такі комбіновані антигени і гібриди, де антигени походять з видів роду мікобактерій, зокрема мікобактерії туберкульозного комплексу, такої як *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Цей винахід також належить до векторів, клітин-господарів і композицій, що містять або кодують зазначені комбінації мікобактеріальних антигенів і злиті поліпептиди, а також до способів їх експресії і отримання. Даний винахід також належить до способів застосування зазначених комбінацій мікобактеріальних антигенів, злитих поліпептидів, векторів, клітин-господарів, композицій, зокрема для індукування або стимулювання імунної відповіді з метою забезпечення захисної відповіді проти інфекції мікобактерією або будь-якого захворювання, викликаного або асоційованого з інфекцією мікобактерією. Даний винахід також належить до антитіл, спрямованих на мікобактеріальні антигени і злиті білки, які застосовують в даному винаході, які можна використовувати у діагностиці мікобактеріальної інфекції, і до діагностичних наборів, що містять зазначені комбінації мікобактеріальних антигенів, злиті поліпептиди, вектори, клітини-господарі та композиції.

## Попередній рівень техніки

Туберкульоз (ТВ) є глобальною і поширеною у всьому світі проблемою із здоров'ям з оцінкою третинною світового населення, зараженого *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (тобто більше ніж двома мільярдами індивідів), і 9-10 мільйонами нових випадків і 2 мільйонами смертей щороку. Бацила *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), збудник ТВ, має кільцевий геном з 4411529 пар основ, який був повністю секвенований у 1998 році (Cole et al., 1998, Nature 393: 537-44). Mtb кодує приблизно 4000 генів; проте, функція і роль більшості з цих генів у життєвому циклі і патогенезі Mtb ще не була з'ясована. Протягом тривалого часу припускали, що упродовж відмінних і послідовних фаз інфекції експресуються окремі набори генів, а саме під час активної фази, з подальшим латентним станом і, при поєднанні умов, фази поживлення, що приводить до нової активної фази. Недавній доказ похитнув цю класичну догму, і в даній області тепер визнають, що має місце певний «витік», тобто експресія генів може відбуватися незалежно від фази, хоча і до різних порогових значень. Крім того, також обговорюється латентна природа Mtb: чи є бактерії, головним чином, такими що покоються, нерепліковними, або чи продовжують вони реплікуватися і іноді навіть тікати з інфікованих клітин у суміжні дихальні шляхи, індукуючи, за допомогою цього, рецидивуючі імунні відповіді? (Ehlers et al., 2009, Infection 37: 87-95).

Зазвичай передача від людини до людини відбувається краплинками у вигляді аерозолі, генерованими людиною, що страждає від легеневого ТВ (активного захворювання). Серед тих, хто інфікований (оціню 30% індивідів, що піддавалися впливу), лише у 5-10% розвиватиметься захворювання активним ТВ у межах 2 років після впливу (що відомо як первинний ТВ). Проте у більшості інфікованих індивідів розвивається латентна інфекція (LTBI), яка може тривати десятиріччями без клінічних ознак або симптомів захворювання. LTBI є станом рівноваги, при якому інфікований суб'єкт здатний контролювати інфекцію, але не повністю усувати бактерії. Реактивація (активний ТВ після віддаленого у часі інфікування) може відбуватися на пізнішій стадії, зокрема у літніх індивідів або у індивідів з ослабленим імунітетом, що відбувається у разі інфекції ВІЛ (вірус імунодефіциту людини) і при лікуванні інгібіторами TNF (чинник некрозу пухлини). Ризик реактивації ТВ упродовж всього життя оцінюється у 10%, і ослаблений імунітет збільшує ризик до 10% протягом року.

Існує декілька доказів, які свідчать про те, що стимуляція клітинної імунної системи відіграє роль у контролі захворювання ТВ (Rook et al. 2007, J Infect Dis 196:191-8). Добре встановлена центральна роль Т-лімфоцитів CD4 у контролі патогену і запобіганні прогресуванню захворювання (приблизно у 90% суб'єктів, інфікованих Mtb). Наприклад, пацієнти з ВІЛ/СНІД (синдром надбаного імунодефіциту людини) з низьким числом Т-клітин CD4<sup>+</sup> більш чутливі до прогресування захворювання ТВ, тоді як противірусне лікування, яке підвищує кількість Т-клітин CD4<sup>+</sup>, зменшує прогресування захворювання ТВ. Однак Т-клітини CD4 не працюють поодиночі і підтримуються Т-клітинами CD8 та іншими підтипами Т-клітин. У даному відношенні досліди з блокаторами чинника некрозу пухлин-альфа (TNFα) і генетичними поліморфізмами, такими як дефекти рецепторів інтерферона-гамма (IFNγ) та інших рецепторів, демонструють важливість конкретних цитокінів і мереж цитокінів у контролі захворювання, маючи на увазі клітинну імунну природу контролю ТВ у людей (Cooper et al., 2009, Annu Rev Immunol 27: 393-422).

Мільйони смертей щороку, викликаних Mtb, є особливо драматичними, зважаючи на те, що існують і широко застосовуються і вакцина (бацила Кальмета-Герена (BCG)), і антибіотики. Проте, якщо BCG, мабуть, є ефективною у попередженні захворювання у новонароджених і дітей, що починають ходити, вона не захищає дорослих і не може запобігати реактивації Mtb у

латентно інфікованих людей. З іншого боку, лікування активного ТВ різними комбінаціями антибіотиків, мабуть, є ефективним, але вимагає суворого дотримання пацієнтом схеми і режиму лікування із щодобовими введеннями різних лікарських засобів упродовж декількох місяців. Крім того, тоді як антибіотики є дуже ефективними проти штамів *Mtb* дикого типу, при  
 5 правильному прийомі, має місце турбуюча швидкість появи штамів *Mtb* із стійкістю до лікарських засобів (наприклад, штамів з «множинною лікарською стійкістю» (MDR), з «широкою лікарською стійкістю» (XDR) і «повністю стійких до лікарських засобів» (TDR)), головним чином, через неправильне дотримання цієї тривалої і витратної схеми лікування лікарськими засобами. Отже, розробка ефективних вакцин проти ТВ є пріоритетом у даному турбуючому контексті, і двома  
 10 головними підходами, які досліджуються протягом останнього десятиріччя, є заміна BCG і бустер BCG. В даний час у клінічних випробуваннях знаходяться більше дванадцяти вакцин-кандидатів (щодо огляду, див. Ottenhoff and Kaufmann, 2012, PLoS 8(5): e1002607). Крім того, зовсім недавно в даній області також почали розглядати використання нових композицій вакцин для допомоги в лікуванні інфекції *Mtb*, так званих «терапевтичних вакцин», що підлягають  
 15 застосуванню як нове окреме лікування або, як альтернатива, для доповнення стандартної терапії, зокрема для лікування проти штамів, стійких до лікарських засобів.

Метою кандидатів на заміну BCG є поліпшення ефективності і безпеки BCG, і вони, головним чином, ґрунтуються на живих ослаблених бактеріях, таких як генетично модифікована BCG або штам *Mtb*, генетично модифіковані для експресії нових наборів антигенів, які відсутні  
 20 у BCG, або для надекспресії антигенів *Mtb*, які експресує BCG, але імовірно на недостатньому рівні, або, крім того, для видалення генів вірулентності та їх регуляторів. У клінічні випробування поступили різні рекомбінантні конструкції BCG для тестування їх здатності замінювати BCG. Найбільш просунута конструкція VPM1002 в даний час знаходиться у Фазі II випробувань і є дефіцитною за уреазою rBCG, яка експресує активований тіолом холестеринзв'язувальний лістеріолізін (hly) з *Listeria monocytogenes*, яка, як було показано, безпечніша, ніж BCG у тварин з ослабленим імунітетом і забезпечує чудовий захист проти  
 25 зараження *Mtb* у мишей (Grobe et al., 2005, J Clin Invest 115: 2472-9). Дві додаткові rBCG нещодавно були зареєстровані для клінічного оцінювання, відповідно, rBCG30, що експресує Ag85B, і AERAS422, що експресує Ag85A, Ag85B і Rv3407, спільно з перфринголізином.

Метою бустер-ін'єкцій BCG є індукування клітинних і/або гуморальних імунних відповідей, і зазвичай вони ґрунтуються на рекомбінантних вакцинах, сконструйованих для надання антигенів ТВ або у вигляді білкової композиції, зазвичай змішаної з потужними ад'ювантами, що активують Th1, або на вірусних експресійних векторах (для огляду див. Thaissa et al., 2010, Yale J. of Biol. and Medicine 83: 209-15; Andersen, 2007, Nature 5: 484 і Kaufman, 2012, Trend in Immunology 241: 1-7). Серед 4000 потенційних антигенів ТВ багато виявилися імуногенними в  
 30 доклінічних моделях.

Одним з найперспективніших кандидатів на основі білка є гібридний білок 1 (H1), який складається з Ag85B, злитого з ESAT-6 (Langermans et al., 2005, Vaccine 23: 2740-50; Dietrich et al., 2007, J. Immunol. 178: 3721-30). Сильну опосередковану IFN $\gamma$  відповідь CD4<sup>+</sup> Th1 спостерігали у людей при введенні ад'юванта IC31 (Van Dissel et al., 2010, Vaccine 28: 3571-81). Зовсім недавно виявили, що ця вакцина підсилює імунні відповіді, раніше індуковані або BCG, або латентною інфекцією *Mtb* (Van Dissel, 2011, Vaccine 29: 2100-9). Інший злитий білок - Нуvac 4 (H4), який складається з Ag85B злитого з TB10.4 (Aagaard et al., PLoS One 4: 1-8), знаходиться у паралельній програмі розробки. Злитий білок M72 GSK, зроблений з Rv1196, вставленого у  
 45 середину сериної протеази Rv0125, демонстрував сприятливий клінічний профіль у показниках безпеки та імуногенності при введенні з різними синтетичними ад'ювантами (Von Eschen et al., 2009, Hum Vaccine 5: 475-82). Також можна згадати так звані злиті білки ID (WO2008/124647), такі як ID83, зроблений з Rv1813, Rv3620 і Rv2608 (Baldwin et al., 2009, Vaccine 27: 3063-71), і ID93, що включає Rv3619, злитий з трьома антигенами ID83 (Bertholet et al., 2010, Sci Transl Med 2(53): 53ra74).

Вакцини проти ТВ на основі вірусних векторів, які тестуються в клінічних випробуваннях, включають модифікований вірус вісповакцини Анкара (MVA), що експресує антиген Ag85A (MVA85A/Aeras-485; WO2006/72787), і аденовірус (Ad) 35 з дефектом реплікації, що експресує антигени Ag85A, Ag85B і TB10.4 (Crucell Ad35/Aeras-402; WO2006/053871). MVA85A виявився імуногенним як у наївних індивідів, так і у індивідів, примірованих BCG, індукуючи сильну  
 55 відповідь Т-клітин CD4<sup>+</sup> (Mc Shane et al., 2004, Nat Med 10: 1240-4; Scriba et al., 2010, Eur J Immunol 40: 279-90), тоді як Aeras-402, мабуть, сприяв відповідям Т-клітин CD8 і відповідям IFN $\gamma$  (Radošević et al., 2007, Infect Immunol 75: 4105-15; Magalhães et al., 2008, PLoS One 3, e3790; Abel et al., 2010 Am J Respir Crit Care Med 181: 1407-17).



Зовсім недавні дослідження тепер сфокусовані на мультифазних композиціях (див., наприклад, WO2008/124647 і WO2011/144951). Деякі з цих вакцин-кандидатів давали в доклінічних і клінічних дослідженнях результати, які демонструють здатність індукувати надійну клітинно-опосередковану імунну відповідь проти Mtb (Thaissa et al., 2010, *Yale J. of Biol. and Medicine* 83: 209-15; Delogu et al., 2009, *J Infect Developing Countries* 3: 5-15). Наприклад, злитий білок H56, що об'єднує Rv2660 латентного Mtb разом з антигенами активної фази Ag85B і ESAT-6, демонстрував потенційно багатообіцяючу бустерну активність відносно BCG, хоча він ще і не досяг клінічних випробувань (Aagaard et al, 2011, *Nature Med* 17: 189-94; Lin et al., 2012, *J Clin Invest* 122: 303-14). Проте дані дослідження підкреслили вплив різних чинників на відповідь Т-клітин і захисну ефективність, таких як дози антигенів (наприклад, Aagaard et al., *PLoS One* 4: 1-8) і шляхи введення (Goonetilleke et al., 2003, *J. Immunol.* 171: 1602-9).

Туберкульоз далекий від контролювання з різних причин: погане дотримання пацієнтом схеми і режиму лікування при використанні прописаного стандартного лікування у регіонах з обмеженими ресурсами, збільшення епідемії ТВ через соінфекцію ВІЛ, погана ефективність вакцинації BCG, яка не ефективна у захисті дорослих. Через зростаючу всесвітню загрозу ТВ і невід'ємну складність інфекції Mtb і імунної відповіді проти мікобактерій, зберігається потреба у поліпшених стратегіях вакцинації для діагностики, попередження і лікування туберкульозу, особливо в ендемічних регіонах.

Даний винахід задовольняє цю та інші потреби за допомогою пропозиції імуногенної комбінації антигенів Mtb, яка пристосована для всіх фаз природного ходу інфекції.

Ця технічна проблема вирішується пропозицією утілень, як визначено у формулі винаходу.

Інші і додаткові аспекти, характеристики і переваги даного винаходу будуть очевидними з наступного опису переважних в даний час утілень винаходу. Ці утілення наведені з метою розкриття.

Короткий виклад суті винаходу

Даний винахід, загалом, належить до імуногенної комбінації, що містить щонайменше 5 різних антигенів або молекул нуклеїнової кислоти, що кодують щонайменше 5 антигенів, де зазначені антигени незалежно отримані з видів мікобактерій, зокрема з видів мікобактерій туберкульозного комплексу, таких як *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Була розроблена система бальної оцінки аналізу даних і використана для класифікації ряду антигенів Mtb на основі їх імуногенності і захисних властивостей. При вирівнюванні послідовностей, за допомогою біохімічних і біоінформаційних прогностичних досліджень вибрали 14 антигенів Mtb і об'єднали у комбінацію антигенів/векторів і злиті поліпептиди.

У одному аспекті винаходу комбінація антигенів за винаходом є мультифазною, де щонайменше 5 мікобактеріальних антигенів походять з двох або трьох фаз природного ходу мікобактеріальної інфекції, а саме активної, латентної фаз і фази пожовтіння. Мікобактеріальні антигени можна використовувати/експресувати у вигляді суміші або в одному або більше ніж одному злитому поліпептиді, як тут описано.

Даний винахід також стосується злитих поліпептидів специфічних мікобактеріальних антигенів, молекул нуклеїнової кислоти і векторів, що кодують/експресують такі злиті поліпептиди, і композицій, що містять або кодують зазначені злиті поліпептиди, а також способів отримання зазначених гібридів, векторів і композицій. Даний винахід також належить до антитіл проти таких мікобактеріальних антигенів і злитих поліпептидів. Він, крім того, належить до застосування таких імуногенних комбінацій, злитих поліпептидів, молекул нуклеїнової кислоти, векторів, композицій або антитіл з метою діагностування, попередження або лікування інфекції мікобактерією або поліпшення стану, асоційованого з інфекцією мікобактерією.

Інший аспект даного винаходу включає спосіб лікування, попередження або інгібування інфекції мікобактерією або поліпшення стану, асоційованого з інфекцією мікобактерією у суб'єкта, що потребує цього, що включає надання або введення даної імуногенної комбінації, злитого поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора або композиції.

Ще один інший аспект даного винаходу стосується способу виклику імунної відповіді у суб'єкта, що потребує цього, що включає надання або введення даної імуногенної комбінації, злитого поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора або композиції з метою індукування або стимулювання імунної відповіді у даного суб'єкта або для попередження або лікування інфекції мікобактерією.

Згідно ще з одним аспектом даного винаходу запропонований набір з частин, що містить ряд контейнерів і інструкції для надання або введення суб'єкту даної імуногенної комбінації, злитого поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора або композиції.

Згідно ще з одним іншим аспектом даного винаходу запропонований набір реактивів для аналізу антитіл для діагностики інфекції мікобактеріями (наприклад, туберкульозу), що містить

дану імуногенну комбінацію, злитий поліпептид, молекулу нуклеїнової кислоти, вектор або композицію.

Комбінація антигенів, запропонована за винаходом, дає поліпшені і несподівані імуногенні властивості (наприклад, рівень, якість і/або масштаб імуногенної відповіді) у порівнянні з індивідуальними антигенами.

Даний винахід особливо корисний у контексті імунотерапії як окреме лікування або як бустер BCG для попереджувальних або терапевтичних цілей в області інфекції мікобактеріями, наприклад, для попередження інфекції Mtb і/або для попередження первинного ТВ, і/або для попередження реактивації у латентно інфікованих суб'єктів. Його також можна використовувати в асоціації із стандартним (наприклад, терапія антибіотиками) або будь-яким іншим новим лікуванням, яке розробляється в даний час (наприклад, маленькі інгібуючі молекули прямої або непрямой дії, антитіла або імунотерапевтичні засоби і т.д.). Даний винахід також корисний в області ветеринарії, наприклад, для зменшення або усунення ризику інфекції мікобактеріями і/або активного захворювання у тварин, особливо при розведенні корів і кіз.

Докладний опис винаходу

Даний винахід, загалом, належить до імуногенної комбінації, що містить щонайменше 5 антигенів з видів мікобактерій або до молекул нуклеїнової кислоти, що кодує щонайменше 5 зазначених антигенів.

Визначення

Терміни у однині в тому вигляді, в якому вони використовуються у всій даній заявці, використовуються в тому сенсі, що вони означають «щонайменше один», «щонайменше перший», «один або більше ніж один» або «ряд» сполук або етапів, на які дається посилання, якщо контекст не диктує іншого.

Термін «і/або» кожний раз, коли він тут використовується, включає значення «і», «або» і «усі або будь-яка інша комбінація елементів, сполучених зазначеним терміном».

Термін «близько» або «приблизно» в тому вигляді, в якому він тут використовується, означає в межах 10%, переважно в межах 8% і переважніше в межах 5% від даного значення або інтервалу.

Терміни «амінокислоти», «залишки» і «амінокислотні залишки» є синонімами і охоплюють природні амінокислоти, а також аналоги амінокислот (наприклад, неприродні, синтетичні і модифіковані амінокислоти, включаючи D або L оптичні ізомери).

Термін «поліпептид» відноситься до полімеру з амінокислотних залишків, який містить щонайменше дев'ять або більше, ніж дев'ять амінокислот, зв'язаних за допомогою ковалентних пептидних зв'язків. Поліпептид може бути лінійним, розгалуженим або циклічним і може містити амінокислоти, що зустрічаються у природі, і/або аналоги амінокислот. Він може бути хімічно модифікований, будучи глікозильованим, ліпідованим, ацетильованим, розщепленим, поперечно зв'язаним дисульфідними зв'язками і/або фосфорильованим, або, крім того, шляхом вмісту додаткових амінокислот, таких як мітка (His, мус, Flag і т.д.) або адресуючого пептиду (сигнальний пептид, трансмембранний домен і т.д.). Буде зрозуміло, що термін «поліпептид» охоплює білки (даний термін зазвичай використовується для поліпептидів, що містять 50 або більше ніж 50 амінокислотних залишків), олігопептиди і пептиди (даний термін зазвичай використовується для поліпептидів, що містять менше, ніж 50 амінокислотних залишків). Кожний поліпептид може, таким чином, характеризуватися специфічними амінокислотами і може кодуватися специфічними послідовностями нуклеїнових кислот.

Терміни «що містить» (і будь-яка форма того що містить, як, наприклад, «містити» і «містить»), «що має» (і будь-яка форма того що має, як, наприклад, «мати» і «має»), «що включає» (і будь-яка форма того що включає, як, наприклад, «включає» і «включати») або «що містить» (і будь-яка форма того що містить, як, наприклад, «містить» і «містять») у тому вигляді, в якому вони тут використовуються, при застосуванні для визначення продуктів, композицій і способів, є такими, що не обмежують і не виключають додаткові, неперераховані елементи або стадії способів. Таким чином, поліпептид «містить» амінокислотну послідовність, коли амінокислотна послідовність може бути частиною кінцевої амінокислотної послідовності поліпептиду. Такий поліпептид може мати аж до декількох сотень додаткових амінокислотних залишків (наприклад, мітку і адресуючі пептиди, як тут згадано). Фраза «що по суті складається з» означає виключення інших компонентів або етапів, які мають якесь істотне значення. Таким чином, композиція, що по суті складається з перерахованих компонентів, не виключала б слідові домішки і фармацевтично прийнятні носії. Поліпептид «по суті складається з» амінокислотної послідовності, коли така амінокислотна послідовність присутня з фактично тільки декількома додатковими амінокислотними залишками. Фраза «що складається з» означає виключення більше ніж слідових елементів інших компонентів або етапів. Наприклад,

поліпептид «складається з» амінокислотної послідовності, коли цей поліпептид не містить будь-яких амінокислот, крім перерахованої амінокислотної послідовності.

Термін «ідентичність» відноситься до відповідності амінокислоти з амінокислотою або нуклеотиду з нуклеотидом між двома поліпептидними послідовностями або послідовностями нуклеїнової кислоти. Процентна частка ідентичності між двома послідовностями є функцією числа ідентичних положень, які мають послідовності, зважаючи на число пропусків, які потрібно вводити для оптимального вирівнювання, і довжину кожного пропуску. У даній області доступні різні комп'ютерні програми і математичні алгоритми для визначення процентної частки ідентичності між амінокислотними послідовностями, такі як, наприклад, програма Blast, доступна в NCBI (Національний центр біотехнологічної інформації), або ALIGN - в Атласі послідовності і структури білка (Dayhoffed, 1981, Suppl., 3: 482-9). Програми для визначення ідентичності між нуклеотидними послідовностями також доступні в спеціалізованих базах даних (наприклад, Genbank, пакет аналізу послідовностей університету Віконсина, програми BESTFIT, FASTA і GAP). Для ілюстративних цілей «щонайменше 80%-на ідентичність» означає 80%-ну, 81%-ну, 82%-ну, 83%-ну, 84%-ну, 85%-ну, 86%-ну, 87%-ну, 88%-ну, 89%-ну, 90%-ну, 91%-ну, 92%-ну, 93%-ну, 94%-ну, 95%-ну, 96%-ну, 97%-ну, 98%-ну, 99%-ну або 100%-ну.

Фраза «зв'язаний функціональним чином» в тому вигляді, як вона тут використовується, означає те, що зв'язані елементи організовані таким чином, що вони узгоджено функціонують у цілях, для яких вони призначені. Наприклад, промотор зв'язаний функціональним чином з молекулою нуклеїнової кислоти, якщо даний промотор здійснює транскрипцію від ініціації транскрипції до термінатора, приводячи до експресії кодуєної послідовності, присутньої в молекулі нуклеїнової кислоти, у пермісивній клітині-господарі.

Терміни «мікобактерія», «види мікобактерій» і «мікобактеріальний» в тому вигляді, як вони тут використовуються, використовуються взаємозамінно для віднесення до будь-якого члена роду *Actinobacteria*, що належить до родини *Mycobacteriaceae*. Дані терміни охоплюють лабораторні штами, а також клінічні ізоляти.

Термін «інфекція мікобактерією» відноситься до впливу на суб'єкта виду мікобактерії, з подальшим заселенням суб'єкта або тканини(ин) суб'єкта даною бактерією. Заселення може викликати серйозні захворювання (наприклад, туберкульоз, лепра, виразка Бурелі і т.д., залежно від мікобактерії) або може не приводити до шкідливих ознак (безсимптомна або латентна інфекція).

Термін «комбінація» в тому вигляді, як він тут використовується, відноситься до будь-якої можливої організації різних компонентів (наприклад, мікобактеріальних антигенів і/або кодуєчих молекул нуклеїнової кислоти). Така організація включає суміш мікобактеріальних антигенів (наприклад, суміш індивідуальних антигенів і/або злиття антигенів) або суміш молекул нуклеїнової кислоти (наприклад, які несуть один або більше ніж один вектор), а також суміш поліпептиду(дів) і молекули(кул) нуклеїнової кислоти. Даний винахід охоплює комбінації, що містять еквімолярні концентрації кожного компонента, а також комбінації з дуже різними концентраціями. Зрозуміло, що оптимальна концентрація кожного компонента мікобактерії може бути визначена фахівцем в даній області.

Термін «імуногенний» відноситься до здатності індукувати або стимулювати вимірну імунну відповідь, опосередковану Т- і/або В-клітинами, у суб'єкта, якому був введений компонент, кваліфікований як імуногенний. Наприклад, антигенна комбінація за винаходом є імуногенною в тому сенсі, що вона здатна індукувати або стимулювати імунну відповідь у суб'єкта, яка може бути природженою і/або специфічною (тобто проти щонайменше одного мікобактеріального антигена/епітопу, що міститься в або який експресують вказаною імуногенною комбінацією), гуморальною і/або клітинною (наприклад, продукція антитіл і/або цитокінів, і/або активація цитотоксичних Т-клітин, В-, Т-лімфоцитів, антигенпрезентуючих клітин, Т-клітин-хелперів, дендритних клітин, NK (натуральний кілер) клітин і т.д.) і зазвичай приводить до захисної відповіді у суб'єкта, якому вона введена. У даній області доступний широкий спектр прямих або непрямих біологічних аналізів для оцінки імуногенної природи компонента або *in vivo* (у тварини або людини), або *in vitro* (наприклад, у біологічному зразку), як тут описано.

Термін «мікобактеріальний антиген» в тому вигляді, як він тут використовується, відноситься до поліпептиду, присутнього в або отриманого з виду мікобактерії, або його фрагмента (наприклад, епітоп), який може бути зв'язаний антитілом або рецептором Т-клітини. Типово такий антиген містить один або більше ніж один епітоп В- і/або Т-клітини, зокрема епітоп(и) CTL (цитотоксичні Т-лімфоцити) або  $T_H$ , або обидва, що бере участь у розпізнаванні конкретним антитілом або рецептором Т-клітини у контексті головного комплексу гістосумісності (МНС). У контексті даного винаходу цей термін охоплює нативний мікобактеріальний поліпептид, а також його фрагмент і модифіковану версію (тобто варіант), як описано нижче.

«Епітоп» відповідає мінімальному пептидному мотиву (зазвичай набору з 8-25 амінокислотних залишків), який утворює сайт, розпізнаваний антитілом, рецептором Т-клітини або молекулою HLA (людський лейкоцитарний антиген). Дані залишки можуть бути послідовними (лінійний епітоп) або ні (конформаційний епітоп, який включає залишки, які не є безпосередньо суміжними один з одним).

Термін «проведення лікування» (і будь-яка форма «проведення лікування», як, наприклад, «лікування», «лікувати») в тому вигляді, як він тут використовується, охоплює профілактику (наприклад, попередження інфікування суб'єкта, схильного до ризику, мікобактерією) і/або терапію (наприклад, суб'єкта, діагностованого як інфікованого мікобактерією). Для лікування потрібне зовнішнє або внутрішнє введення суб'єкту активного агента (наприклад, імуногенної комбінації, злитого поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора і/або описаної тут композиції), зрештою, у асоціації з традиційними терапевтичними діями, особливо діями, використовуваними в даний час для лікування активного захворювання, викликаного мікобактерією (наприклад, ТВ).

Термін «суб'єкт» зазвичай відноситься до хребетного, яке отримувало б користь від індукції або стимуляції імунної відповіді проти виду мікобактерії, і особливо до ссавця, вибраного з групи, що складається зі свійських тварин, сільськогосподарських тварин, спортивних тварин і приматів. Переважно суб'єктом є людина, яка була діагностована як інфікована або схильна до ризику інфікування мікобактерією і особливо *Mtb* і, таким чином, є чутливою до захворювання або стану або схильною до ризику захворювання або стану, викликаного або асоційованого з інфікуванням мікобактерією (наприклад, активного або латентного туберкульозу).

Термін «захисна відповідь» має його звичайне значення, що полягає в тому, що лікування приносить користь суб'єкту, якого лікують, у порівнянні з відповіддю суб'єкта, якого не лікують; наприклад, індукція або стимуляція імунної відповіді, захист від контакту з інфекцією мікобактерією або підвищена стійкість до активного захворювання, або попередження проти реактивації латентної інфекції мікобактерією, або навіть вилікування після розвитку активного захворювання.

Термін «виділений» у тому вигляді, як він тут використовується, відноситься до компонента (наприклад, поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора і т.д.), який видалений з його природного середовища (тобто відокремлений від щонайменше одного іншого компонента(тів), з яким(ми) він асоційований у природі).

Термін «отриманий з», «що походить» або «походити» використовується для ідентифікації початкового джерела компонента (наприклад, поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти), але мається на увазі, що він не обмежує спосіб, яким отриманий компонент, який може бути, наприклад, хімічним синтезом або способами генної інженерії.

#### Види мікобактерій

Як визначено вище, мікобактеріальні антигени, що містить/кодує імуногенна комбінація за винаходом, можуть бути отримані незалежно з будь-якого виду роду *Mycobacterium* (M.), ідентифікованого в даний час. У даній області описане величезне число мікобактерій для застосування у контексті даного винаходу. Типові види мікобактерій включають, без обмеження, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. tuberculosis* (*Mtb*), *M. paratuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. celatum*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. genavense*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. haemophilum*, *M. asiaticum*, *M. malmoeense*, *M. vaccae*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* і *M. shimoidei*.

У переважному утіленні мікобактеріальні антигени, які застосовують в даному винаході, отримують з видів мікобактерій туберкульозного комплексу, які включають ті види, які традиційно розглядаються як такі, що викликають захворювання туберкульоз, а також з видів мікобактерій з оточуючого середовища і опортуністичних видів мікобактерій, які викликають туберкульоз і легеневе захворювання у суб'єктів з ослабленим імунітетом (наприклад, у пацієнтів, інфікованих ВІЛ). Типові види туберкульозного комплексу для застосування тут включають, без обмеження, *M. tuberculosis* (*Mtb*), *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae* і *M. microti*. Переважне утілення спрямоване на *Mtb*, включаючи лабораторні штами *Mtb*, такі як H37Rv і H37Ra, і клінічні ізоляти, такі як KZN4207, T85, CDC1551 (виділені у США), F11 (виділений в Південній Африці), C, K85 (виділені в Нідерландах), CPHL-A, а також ізоляти MDR або XDR, такі як TN5904, Haarlem, KZN1435, Beijing і KZN605. Іншими переважними видами, що є джерелами мікобактеріальних антигенів, є *M. bovis*, *M. bovis* BCG і *M. caprae*, особливо для ветеринарного застосування. Проте, насправді, можна було б чекати перехресну реактивність, зважаючи на високу процентну частку гомології, що існує між видами M на амінокислотному і нуклеотидному рівнях. Наприклад, антигени Rv1733 *Mtb* і *M. bovis* є на 100%

ідентичними, тоді як Rv1733 *M. africanum* має 209 спільних амінокислот з 210 з амінокислотами *Mtb*. Таким чином, імовірно, що комбінація антигенів *Mtb* є корисною для лікування суб'єктів, інфікованих *Mtb* (застосування у людини), *M. bovis*, *M. caprae* (ветеринарне застосування).

Амінокислотні послідовності відповідних мікобактеріальних антигенів і кодуєчі нуклеотидні послідовності легко доступні у спеціалізованих банках даних (і в літературі. Наприклад, послідовності *Mtb* можна знайти в Cole et al. (1998, Nature 393: 537) або на веб-сайтах, таких як сайти, підтримувані Wellcome Trust Sanger Institute, Institut Pasteur та іншими (наприклад, база даних TB (@tbdb.org) і tuberculist (@tuberculist.epfl.ch)). Однак даний винахід не обмежується даними типовими видами мікобактерій. Насправді, нуклеотидні і амінокислотні послідовності можуть відрізнятися між різними ізолятами і штамми, і ця природна генетична мінливість включена до об'єму винаходу, а також модифікація(ції), що не зустрічається(ються) у природі, такі як модифікації, описані нижче.

Імуногенна комбінація

Фраза «щонайменше п'ять» в тому вигляді, як вона тут використовується, включає інтервал від 5 до 50 (тобто 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 і т.д.), бажано від 5 до 33, переважно від 7 до 20 і переважніше від 8 до 18, з особливою перевагою для 10-15 (наприклад, 12, 13 або 14). Переважно комбінація за даним винаходом містить приблизно від 10 до 15 антигенів *Mtb* або відповідних молекул нуклеїнової кислоти.

У контексті даного винаходу «щонайменше 5 мікобактеріальних антигенів» відрізняються один від одного (наприклад, можна використовувати численні копії того самого мікобактеріального антигена, за умови, що дана комбінація містить/кодує щонайменше 5 різних мікобактеріальних антигенів).

Альтернативно або додатково, кожний з щонайменше 5 мікобактеріальних антигенів може бути нативним мікобактеріальним антигеном (наприклад, повнорозмірним антигеном) або його модифікованою версією (фрагментом або варіантом).

«Нативний» мікобактеріальний антиген можна виявляти, виділяти, отримувати з джерела у вигляді мікобактерії, що зустрічається у природі. Такі джерела включають біологічні зразки (наприклад, кров, плазма, сироватка, слина, мокрота, зрізи тканин, зразки біопсії і т.д.), відібрані у суб'єкта, який інфікований або піддавався впливу мікобактерії, клітини, які культивують, а також рекомбінантні матеріали, доступні у депозитаріях (наприклад, у депозитаріях АТСС (Американська колекція типових клітинних культур) або ТВ), бібліотеках або описані в літературі (наприклад, ізоляти мікобактерій, геноми мікобактерій, фрагменти геному, геномні РНК або кДНК, а також будь-яка плазмідна і вектор, для яких в даній області відомо, що вони включають такі елементи).

Модифікований мікобактеріальний антиген (наприклад, варіант) типово відрізняється від поліпептиду, конкретно розкритого тут, або нативного поліпептиду в одному або більше ніж одному положенні. Можна розглядати будь-яку модифікацію(ції), включаючи заміну, вставку, приєднання і/або делецію одного або більше ніж одного амінокислотного залишку, відсутні у природі структури і будь-яку комбінацію цих можливостей. Амінокислотна заміна може бути консервативною або неконсервативною. При розгляді декількох модифікацій вони можуть стосуватися послідовних залишків і/або непослідовних залишків. Модифікацію(ції) можна отримувати цілим рядом способів, відомих фахівцям в даній області, такими як сайт-спрямований мутагенез (наприклад, з використанням системи мутагенезу *in vitro* Sculptor™ від Amersham, Les Ulis, Франція), ПЛР(полімеразна ланцюгова реакція)-мутагенез, перестановка в ДНК і синтетичні методики (наприклад, такі що приводять до отримання синтетичної молекули нуклеїнової кислоти, що кодує бажаний варіант поліпептиду).

Яким би не було їх походження (природним або модифікованим), краще, щоб кожний з мікобактеріальних антигенів, що міститься в або кодований імуногенною комбінацією за винаходом, зберігав одну або більше ніж одну імуногенну частину відповідного нативного антигена, що включає епітоп(пи) В- і/або Т-клітин. Способи ідентифікації таких релевантних імуногенних частин добре відомі в даній області. Наприклад, епітопи Т-клітин можна ідентифікувати за допомогою застосування біологічних аналізів (наприклад, аналізів IFN $\gamma$  з використанням бібліотек синтетичних олігопептидів, що перекриваються) або доступних програм прогнозування.

В одному утіленні імуногенна комбінація за даним винаходом містить або кодує мікобактеріальні антигени з щонайменше 2 різних фаз інфекції, вибраних з групи, що складається з активної фази, фази пожвавлення і латентної фази (наприклад, активної фази і фази пожвавлення, активної і латентної фаз або фази пожвавлення і латентної фази). Переважна комбінація є «мультифазною», такою, що містить або кодує мікобактеріальні

антигени, і особливо антигени Mtb, з трьох фаз інфекції, з щонайменше одним антигеном з фази активної інфекції, щонайменше одним антигеном з фази поживлення інфекції і щонайменше одним антигеном з фази латентної інфекції.

«Антигени активної фази» типово є набором білків, які, головним чином, експресуються при активному зростанні і реплікації мікобактерії *in vivo*. Величезне число мікобактеріальних антигенів активної фази для застосування в даному винаході описане в літературі (наприклад, Bertholet et al., 2008, J. Immunol. 181: 7948-57; Bertholet and al., 2010, Sci Transl Med 2: 53ra74). Особливо відповідний антиген(ни) активної фази вибраний(ні) з групи, що складається з ESAT-6 (Rv3875), CFP-10 (Rv3874), TB10.4 (Rv0288), Ag85A (Rv3804), Ag85B (Rv1886), Rv3619, Rv3620, білків родини PPE Rv3478 і Rv2608 і будь-якої їх комбінації. Переважна імуногенна комбінація містить або кодує щонайменше ESAT-6 (Rv3875), Ag85B (Rv1886) і TB10.4 (Rv0288).

«Антигени латентної фази», головним чином, експресуються протягом фази спокою (або латентної фази) інфекції мікобактерією, оборотного стану низької метаболічної активності, при якому мікобактерія може зберігатися протягом тривалих періодів. У літературі описане величезне число мікобактеріальних антигенів латентної фази для застосування в даному винаході. Типовими антигенами Mtb латентної фази є антигени, які кодує регулон DosR, який опосередковує відповідь бактерій на гіпоксію, і антигени голодування, які піддаються підвищувальній регуляції при вичерпанні живильних речовин (Voskuil et al., 2003, J. Exp Med 198: 705-13; Leyten et al., 2006, Microbes Inf. 8: 2052-60; Roupie et al., 2007, Infection and Immunity 75: 941-9; Black et al., 2009, Clin Vaccine Immunol 16: 1203-12; Schuck et al., 2009, PLoS One 4: e5590; Vipond et al., 2006, Vaccine 24: 6340-50; Vipond et al., 2007, Tuberculosis 86: 218-24; Bertholet et al., 2008, J. Immunol. 181: 7948-57; Bertholet et al., 2010, Sci Transl Med 2: 53ra74; Mollenkopf et al., 2004, Infect Immun 72: 6471-9); WO03/000721; WO03/004520; WO03/035681; WO2004/006952 і WO2006/104389). Особливо відповідний(ні) антиген(ни) латентної фази вибраний(ні) з групи, що складається з Rv0081, Rv0111, Rv0198, Rv0569, Rv1733c, Rv1735, Rv1737, Rv1806, Rv1807, Rv1813, Rv2005c, Rv2029c, Rv2032, Rv2626, Rv2627, Rv2628, Rv2660c, Rv3407 і Rv3812, і Rv3478 і будь-якої їх комбінації; і переважніше - з групи, що складається з Rv0111, Rv1733, Rv2029 і Rv2626, або з Rv0569, Rv1807, Rv1813, Rv3407 і Rv3478, або з як Rv0111, Rv1733, Rv2029, Rv2626, Rv0569, Rv1807, Rv1813, Rv3407, так і Rv3478.

«Антигени фази поживлення» відносяться до будь-якого антигена, який експресують або такого, що бере участь, головним чином, у переході між станом спокою і активним зростанням та реплікацією (активний стан інфекції мікобактерією). Антигени фази поживлення для застосування в даному винаході описані в літературі (наприклад, Mukamolova et al., 2002, Mol Microbiol 46: 623-35; Yeremeev et al., 2003, Infection and Immunity 71: 4789-94; Mukamolova et al., 2006, Mol Microbiol 59: 84-98; Tufariello et al., 2006, Infect Immun 74: 2985-95; Biketov et al., 2007, MMC Infect Dis 7: 146; Kana et al., 2008, Mol Microbiol 67: 672-84; Kana et al., 2009, FEMS Immunol Med Microbiol 58: 39-50; Russel-Goldman et al., 2008, Infect Immun 76: 4269-81; Gupta et al., 2010, Microbiol 156: 2714-22 і Commandeur et al., 2011, Clin Vaccine Immunol. 18: 676-83). Особливо відповідний(ні) антиген(ни) фази поживлення вибраний(ні) з групи, що складається з RpfA, RpfB, RpfC, RpfD і RpfE, і будь-якої їх комбінації. Переважна імуногенна композиція містить або кодує щонайменше RpfB і RpfD (наприклад, їх імуногенний фрагмент).

У переважному утіленні імуногенна комбінація за даним винаходом містить або кодує щонайменше 5 мікобактеріальних антигенів, вибраних з групи, що складається з ESAT-6 (Rv3875), CFP-10 (Rv3874), TB10.4 (Rv0288), Ag85A (Rv3804), Ag85B (Rv1886), Rv3619, Rv3620, RpfA, RpfB, RpfC, RpfD, RpfE, Rv0081, Rv0111, Rv0198, Rv0569, Rv1733c, Rv1735, Rv1737, Rv1806, Rv1807, Rv1813, Rv2005c, Rv2029c, Rv2032, Rv2626, Rv2627, Rv2628, Rv2660c, Rv3407, Rv3478 і Rv3812; переважно з групи, що складається з ESAT-6 (Rv3875), TB10.4 (Rv0288), Ag85B (Rv1886), RpfB, RpfD, Rv0111, Rv0569, Rv1733c, Rv1807, Rv1813, Rv2029c, Rv2626, Rv3407 і Rv3478; і переважніше з групи поліпептидів, що містять амінокислотні послідовності, показані в SEQ ID NO: 1-14 або будь-якому їх варіанті або фрагменті.

З ілюстративною метою SEQ ID NO: 1 представляє амінокислотну послідовність Rv0111; SEQ ID NO: 2 - амінокислотну послідовність TB10.4; SEQ ID NO: 3 - амінокислотну послідовність Rv0569; SEQ ID NO: 4 - амінокислотну послідовність RpfB; SEQ ID NO: 5 - амінокислотну послідовність Rv1733; SEQ ID NO: 6 - амінокислотну послідовність Rv1807; SEQ ID NO: 7 - амінокислотну послідовність Rv1813; SEQ ID NO: 8 - амінокислотну послідовність Ag85B; SEQ ID NO: 9 - амінокислотну послідовність Rv2029; SEQ ID NO: 10 - амінокислотну послідовність Rv2626; SEQ ID NO: 11 - амінокислотну послідовність Rv2839c; SEQ ID NO: 12 - амінокислотну послідовність Rv3407; SEQ ID NO: 13 - амінокислотну послідовність Rv3478, і SEQ ID NO: 14 - амінокислотну послідовність ESAT-6.

Кожний модифікований мікобактеріальний антиген, який може розглядатися у контексті даного винаходу, містить одну або більше ніж одну модифікацію по відношенню до природного еквівалента, і особливо одну або більше ніж одну модифікацію, яка є корисною для синтезу, процесингу, стабільності і/або розчинності поліпептиду, що утворюється, і/або його імуногенності. Відповідні приклади відповідних модифікацій включають, без обмеження, (а) делецію внутрішньої сильно гідрофобної області(тей), (б) делецію N-кінцевого сигнального пептиду (заміну на гетерологічний сигнальний пептид, якщо це необхідно) і/або (в) делецію незгорнутої області, яка може надавати негативного впливу на стабільність, імуногенність і рекомбінантну експресію, і/або (г) делецію або мутацію каталітичного домена для усунення біологічної активності.

Особливо відповідна імуногенна композиція містить або кодує мікобактеріальні антигени, вибрані з групи поліпептидів, що містять амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 15-24. Конкретніше, SEQ ID NO: 15 представляє антиген Rv0111 (Rv0111\*), модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції гідрофобної N-кінцевої частини (від першого залишку до приблизно положення 393). SEQ ID NO: 16 представляє антиген RpfB, модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції сигнального пептиду (від першого залишку до приблизно залишку в положенні 29 і шляхом делеції каталітичного домена, таким чином, зберігаючи RpfB від приблизно положення 30 до положення 283). SEQ ID NO: 17 представляє антиген Rv1733 (Rv1733\*), модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції N-кінцевого прогнозованого TM домена (від першого залишку до приблизно положення 61). SEQ ID NO: 18 представляє антиген Rv1807 (Rv1807\*), модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції незгорнутої C-кінцевої частини (приблизно останні 60 залишків). SEQ ID NO: 19 представляє антиген Rv1813 (Rv1813\*), модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції N-кінцевого сигнального пептиду (від першого залишку до приблизно положення 34). SEQ ID NO: 20 представляє Ag85B (Ag85B\*), модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції N-кінцевого сигнального пептиду (від першого залишку до приблизно положення 39). SEQ ID NO: 21 представляє антиген Rv2029 (Rv2029\*), модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції C-кінцевої частини (приблизно останні 25 залишків) і який мутував у положенні 265 для усунення ферментативної активності Rv2029 (наприклад, D265N; Cabrera et al., 2010, Arch Biochem Biophys 502: 23-30). SEQ ID NO: 22 представляє антиген RpfD, модифікований по відношенню до природного еквівалента так, щоб він зберігав каталітичний домен (також іменований LD - домен лізоциму), з трьома мутаціями, націленими на усунення асоційованої ферментативної активності (наприклад, E292K, T315A і Q347A), і делецією останніх 7 залишків. SEQ ID NO: 23 представляє антиген Rv3407 (Rv3407\*), модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції незгорнутої C-кінцевої частини (приблизно останні 33 залишки). SEQ ID NO: 24 представляє антиген Rv3478 (Rv3478\*), модифікований по відношенню до природного еквівалента шляхом делеції незгорнутої C-кінцевої частини (приблизно останні 40 залишків).

У переважному утіленні імуногенна комбінація за винаходом містить або кодує щонайменше 5 мікобактеріальних антигенів, що демонструють щонайменше 80%-ну ідентичність (наприклад, 80%-ну, 85%-ну, 90%-ну, 92%-ну, 94%-ну, 95%-ну, 96%-ну, 97%-ну, 98%-ну, 99%-ну або 100%-ну ідентичність) з викладеною тут амінокислотною послідовністю по всій довжині повнорозмірного поліпептиду або його фрагмента (наприклад, фрагмента з 50 послідовних амінокислотних залишків або більше, як, наприклад, 60, 75, 80 або, крім того, 90 амінокислотних залишків), і особливо щонайменше 5 антигенів Mtb, вибраних з групи поліпептидів, що містять амінокислотну послідовність, щонайменше на 80% гомологічну або ідентичну будь-якій з SEQ ID NO: 1-24 (з або без Met, що ініціює).

У більш переважному утіленні імуногенна комбінація за винаходом містить або експресує щонайменше Rv0111 з конкретною перевагою відносно Rv0111\*, як проілюстровано в SEQ ID NO: 15.

У навіть переважнішому утіленні імуногенна комбінація за винаходом містить або експресує щонайменше Rv0111, Rv2626, RpfB, RpfD, Tb10.4 і Ag85B, і з конкретною перевагою відносно Rv0111\*, як проілюстровано в SEQ ID NO: 15, Rv2626, як проілюстровано в SEQ ID NO: 10, RpfB, як проілюстровано в SEQ ID NO: 16, RpfD, як проілюстровано в SEQ ID NO: 22, Tb10.4, як проілюстровано в SEQ ID NO: 2 і Ag85B, як проілюстровано в SEQ ID NO: 20.

Як згадано вище, імуногенна комбінація за даним винаходом охоплює будь-яку конфігурацію мікобактеріальних антигенів і/або молекул кодувочої нуклеїнової кислоти, що її складають. Отже, імуногенна комбінація за винаходом може містити або кодувати мікобактеріальні антигени у вигляді окремих поліпептидів (наприклад, суміш рекомбінантно продукованих антигенів Mtb) або

у вигляді одного або більше ніж одного злитого поліпептиду (ковалентне зв'язування щонайменше двох мікобактеріальних антигенів) або як окремий антиген(ни), так і гібрид(и).

Так само, комбінація молекул нуклеїнової кислоти охоплює або окремі молекули нуклеїнової кислоти, або ковалентно зв'язані молекули нуклеїнової кислоти (наприклад, нуклеїнові кислоти, що кодують гібриди), або і окремі, і злиті молекули нуклеїнової кислоти, які може нести один або більше ніж один вектор. Зважаючи на число мікобактеріальних антигенів (від 5 аж до 50), переважна комбінація містить один або більше ніж один вектор, що кодує гібридні антигени, як описано нижче. Для експресії різних мікобактеріальних антигенів або гібрида, як тут описано, у комбінації векторів може використовуватися той самий тип векторів (наприклад, два MVA) або різні типи векторів (наприклад, плазмідна ДНК і MVA).

Злитий поліпептид

Згідно з іншим аспектом у даному винаході також запропоновані виділені злиті поліпептиди, що містять два або більше ніж два мікобактеріальних антигена, що містяться або кодуються імуногенною комбінацією за винаходом, а також композиції, що містять такі злиті поліпептиди.

Терміни «гібрид», «злиття» або «злитий поліпептид» у тому вигляді, як вони тут використовуються, відносяться до ковалентного зв'язування в одному поліпептидному ланцюзі двох або більше ніж двох поліпептидів, і воно здійснюється генетичними способами, тобто злиттям у рамці зчитування молекул нуклеїнової кислоти, що кодують кожний з зазначених поліпептидів. Під «злитим у рамці зчитування» мається на увазі те, що експресія злитих кодуючих послідовностей приводить до одного поліпептиду без будь-якого термінатора трансляції між кожним із злитих поліпептидів. Злиття може бути прямим (тобто без будь-яких додаткових амінокислотних залишків між ними) або непрямим (наприклад, через лінкер між злитими поліпептидами) і може відбуватися на N- або C-кінці поліпептиду або в його внутрішній частині. Присутність лінкера може полегшувати правильне згортання і/або функціонування злитого поліпептиду. Даний винахід не обмежується виглядом, розміром або числом використовуваних лінкерних послідовностей. Для ілюстрації, типові лінкери мають довжину 3-30 амінокислот і складаються з повторів амінокислотних залишків, таких як гліцин, серин, треонін, аспарагін, аланін і/або пролін.

Аналогічно вищезазначеному, мікобактеріальні антигени, які складають злитий поліпептид за винаходом, можуть бути нативними і/або їх модифікованими (варіантами), і/або фрагментом(ами), як описано вище. Така комбінація мікобактеріальних антигенів для застосування у формі злитого поліпептиду може давати покращену імуногенність у порівнянні з такою ж комбінацією антигенів, використовуваних у суміші окремих антигенів (або експресійних векторів).

Переважно злитий поліпептид за винаходом містить щонайменше два (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6 і т.д.) мікобактеріальних антигена, як тут описано, і переважно щонайменше 2 поліпептида вибрані з групи поліпептидів, що містять амінокислотну послідовність, щонайменше на 80% (наприклад, на 98 або 100%) ідентичну будь-який SEQ ID NO: 1-24.

В одному утіленні злитий поліпептид за винаходом містить мікобактеріальні антигени тієї самої фази інфекції. Типове злиття антигенів Mtb латентної фази включає Rv2029, Rv2626, Rv1733 і Rv0111; типове злиття антигенів Mtb активної фази включає Ag85B, TB10.4 і ESAT6; і типове злиття антигенів Mtb фази пожвавлення включає антигени RpfB і RpfD.

В іншому утіленні злитий поліпептид за винаходом містить мікобактеріальні антигени з 2 різних фаз інфекції або навіть з активної фази, фази пожвавлення і латентної фази. Типові злиття даного типу включають, без обмеження, гібрид антигенів Mtb латентної і активної фази, що включає Rv2029, TB10.4, ESAT-6 і Rv0111; гібрид антигенів Mtb фази пожвавлення і активної фази, що включає RpfB, RpfD, Ag85B, TB10.4 і ESAT-6, а також гібрид антигенів Mtb латентної фази, фази пожвавлення і активної фази, що включає Ag85B, Rv2626, RpfB, -RpfD і Rv1733.

У переважному утіленні злитий поліпептид за винаходом вибраний з групи, що складається з наступних:

- злитий поліпептид, що містить антиген Mtb Rv0111 (з конкретною перевагою відносно Rv0111, як проілюстровано у SEQ ID NO: 15);

- злитий поліпептид, що містить антигени Mtb Rv2029, Rv2626, Rv1733 і Rv0111;

- злитий поліпептид, що містить антигени Mtb Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807;

- злитий поліпептид, що містить антигени Mtb Ag85B, TB10.4 і ESAT6;

- злитий поліпептид, що містить антигени Mtb RpfB і RpfD (наприклад, як проілюстровано так званим RPFB-Dhyb, який є злиттям між антигеном RpfB з делецією LD і доменом LD RpfD з мутацією, що знімає ферментативну активність);

- злитий поліпептид, що містить антигени Mtb RpfB, RpfD (наприклад, RPFB-Dhyb), Ag85B, TB10.4 і ESAT6;



- злитий поліпептид, що містить антигени Mtb Ag85B, Rv2626, RpfB, RpfD (наприклад, RPFb-Dhyb) і Rv1733;

- злитий поліпептид, що містить антигени Mtb Rv2029, TB10.4, ESAT6 і Rv0111; і

- злитий поліпептид, що містить антигени Mtb Ag85B, Rv2626 і Rv1733.

5 У контексті даного винаходу мікобактеріальні антигени, ідентифіковані у типових злитих поліпептидах, можуть знаходитися у будь-якому порядку від N- до C-кінця і не обов'язково в перерахованому порядку. Таким чином, злиття, що охоплює антигени Mtb Ag85B, Rv2626 і Rv1733, охоплює Ag85B-Rv1733-Rv2626; Rv1733-Rv2626-Ag85B; Rv1733-Ag85B-Rv2626; Rv2626-Ag85B-Rv1733; Rv2626-Rv1733-Ag85B і Ag85B-TB10.4-Rv2626-Ag85B і т.д. гібриди, крім перерахованого гібрида Ag85B-Rv2626-Rv1733.

10 Крім мікобактеріальних антигенів, імуногенна комбінація і/або злитий поліпептид за винаходом можливо може містити інші компоненти, які можуть походити з видів мікобактерій (наприклад, додатковий мікобактеріальний антиген(ни)) або є гетерологічними (тобто з джерела, відмінного від мікобактерії). Такий додатковий компонент(ти) може бути імуногенним або неімуногенним. Типові додаткові компоненти включають, без будь-якого обмеження, пептидну мітку(ки), адресуючий пептид(ди), домен(ни) олігомеризації, імуноактивуючий пептид(ди)/поліпептид(ди) і молекулу(ли) нуклеїнової кислоти, що кодує такий елемент(ти) і т.д.

В одному утіленні будь-який мікобактеріальний антиген(ни), присутній в або кодований імуногенною комбінацією, або злитий поліпептид за винаходом, може бути зв'язаний функціональним чином з адресуючими пептидами, такими як сигнальні і/або трансмембранні пептиди. Такі адресуючі пептиди добре відомі в даній області (див., наприклад, WO99/03885). Коротко, сигнальні пептиди (SS) зазвичай присутні на N-кінці присутніх у мембрані або секретованих поліпептидів, і ініціюють їх надходження в ендоплазматичний ретикулум (ER). Вони містять 15 або більше ніж 15 по суті гідрофобних амінокислот, які потім видаляються специфічною локалізованою у ER ендопептидазою з утворенням зрілого поліпептиду. Трансмембранні пептиди (TM) зазвичай є сильно гідрофобними за природою і слугують для закорювання поліпептидів у клітинній мембрані. Вибір трансмембранних і/або сигнальних пептидів, які можна використовувати в контексті даного винаходу, величезний. Вони можуть бути отримані з будь-якого закорюваного в мембрані і/або секретованого поліпептиду (наприклад, клітинного або вірусного поліпептиду), такого як поліпептиди імуноглобулінів, тканинного активатора плазміногена (tPA), інсуліну, глікопротеїну вірусу сказу, глікопротеїну оболонки вірусу ВІЛ або білка F вірусу кору, або можуть бути синтетичними. Переважним сайтом вставки сигнального пептиду є N-кінець нижче від кодону ініціації трансляції, і переважним сайтом вставки трансмембранного пептиду є C-кінець, наприклад, безпосередньо вище від термінатора.

35 Альтернативно або додатково, будь-який мікобактеріальний антиген(ни), присутній або кодований імуногенною комбінацією, або злитий білок за винаходом може бути зв'язаний функціональним чином з пептидними мітками для того, щоб полегшувати його виділення і детекцію або для полегшення ідентифікації клітин-господарів, що експресують такий антиген або гібрид. У контексті даного винаходу можна використовувати широкий спектр пептидних міток, включаючи, без обмеження, мітку PK, мітку FLAG (SEQ ID NO: 25), мітку MYC (SEQ ID NO: 26), полігістидинову мітку (зазвичай відрізок з 5-10 залишків гістидину; наприклад, SEQ ID NO: 27). Пептидні мітки можна детектувати імунодетектуючими аналізами з використанням антитіл проти мітки, як описано у доданих прикладах. Пептидна мітка(ки) може бути незалежно розташована на N-кінці мікобактеріального антигена або гібрида (мітка-поліпептид) або, як альтернатива, на його C-кінці (поліпептид-мітка), або, як альтернатива, у внутрішній частині, або в будь-якому з даних положень при використанні декількох міток.

Альтернативно або додатково, будь-який мікобактеріальний антиген(ни), присутній або кодований імуногенною комбінацією, або злитий поліпептид за винаходом може бути зв'язаний функціональним чином з одним або більше ніж одним імуноактивуючим пептидом/поліпептидом, здатним підсилювати імуногенні властивості. Можна згадати, наприклад, кальретикулін (Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108: 669), білок теплового шоку 70 Mtb (HSP70) (Chen et al., 2000, Cancer Res. 60: 1035), убіквітин (Rodriguez et al., 1997, J. Virol. 71: 8497) і епітоп(пи) Т-хелперів, такий як пептид Pan-Dr (Sidney et al., 1994, Immunity 1: 751), епітоп pstS1 GCG (Vordermeier et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22: 2631), пептиди P2TT правцевого анатоксину (Panina-Bordignon et al., 1989, Eur. J. Immunol. 19: 2237), P30TT (Demotz et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23: 425), епітоп гемаглютиніну (Rothbard et al., 1989, Int. Immunol. 1: 479) і домен олігомеризації C4bp (Spencer et al., 2012, PLoS One 7:e33555).

Залежно від мікобактеріального антигена, присутність такого пептиду(дів) може бути корисною для збільшення експресії і/або імуногенності комбінації, що утворюється, або злитого

поліпептиду у порівнянні з комбінацією або гібридом, які експресують без таких пептидів. Підвищену експресію можна визначати традиційними методиками, такими як вестерн-блотінг. Підвищену імуногенність можна визначати з використанням традиційних аналізів, таких як аналіз методом імуноферментних плям.

В переважному утіленні злитий поліпептид за винаходом зв'язаний функціональним чином з адресуючим пептидом і/або пептидною міткою. Наприклад, гібриди № 2, 3, 4 і 5, проілюстровані у доданому розділі прикладів, зв'язані функціональним чином з сигнальним пептидом і міткою Flag, розташованою на N-кінці безпосередньо після Met, що ініціює, міткою тус, трансмембранним пептидом і His міткою на C-кінці безпосередньо перед термінатором, тоді як гібриди № 9, 10, 11 і 12 зв'язані функціональним чином з міткою Flag, розташованою на N-конце безпосередньо після Met, що ініціює, і міткою тус, з подальшою His міткою на C-кінці безпосередньо перед термінатором. З іншого боку, гібриди № 6, 8, 13 і 14 зв'язані функціональним чином з сигнальним пептидом і міткою Flag, розташованою на N-кінці безпосередньо після Met, що ініціює, міткою тус і His міткою на C-кінці безпосередньо перед термінатором.

Переважні приклади злитих поліпептидів вибрані з групи поліпептидів, що містять або, як альтернатива, по суті складаються, або, як альтернатива, що складаються з амінокислотної послідовності, яка демонструє щонайменше 80%-ну ідентичність, переважно щонайменше 85%-ну ідентичність, бажано щонайменше 90%-ну ідентичність, переважно щонайменше 95%-ну ідентичність і переважніше 98%-ну ідентичність, і навіть ще переважніше 100%-ну ідентичність з будь-якою амінокислотою послідовністю, показаною у SEQ ID NO: 28-39. Конкретніше, SEQ ID NO: 28 і 29 містять злитий поліпептид, що містить Ag85B, TB10.4 і ESAT6, з адресуючими пептидами і без них відповідно (як проілюстровано гібридами №2 і 10 у доданих прикладах). SEQ ID NO: 30 і 31 містять так званий злитий поліпептид RPFБ-Dhyb, що містить RpfB і RpfD, з адресуючими пептидами і без них відповідно (як проілюстровано гібридами №3 і 12 у доданих прикладах). SEQ ID NO: 32 і 33 містять злитий поліпептид RPFБ-Dhyb, що містить Ag85B, TB10.4 і ESAT6, з адресуючими пептидами і без них відповідно (як проілюстровано гібридами №4 і 11 у доданих прикладах). SEQ ID NO: 34 і 35 містять злитий поліпептид, що містить Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807, з адресуючими пептидами і без них відповідно (як проілюстровано гібридами №5 і 9 у доданих прикладах). SEQ ID NO: 36 містить злитий поліпептид, що містить Ag85B, Rv2626, RPFБ-Dhyb і Rv1733, з сигнальним пептидом (як проілюстровано гібридом №6 у доданих прикладах). SEQ ID NO: 37 містить злитий поліпептид, що містить Ag85B, Rv2626 і Rv1733, з сигнальним пептидом (як проілюстровано гібридом №8 у доданих прикладах). SEQ ID NO: 38 містить злитий поліпептид, що містить Rv2029, Rv2626, Rv1733 і Rv0111, з сигнальним пептидом (як проілюстровано гібридом №13 у доданих прикладах). SEQ ID NO: 39 містить злитий поліпептид, що містить Rv2029, TB10.4, ESAT-6 і Rv0111, з сигнальним пептидом (як проілюстровано гібридом №14 у доданих прикладах).

Переважніші приклади злитих поліпептидів вибрані з групи поліпептидів, що містять або, як альтернатива, по суті складаються з, або, як альтернатива, що складаються з амінокислотної послідовності, яка демонструє щонайменше 80%-ну ідентичність, переважно щонайменше 85%-ну ідентичність, бажано щонайменше 90%-ну ідентичність, переважно щонайменше 95%-ну ідентичність і переважніше 98%-ну ідентичність, і навіть ще переважніше 100%-ну ідентичність з будь-якою з наступних амінокислотних послідовностей:

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 28, від приблизно положення 32 до приблизно положення 506 (гібрид Ag85B\*-TB10.4-ESAT-6, як проілюстровано гібридом №2 або 10 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 29, від приблизно положення 10 до приблизно положення 484 (гібрид Ag85B\*-TB10.4-ESAT-6, як проілюстровано гібридом №2 або 10 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 30, від приблизно положення 32 до приблизно положення 380 (гібрид RPFБ-Dhyb, як проілюстровано гібридами №3 і 12 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 31, від приблизно положення 10 до приблизно положення 358 (злиття RPFБ-Dhyb, як проілюстровано гібридами №3 і 12 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 32, від приблизно положення 32 до приблизно положення 855 (гібрид RPFБ-Dhyb-Ag85B\*-TB10.4-ESAT-6, як проілюстровано гібридами №4 і 11 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 33, від приблизно положення 10 до приблизно положення 833 (гібрид RPFb-Dhyb-Ag85B\*-TB10.4-ESAT-6, як проілюстровано гібридами №4 і 11 у доданих прикладах);

5 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 34, від приблизно положення 32 до приблизно положення 1115 (гібрид Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807, як проілюстровано гібридами №5 і 9 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 35, від приблизно положення 10 до приблизно положення 1093 (гібрид Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807, як проілюстровано гібридами №5 і 9 у доданих прикладах);

10 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 36, від приблизно положення 32 до приблизно положення 956 (гібрид Ag85B\*-Rv2626-RPFb-Dhyb-Rv1733\*, як проілюстровано гібридом №6 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 37, від приблизно положення 32 до приблизно положення 607 (гібрид Ag85B\*-Rv2626-Rv1733\*, як проілюстровано гібридом №8 у доданих прикладах);

15 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 38, від приблизно положення 37 до приблизно положення 932 (гібрид Rv2029-Rv2626-Rv1733\*-Rv0111\*, як проілюстровано гібридом №13 у доданих прикладах); і

20 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 39, від приблизно положення 37 до приблизно положення 831 (гібрид Rv2029\*-TB10.4-ESAT-6-Rv0111\*).

Звичайно, такі амінокислотні послідовності можуть бути оснащені Met, що ініціює.

У переважному утіленні злитий поліпептид за винаходом, крім того, містить відповідний адресуючий пептид(ди), такий як сигнальний і/або трансмембранний пептиди, щоб забезпечувати його презентацію на клітинній мембрані. Навіть переважніші злиті поліпептиди  
25 вибрані з групи поліпептидів, що містять або, як альтернатива, по суті складаються з, або, як альтернатива, що складаються з амінокислотної послідовності, яка демонструє щонайменше 80%-ну ідентичність, переважно щонайменше 85%-ну ідентичність, бажано щонайменше 90%-ну ідентичність, переважно щонайменше 95%-ну ідентичність і переважніше 98%-ну ідентичність, і навіть ще переважніше 100%-ну ідентичність з будь-якою з наступних  
30 амінокислотних послідовностей:

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 28, від положення 1 (Met, що ініціює) до приблизно положення 23 і від приблизно положення 32 до приблизно положення 506, і від приблизно положення 517 до приблизно положення 583 (гібрид SS-Ag85B\*-TB10.4-ESAT-6-TM, як проілюстровано гібридами №2 у доданих прикладах);

35 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 30, від положення 1 (Met, що ініціює) до приблизно положення 23 і від приблизно положення 32 до приблизно положення 380, і від приблизно положення 391 до приблизно положення 457 (гібрид SS-RPFb-Dhyb-TM, як проілюстровано гібридом №3 у доданих прикладах);

40 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 32, від положення 1 (Met, що ініціює) до приблизно положення 23 і від приблизно положення 32 до приблизно положення 855, і від приблизно положення 866 до приблизно положення 932 (гібрид SS-RPFb-Dhyb-Ag85B\*-TB10.4-ESAT-6-TM, як проілюстровано гібридом №4 у доданих прикладах);

45 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 34, від положення 1 (Met, що ініціює) до приблизно положення 23 і від приблизно положення 32 до приблизно положення 1115, і від приблизно положення 1126 до приблизно положення 1192 (гібрид SS-Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TM, як проілюстровано гібридом №5 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 36, від положення 1 (Met, що ініціює) до приблизно положення 23 і від приблизно положення 32 до приблизно положення 956 (гібрид SS-Ag85B\*-Rv2626-RPFb-Dhyb-Rv1733\*, як проілюстровано гібридом №6 у доданих прикладах);

50 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 37, від положення 1 (Met, що ініціює) до приблизно положення 23 і від приблизно положення 32 до приблизно положення 607 (гібрид SS-Ag85B\*-Rv2626-Rv1733\*, як проілюстровано гібридом №8 у доданих прикладах);

- амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO: 38, від положення 1 (Met, що ініціює) до приблизно положення 28 і від приблизно положення 37 до приблизно положення 932 (гібрид SS-Rv2029-Rv2626-Rv1733\*-Rv0111\*, як проілюстровано гібридом №13 у доданих прикладах); і

55 - амінокислотна послідовність, показана у SEQ ID NO: 39, від положення 1 (Met, що ініціює) до приблизно положення 28 і від приблизно положення 37 до приблизно положення 831 (гібрид SS-Rv2029\*-TB10.4-ESAT-6-Rv0111\*, як проілюстровано гібридом №14 у доданих прикладах).

60 Типово мікобактеріальні антигени і молекули нуклеїнової кислоти, що кодують такі антигени, що містяться в імуногенній комбінації, і злитий поліпептид за винаходом можна виділяти або

отримувати з використанням стандартних методик. Їх можна очищати, наприклад, з культури бактерій або продукувати рекомбінантно у клітині-господарі з використанням будь-якої експресійної системи, доступної в даній області, або можна надавати суб'єкту при введенні відповідного експресійного вектора(рів), такого як описаний тут вектор.

5 Молекули нуклеїнової кислоти і комбінації нуклеїнових кислот

Згідно з даним винаходом також запропоновані виділені молекули нуклеїнової кислоти, що кодують щонайменше 5 мікобактеріальних антигенів, що містяться в імуногенній комбінації, і злиті поліпептиди за даним винаходом, а також композиції, що містять такі молекули нуклеїнової кислоти.

10 У контексті даного винаходу терміни «нуклеїнова кислота», «молекула нуклеїнової кислоти», «полінуклеотид» і «нуклеотидна послідовність» використовуються взаємозамінно і позначають полімер будь-якої довжини у вигляді або полідезоксирибонуклеотидів (ДНК) (наприклад, кДНК, геномна ДНК, плазміди, вектори, вірусні геноми, виділена ДНК, зонди, праймери і їх будь-яка суміш), або полірибонуклеотидів (РНК) (наприклад, мРНК, антисмислова РНК), або змішаних  
15 полірибо-полідезоксирибонуклеотидів. Вони охоплюють одно- або дволанцюгові, лінійні або кільцеві, природні або синтетичні нуклеїнові кислоти.

Як визначено вище, нуклеїнові молекули за винаходом можуть бути природними нуклеїновими кислотами (наприклад, виділені з генома або фрагмента генома мікобактерії) або можуть бути модифіковані людиною з включенням заміни, делеції, приєднання і/або вставки  
20 одного або більше ніж одного нуклеотиду. Даний винахід охоплює будь-які модифікації, націлені на поліпшення клонування, експресії, стабільності (наприклад, введення відповідних сайтів рестрикції, виродження і/або оптимізація нуклеотидної послідовності для оптимізації трансляції в даній клітині-господарі і/або придушення потенційно негативних елементів, які можуть дестабілізувати молекулу нуклеїнової кислоти або її транскрипт). Коли розглядаються декілька  
25 модифікацій, вони можуть стосуватися послідовних і/або непослідовних нуклеотидних залишків. Модифікація(ції), що розглядається даним винаходом, охоплює модифікації, що мовчать, які не змінюють амінокислотну послідовність мікобактеріальних антигенів і злитих поліпептидів, які кодують, а також модифікації, які транслуються у мікобактеріальний поліпептид, який кодують. Переважно модифікації не зменшують імуногенний потенціал мікобактеріальних антигенів і  
30 злитих поліпептидів, які кодують, відносно немодифікованих.

В одному утіленні молекула нуклеїнової кислоти за винаходом може бути виродженою по всій довжині нуклеотидної послідовності або її частині(тин) так, щоб зменшувати гомологію послідовності між молекулою(ами) нуклеїнової кислоти, використовуваної у контексті винаходу, або у клітині-господарі. Насправді, доцільно вироджувати частини послідовностей нуклеїнової  
35 кислоти, які демонструють високий ступінь ідентичності нуклеотидної послідовності, і фахівець здатний ідентифікувати такі частини за допомогою вирівнювання послідовності для виродження молекул нуклеїнової кислоти в гомологічних частинах так, щоб уникнути проблем із стабільністю під час процесу отримання.

Альтернативно або додатково, молекула нуклеїнової кислоти за винаходом може бути  
40 оптимізована для забезпечення високого рівня експресії у конкретній клітині-господарі або суб'єкті, наприклад, у клітині птаха (наприклад, фібробласт ембріона курки, лінії клітин Cairina moschata, описані у WO2010/130756 і WO2012/001075), ссавця, дріжджів (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* або *Pichia pastoris*) або бактеріях (наприклад, *E. coli*, BCG або *Listeria*). Насправді, спостерігали, що при доступності більше ніж одного кодону  
45 для кодування даної амінокислоти картини використання кодонів організмів є вельми невивадовими, і використання кодонів може помітно відрізнятися між різними господарями. Оскільки нуклеотидні послідовності, використовувані у винаході, головним чином, мають бактерійне походження, вони можуть мати невідповідну картину використання кодонів для ефективною експресії в клітинах-господарях, таких як клітини вищих еукаріот. Типово проводять  
50 оптимізацію кодонів шляхом заміни одного або більше ніж одного «природного» (мікобактеріального) кодону, що відповідає кодону, не часто використовуваному в клітині-господарі, що цікавить, одним або більше ніж одним кодоном, що кодує таку ж амінокислоту, який частіше використовується. Немає необхідності замінювати усі природні кодони, що відповідають не часто використовуваним кодонам, оскільки підвищеної експресії можна досягати  
55 навіть з частковою заміною. Крім того, можна робити деякі відхилення від суворої прихильності оптимізованому застосуванню кодонів для пристосування до введення сайту(тів) рестрикції у молекулу, що утворюється, нуклеїнової кислоти.

Крім оптимізації застосування кодонів, експресію в клітині-господарі або суб'єкті можна покращувати за допомогою додаткових модифікацій нуклеотидної послідовності. Наприклад,  
60 молекулу нуклеїнової кислоти за винаходом можна модифікувати таким чином, щоб запобігати

кластеризації рідкісних, неоптимальних кодонів, присутніх у концентрованих областях, і/або для придушення або модифікації «негативних» елементів послідовності, які, як очікується, справляють негативний вплив на рівні експресії. Такі негативні елементи послідовності включають, без обмеження, області, що мають дуже високий (більше 80%) або дуже низький (менше 30%) вміст GC; AT-багаті або GC-багаті відрізки послідовності; нестабільні послідовності з прямими або інвертованими повторами; вторинні структури РНК; і/або внутрішні приховані регуляторні елементи, такі як внутрішні ТАТА-бокси, *chi*-сайти, ділянки посадки рибосоми і/або сайти-донори/акцептори сплайсингу.

Даний винахід охоплює молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує будь-який мікобактеріальний антиген, вибраний з групи поліпептидів, показаних у будь-якій з SEQ ID NO: 1-24.

Особливий інтерес представляє молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує злитий поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, яка демонструє щонайменше 80%-ну ідентичність (наприклад, 80%-ну, 85%-ну, 90%-ну, 95%-ну, 98%-ну, 100%-ну) з будь-якою з амінокислотних послідовностей, показаних у SEQ ID NO: 28-39, або будь-яким їх варіантом або фрагментом (наприклад, фрагментом, що кодує типову частину(ни) таких SEQ ID NO: 28-39, процитованих вище).

Особливо переважне утілення даного винаходу спрямоване на молекулу нуклеїнової кислоти, що містить, як альтернативу, що по суті складається з або, як альтернатива, складається з нуклеотидної послідовності, яка демонструє щонайменше 80%-ну ідентичність (тобто молекулу нуклеїнової кислоти, яка гібридується з показаною молекулою нуклеїнової кислоти за жорстких умов), переважно щонайменше 85%-ну ідентичність, переважно щонайменше 90%-ну ідентичність, переважніше щонайменше 95%-ну ідентичність і навіть ще переважніше 100%-ну ідентичність з нуклеотидною послідовністю, показаною в будь-якій з SEQ ID NO: 40-51, або з її будь-яким варіантом і фрагментом (наприклад, таким, що кодує типові частини SEQ ID NO: 28-39, згадані вище).

Молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом можуть бути отримані з використанням даних про послідовність, доступних в даній області, і наданої тут інформації про послідовність. Наприклад, їх можна виділяти з використанням традиційних методик, добре відомих в даній області, наприклад, за допомогою виділення з використанням ПЛР і/або клонування за допомогою традиційних методик молекулярної біології з генома мікобактерії конкретного виду або її геномного фрагмента, кДНК і геномних бібліотек або будь-якого вектора попереднього рівня техніки, для якого відомо, що він включає їх. Як альтернативу, молекули нуклеїнової кислоти за винаходом також можна отримувати хімічним синтезом у автоматизованому процесі (наприклад, збирати з синтетичних олігонуклеотидів, що перекриваються).

Інше утілення даного винаходу належить до фрагментів молекул нуклеїнової кислоти за винаходом, наприклад, фрагментів, отриманих ендонуклеазою рестрикції або ПЛР. Такі фрагменти можна використовувати як зонди, праймери або фрагменти, що кодують релевантну імуногенну частину(ни).

#### Вектори

Даний винахід також стосується векторів, що містять одну або більше ніж одну молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, а також композицій, що містять такий вектор(ри).

Термін «вектор» у тому вигляді, як він тут використовується, відноситься до носія, переважно до молекули нуклеїнової кислоти або вірусної частинки, яка містить необхідні елементи для забезпечення доставки, розмноження і/або експресії будь-якої описаної тут молекули(кул) нуклеїнової кислоти у клітині-господарі або суб'єкті. Цей термін охоплює вектори для підтримування (клонуючі вектори) або вектори для експресії в різних клітинах-господарях або суб'єктах (експресійні вектори), позахромосомні вектори (наприклад, плазміди з великим числом копій) або інтегруючі вектори (наприклад, призначені для інтегрування у геном клітини-господаря і продукції додаткових копій молекул нуклеїнової кислоти при реплікації клітини-господаря), а також човникові вектори (наприклад, функціонуючі і в прокаріотичних, і/або в еукаріотичних господарях) і вектори переносу (наприклад, для переносу молекули(кул) нуклеїнової кислоти у вірусний геном). Для мети даного винаходу вектори можуть походити з генетичних джерел, що зустрічаються в природі, бути синтетичними або штучними, або деякою комбінацією природних і штучних генетичних елементів.

У контексті даного винаходу термін «вектор» слід розуміти в широкому сенсі як такий, що включає плазмідні і вірусні вектори. Термін «плазмідний вектор» в тому вигляді, як він тут використовується, відноситься до репліковної конструкції ДНК. Зазвичай плазмідні вектори містять гени селективних маркерів, які забезпечують селекцію клітин-господарів, що несуть плазмідний вектор, на користь або проти присутності відповідної селективної речовини. У даній

області відомий цілий ряд генів позитивних і негативних селективних маркерів. Як ілюстрація, ген стійкості до антибіотика можна використовувати як ген позитивного селективного маркера, який забезпечує селекцію клітини-господаря у присутності відповідного антибіотика.

Термін «вірусний вектор» у тому вигляді, як він тут використовується, відноситься до вектора на основі нуклеїнової кислоти, який включає щонайменше один елемент вірусного генома і може бути упакований у вірусну частинку або з вірусною частинкою. Терміни «вірус», «віріони», «вірусні частинки» і «частинка у вигляді вірусного вектора» використовуються взаємозамінно для віднесення до вірусних частинок, які утворюються при трансдукції вектора на основі нуклеїнової кислоти у відповідну клітину або лінію клітин згідно з відповідними умовами, що забезпечують утворення вірусних частинок. У контексті даного винаходу термін «вірусний вектор» слід розуміти в широкому сенсі як такий, що включає вектор на основі нуклеїнової кислоти (наприклад, вірусний вектор на основі ДНК), а також вірусні частинки, отримані з нього. Термін «інфекційний» відноситься до здатності вірусного вектора інфікувати і поступати у клітину-господаря або суб'єкта. Вірусні вектори можуть бути компетентними до реплікації або селективними відносно реплікації (наприклад, сконструйованими для кращої або селективної реплікації у специфічних клітинах-господарях), або можуть бути виведеними з ладу генетично так, щоб бути дефектними відносно реплікації або мати ослаблену реплікацію.

Вектори, які є відповідними в контексті даного винаходу, включають, без обмеження, бактеріофагові, плазмідні або космідні вектори для експресії у прокаріотичних клітинах-господарях, таких як бактерії (наприклад, *E. coli*, BCG або *Listeria*); вектори для експресії в дріжджах (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*); бакуловірусні вектори для експресії у системах на основі клітин комах (наприклад, клітинах Sf 9); вірусні і плазмідні вектори для експресії у системах рослинних клітин (наприклад, Ті плазміда, вірус мозаїки цвітної капусти CaMV; вірус мозаїки тютюну TMV); а також плазмідні і вірусні вектори для експресії у клітинах вищих еукаріот або суб'єктах. Типово такі вектори є у продажу (наприклад, у Invitrogen, Stratagene, Amersham Biosciences, Promega і т.д.) або доступні в депозитаріях, таких як Американська колекція типових культур (ATCC, Rockville, Md.), або були темою численних публікацій, що описують їх послідовність, організацію і способи отримання, дозволяючи фахівцям застосовувати їх.

Типові приклади відповідних плазмідних векторів включають, без обмеження, pREP4, pCER4 (Invitrogen), pCI (Promega), pVAX (Invitrogen) і pGWiz (Gene Therapy System Inc).

Типові приклади відповідних вірусних векторів отримують з цілого ряду різних вірусів (наприклад, ретровірусу, аденовірусу, аденосателітного вірусу (AAV), вірусу віспи, вірусу герпесу, вірусу кору, співаючого вірусу, альфавірусу, вірусу везикулярного стоматиту і т.д.). Як описано вище, термін «вірусний вектор» охоплює ДНК вектора, геномну ДНК, а також вірусні частинки, отримані на їх основі, і особливо інфекційні вірусні частинки.

В одному утіленні вірусний вектор, використовуваний у даному винаході, є дефектним за реплікацією або має ослаблену реплікацію, що означає те, що він не може реплікуватися в будь-якому значущому ступені у нормальних клітинах (наприклад, нормальних людських клітинах) або у суб'єкті, якому його вводять (ослаблення або дефектність функцій реплікації можна оцінювати традиційними способами - наприклад, за допомогою вимірювання синтезу ДНК і/або титру вірусу в непермісивних клітинах). Для розмноження таких дефектних за реплікацією векторів або векторів з ослабленою реплікацією типово потрібні пермісивні лінії клітин, які відновлюють або комплементують відсутні/ослаблені функції.

Приклади вірусних векторів, які є корисними у контексті даного винаходу, включають аденовірусні вектори, які мають цілий ряд добре задокументованих переваг стосовно вакцинації, імунотерапії, переносу генів або рекомбінантної продукції (для огляду, див. "Adenoviral vectors for gene therapy", 2002, Ed D. Curiel and J. Douglas, Academic Press). Аденовірусні вектори за даним винаходом можуть походити з безлічі людських або тваринних джерел (наприклад, з собачого, овечого аденовірусу, аденовірусу приматів і т.д.). Можна використовувати будь-який серотип з особливою перевагою відносно людських аденовірусів і конкретною перевагою щодо підроду С, як, наприклад, Ad2, Ad5, Ad6, і підроду В, як, наприклад, Ad11, Ad34 і Ad35. Також може мати перевагу застосування тваринного Ad з особливою перевагою відносно Ad шимпанзе, такого як Ad3 і Ad6 шимпанзе. Згадані аденовіруси доступні у ATCC або були темою численних публікацій, що описують їх послідовність, організацію і способи отримання, дозволяючи фахівцям застосовувати їх (див., наприклад, US 6136594; US 6133028; WO00/50573; WO00/70071; WO2004/083418; WO2004/097016 і WO2005/071093).

Переважними аденовірусними векторами, дефектними за реплікацією, є вектори, дефектні за E1, з делецією E1, що тягнеться приблизно від положення 459 до 3328 або приблизно від положення 459 до 3510 (з посиланням на послідовність Ad5, розкрити в GeneBank під номером

доступу М 73260). Здатність до клонування можна покращувати далі за допомогою делеції додаткової частини(ин) аденовірусного геному (всієї області Е3, що не є незамінною, або її частини (наприклад, делеція приблизно від положення 27867 до 30743) або інших незамінних областей Е2 і/або Е4, як описано у WO94/28152 і Lusky et al., 1998, J. Virol 72: 2022).

5 Молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом можна вставляти незалежно в будь-яке положення аденовірусного геному з особливою перевагою відносно вставки, що забезпечує заміну області Е1 і/або Е3. Їх можна розташовувати у смисловій або антисмисловій орієнтації по відношенню до природного напрямку транскрипції в області, яку розглядають.

10 Інші приклади вірусних векторів, особливо відповідних у контексті винаходу, включають вектори на основі вірусу віспи, такі як вектори на основі вірусу віспи курей (наприклад, FP9), вектори на основі вірусу канарипокс (наприклад, ALVAC) і вектори на основі вірусу вісповакцини, причому останній є переважним. Відповідні віруси вісповакцини включають, без обмеження, штам Copenhagen, штам Wyeth, NYVAC (US 5494807) і модифікований штам Анкара (MVA) (Antoine et al., 1998, Virol. 244: 365; WO02/42480). Загальні умови для 15 конструювання і продукції рекомбінантного вірусу віспи добре відомі в даній області (див., наприклад, WO2010/130753; WO03/008533; US 6998252; US 5972597 і US 6440422). Молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом переважно вставляють у геном вірусу віспи в заміний локус. Ген тимідинкінази є особливо придатним для вставки у вектори на основі вірусу вісповакцини штаму Copenhagen, і делеція II або III - для вставки у вектор на основі MVA 20 (WO97/02355).

Іншими вірусними векторами, відповідними у контексті даного винаходу, є морбілівірус, який можна отримати з родини параміксовіріда, з особливою перевагою відносно вірусу кору. У даній області доступні різні ослаблені штами (Brandler et al, 2008, CIMID, 31: 271; Singh et al., 1999, J. virol. 73(6): 4823), такі як, і без обмеження, штами Edmonston A і B (Griffin et al., 2001, Field's in 25 Virology, 1401-1441), штам Schwarz (Schwarz A, 1962, Am J Dis Child, 103: 216), штами S-191 або C-47 (Zhang et al., 2009, J Med Virol. 81 (8): 1477). Особливо придатною є вставка між генами Р і М або між генами Н і L.

Відповідний вектор для застосування в даному винаході також включає бактерійну клітину, яка може бути клітиною дикого типу або мутантною (наприклад, авірулентною). Добре відомі 30 приклади таких бактерійних клітин включають, без обмеження, авірулентну мікобактерію (наприклад, Mycobacterium bovis BCG), Lactobacillus (наприклад, Lactococcus lactis), Listeria (наприклад, Listeria monocytogenes) і інші мікроорганізми, такі як Salmonella і Pseudomona. Переважне утілення спрямоване на вектор на основі BCG, у геном якого була включена молекула(ли) нуклеїнової кислоти, що кодує один або більше ніж один мікобактеріальний 35 антиген(ни) або злитий поліпептид(и), як визначено вище, способом, що забезпечує експресію такого елемента(тів) вектором на основі BCG.

Даний винахід також охоплює вектори (наприклад, плазмідну ДНК), що утворюють комплекс з ліпідами або полімерами з утворенням структур у вигляді частинок, таких як ліпосоми, ліпоплекси або наночастинки.

40 Згідно з даним винаходом молекули нуклеїнової кислоти, що містяться у векторі за винаходом, знаходяться у формі, відповідній для експресії в клітині-господарі або у суб'єкті, що означає те, що кожна з показаних тут молекул нуклеїнової кислоти зв'язана функціонально з відповідними регуляторними послідовностями. Термін «регуляторні елементи» або «регуляторна послідовність» в тому вигляді, як він тут використовується, відноситься до будь- 45 якого елемента, який забезпечує, сприяє або модулює експресію молекули(кул) нуклеїнової кислоти в даній клітині-господарі або суб'єкті, включаючи реплікацію, дуплікацію, транскрипцію, сплайсинг, трансляцію, стабільність і/або транспорт нуклеїнової кислоти(лот) або її похідного (тобто мРНК).

Фахівцям в даній області буде зрозуміло, що вибір регуляторних послідовностей може 50 залежати від таких чинників, як сам вектор, клітина-господар або суб'єкт, бажаний рівень експресії і т.д. Особливо важливий промотор. У контексті винаходу він може бути конститутивним, таким, що керує експресією молекули нуклеїнової кислоти в багатьох типах клітин-господарів, або специфічним для певних клітин-господарів (наприклад, специфічні для легені регуляторні послідовності), або регульованим у відповідь на конкретні події або екзогенні 55 чинники (наприклад, температура, додавання живильної речовини, гормон і т.д.) або згідно фазі вірусного циклу (наприклад, пізній або ранній). Також можна використовувати промотори, які репресуються під час стадії продукції у відповідь на конкретні події або екзогенні чинники для того, щоб оптимізувати продукцію вектора і обійти потенційну токсичність поліпептиду(дів), який експресують.

Промотори, придатні для конститутивної експресії у клітинах ссавців, включають негайний ранній промотор цитомегаловірусу (CMV) (US 5168062), промотор RSV (вірус саркоми Рауса), головний пізній промотор аденовірусу, промотор фосфогліцерокінази (PGK), промотор тимідинкінази (TK) вірусу простого герпесу (HSV-1) і промотор полімерази T7, але не обмежуються ними. У прокаріотичних господарях можна використовувати такі промотори, як промотори *trp*, *lac*, фагів, промотори *tPHK* і промотори гліколітичних ферментів. Корисні дріжджові промотори включають промоторні області металотіонеїну, 3-фосфогліцераткінази або інших гліколітичних ферментів, таких як енолаза або гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, ферментів, відповідальних за використання мальтози і галактози. Для експресії у векторах на основі вірусу віспи особливо адаптовані промотори вірусу вісповакцини. Типовий приклад включає, без обмеження, промотор вірусу вісповакцини 7.5K, H5R, 11K7.5 (Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther. 15: 18), TK, p28, p11 і K1L, а також синтетичні промотори, такі як помотори, описані у Chakrabarti et al. (1997, Biotechniques 23: 1094-7; Hammond et al., 1997, J. Virol Methods 66: 135-8 і Kumar and Boyle, 1990, Virology 179: 151-8), а також ранні/пізні химерні промотори. Промотори, придатні для експресії, опосередкованої вірусом кору, включають, без обмеження, будь-який промотор, що керує експресією транскрипційних одиниць вірусу кору (Brandler and Tangy, 2008, CIMID 31: 271).

Фахівці в даній області розуміють, що регуляторні елементи, контролюючи експресію молекули(кул) нуклеїнової кислоти за винаходом, крім того, можуть містити додаткові елементи для правильної ініціації, регуляції і/або термінації транскрипції (наприклад, послідовності термінації транскрипції поліА), транспорту мРНК (наприклад, сигнальні послідовності ядерної локалізації), процесингу (наприклад, сигнали сплайсингу) і стабільності (наприклад, інтрони і некодуючі 5'- і 3'-послідовності), трансляції (наприклад, Met, що ініціює, тричленні лідерні послідовності, сайти зв'язування рибосоми IRES, послідовності Шайна-Дальгарно і т.д.) у клітині-господарі або суб'єкті і для стадій очищення (наприклад, мітка, як тут описано).

В одному утіленні молекули нуклеїнової кислоти, кодуючі мікобактеріальні антигени, присутні в або кодовані імуногенною комбінацією, і/або злиті поліпептиди за винаходом, несе один вектор.

В альтернативному утіленні молекули нуклеїнової кислоти, кодуючі мікобактеріальні антигени, присутні в або кодовані імуногенною комбінацією, і/або злиті поліпептиди за винаходом несуть два або більше ніж два вектори. Кожний вектор кодує один або більше ніж один мікобактеріальний антиген серед наведених вище антигенів або один або більше ніж один злитий поліпептид. Два або більше ніж два вектори можна вводити суб'єкту по суті одночасно або послідовно.

Особливо переважні утілення винаходу спрямовані на один вектор (або вірусні частинки), вибраний з групи, що складається з наступних:

i. вектор, що кодує злитий поліпептид, що містить Rv2029, Rv2626, Rv1733 і Rv011, і злитий поліпептид, що містить RpfB, RpfD, Ag85B, TB10.4 і ESAT-6 (типові вектори, що кодують злиття 13 і 4, і злиття 13 і 11 відповідно);

ii. вектор, що кодує злитий поліпептид, що містить Rv2029, Rv2626, Rv1733 і Rv0111, злитий поліпептид, що містить RpfB, RpfD, Ag85B, TB10.4 і ESAT-6, і злитий поліпептид, що містить Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807 (типові вектори, що кодують злиття 13, 4 і 5, і злиття 13, 11 і 9 відповідно);

iii. вектор, що кодує злитий поліпептид, що містить Rv2029, Rv2626, Rv1733 і Rv0111, злитий поліпептид, що містить RpfB, RpfD, Ag85B, TB10.4 і ESAT-6, і злитий поліпептид, що містить Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807 (типові вектори, що кодують злиття 13, 4 і 9, і злиття 13, 11 і 5 відповідно);

iv. вектор, що кодує злитий поліпептид, що містить Ag85B, Rv2626, RpfB, RpfD і Rv1733, і злитий поліпептид, що містить Rv2029, TB10.4, ESAT-6 і Rv0111 (типові вектори, що кодують злиття 6 і 14);

v. вектор, що кодує злитий поліпептид, що містить Ag85B, Rv2626, RpfB, RpfD і Rv1733, злитий поліпептид, що містить Rv2029, TB10.4, ESAT-6 і Rv0111, і злитий поліпептид, що містить Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807 (типові вектори, що кодують злиття 6, 14 і 5, і злиття 6, 14 і 9 відповідно);

vi. вектор, що кодує злитий поліпептид, що містить RpfB, RpfD, Ag85B, TB10.4 і ESAT-6, і злитий поліпептид, що містить Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807 (типові вектори, що кодують злиття 9 і 11, і злиття 5 і 4 відповідно).

Переважніше, описаним вище вектором є вектор на основі MVA.

За необхідності імуногенна комбінація, злитий поліпептид, або вектор за винаходом може, крім того, містити додаткові копії вибраних мікобактеріальних антигенів або додаткових



антигенів з іншого виду мікобактерії, такого як *M. bovis* або *M. caprae*, і/або додаткові поліпептиди з інших джерел (тобто гетерологічний поліпептид) з метою поліпшення терапевтичної або захисної активності проти інфекції мікобактерією або будь-якого захворювання або стану, викликаного або асоційованого з інфекцією мікобактерією. Відповідні додаткові поліпептиди включають, без обмеження, імуномодулятори, такі як цитокіни, і будь-який інший антиген, що походить з потенційно соінфікуючого організму (наприклад, ВІЛ, HBV (вірус гепатиту Б) і т.д.).

Згідно з переважним утіленням вектор за винаходом знаходиться у формі інфекційних вірусних частинок. Типово такі вірусні частинки отримують способом, що включає стадії (i) введення вірусного вектора за винаходом у відповідну лінію клітин, (ii) культивування зазначеної лінії клітин за відповідних умов таким чином, щоб забезпечувати продукцію зазначених інфекційних вірусних частинок, (iii) виділення продукованої вірусної частинки з культури зазначеної лінії клітин і (iv) можливо очищення зазначеної виділеної вірусної частинки.

Коли вірусний вектор є дефектним за реплікацією або має ослаблену реплікацію, частинки зазвичай продукуються у пермісивній лінії клітин або за допомогою застосування вірусу-хелпера, який надає відсутні/ослаблені функції *in trans*. Наприклад, відповідні лінії клітин для комплементування аденовірусних векторів з делецією E1 включають клітини 293 (Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36: 59-72), а також клітини HER-96 і PER-C6 (наприклад, Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9: 1909-17; WO97/00326) або будь-яке похідне даних ліній клітин. Клітини птахів особливо придатні для розмноження векторів на основі вірусу віспи, включаючи, без обмеження, первинні фібробласти ембріонів курки (CEF), приготовані з ембріонів курки, отриманих із запліднених яєць, або лінії клітин качки (наприклад, як описано у WO03/076601, WO2009/004016, WO2010/130756 і US2011-008872).

Інфекційні вірусні частинки можна виділяти з супернатанту культури і/або з клітин після лізису. Крім того, їх можна очищати згідно стандартним методикам (хроматографія, методики ультрацентрифугування і т.д.).

Даний винахід також охоплює вектори або вірусні частинки, які були модифіковані для забезпечення переважної спрямованої доставки у специфічну клітину-мішень. Характерною властивістю векторів для спрямованої доставки є присутність на їх поверхні ліганда, здатного до розпізнавання і зв'язування з клітинним компонентом, експонованим на поверхні, таким як специфічний для клітини маркер (наприклад, для клітини, інфікованої мікобактерією), тканинспецифічний маркер (наприклад, специфічний для легені маркер) і т.д. Приклади придатних лігандів включають антитіла або їх фрагменти, спрямовані на мікобактеріальний антигенний домен. Спрямована доставка може здійснюватися за допомогою проведення генетичної вставки ліганда в поліпептид, що присутній на поверхні вірусу (наприклад, аденовірусне волокно, пентон, р1X або продукт гена p14 вісповакцини).

Клітини-господарі і способи отримання

У іншому аспекті даний винахід також відноситься до клітин-господарів, які містять імуногенні комбінації, до злитих поліпептидів, молекул нуклеїнової кислоти або векторів (наприклад, вірусним частинкам) за винаходом, а також до композицій, що містять таку клітину-господаря.

Термін «клітина-господар» в тому вигляді, як він тут використовується, слід розуміти у широкому сенсі без будь-якого обмеження, що стосується конкретної організації у тканині, органі або виділених клітин. Такі клітини можуть належати до унікального типу клітин або до групи з різних типів клітин, таких як лінії клітин, які культивують, первинні клітини і проліферативні клітини. У контексті даного винаходу термін «клітини-господарі» включає прокаріотичні клітини, клітини нижчих еукаріот, таких як дріжджі, та інші еукаріотичні клітини, такі як клітини комах, рослинні клітини і клітини ссавців (наприклад, людські або такі, що не є людськими), а також клітини, здатні продукувати вектор за винаходом (наприклад, клітини 293, HER96, PERC.6, CEF, лінії клітин качки і т.д.). Даний термін також включає клітини, які можуть бути або були реципієнтами описаного тут вектора, а також потомство таких клітин.

Згідно з конкретним утіленням винаходу клітина-господар може бути, крім того, інкапсульована. Технологія інкапсуляції клітини відома в даній області.

Крім того, іншим аспектом даного винаходу є спосіб рекомбінантної продукції мікобактеріальних антигенів, що містяться в або кодованих імуногенною комбінацією, або злитих поліпептидів за винаходом з використанням векторів (або інфекційних вірусних частинок) і/або клітин-господарів за винаходом. Типово даний спосіб включає стадії (i) введення вектора у відповідну клітину-господаря з отриманням трансфікованої або інфікованої клітини-господаря, (ii) культивування зазначеної трансфікованої або інфікованої клітини-господаря *in vitro* за відповідних умов для зростання клітини-господаря, (iii) виділення культури клітин і (iv) можливо

очищення мікобактеріального антигена(нів) або злитого поліпептиду з виділеної клітини і/або супернатанту культури.

Очікується, що фахівці в даній області обізнані про численні системи експресії, доступні в даній області для проведення експресії поліпептидів, і про способи введення вектора в клітину-господаря. Такі способи включають мікроін'єкцію, трансфекцію, опосередковану  $\text{CaPO}_4$ , трансфекцію, опосередковану DEAE-декстраном, електропорацію, ліпофекцію/ліпосомне злиття, генні гармати, трансдукцію, вірусну інфекцію, а також пряме введення в організм господаря за допомогою різних способів, але не обмежуються ними. Даний спосіб також можна використовувати у асоціації з традиційними трансфекційними реагентами, які полегшують введення нуклеїнових кислот у клітини-господарі, такими як полікатіонні полімери (наприклад, хітозан, поліметакрилат, PEI (поліетиленімін) і т.д.) і катіонні ліпіди (наприклад, DC-Chol/Dope, трансфектам, ліпофектин і т.д.).

Клітини-господарі можна культивувати у традиційних ферментаційних біореакторах, колбах і чашках Петрі. Культивування можна проводити при температурі, pH і вмісті кисню, придатних для даної клітини-господаря. Тут не робитимуться спроби докладного опису різних прокариотичних і еукаріотичних систем експресії, доступних в даній області для таких цілей.

У переважному утіленні в даному способі використовується клітина-господар *E. coli* і, зокрема, штам *E. coli*, що несе профаг D13 у її геномі, для забезпечення індукційної експресії T7 полімерази лактозою або аналогом лактози (наприклад, IPTG: ізопропіл  $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозид). Такі штами доступні у різних виробників (наприклад, Lucigen, Merck і т.д.). Після введення плазмиди трансформовану клітину *E. coli* можна культивувати за температури, що складає від приблизно 18 °C до приблизно 39 °C (особливо переважно - приблизно 30 °C або приблизно 37 °C), протягом періоду часу, що варіює від 6 до 48 годин (особливо переважно - від приблизно 8 до приблизно 24 год), у традиційному середовищі, адаптованому для селективного маркера вектора (наприклад, присутність антибіотика) і для штамів господаря (наприклад, у присутності індуктора, такого як IPTG). Культуру клітин виділяють, і її можна лізувати (наприклад, хімічний лізис з детергентом, обробка ультразвуком і т.д.). Після центрифугування клітинного лізату і супернатант, і осад можна відбирати для подальшого аналізу (наприклад, за допомогою SDS-PAGE (електрофореz у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію)) для оцінки рівня експресії, а також розчинності експресованої речовини (наприклад, розчинна речовина може знаходитися у супернатанті клітинного лізату, і нерозчинна речовина може захоплюватися у тілах включення).

Виділений мікобактеріальний антиген(ни) або злиті поліпептиди, можливо можна очищати добре відомими способами очищення, що включають осадження сульфатом амонію, кислотну екстракцію, гель-електрофореz, фільтрування і хроматографічні способи (наприклад, хроматографія з оберненою фазою, гель-фільтрація, іонообмінна, афінна, заснована на гідрофобних взаємодіях хроматографія, хроматографія на гідроксиапатиті, високоефективна рідинна хроматографія і т.д.). Умови і методики, що підлягають застосуванню, залежать від таких чинників, як нетто заряд, молекулярна маса, гідрофобність, гідрофільність, і будуть очевидними для фахівців в даній області. Крім того, рівень очищення залежатиме від наміченого застосування. Наприклад, концентрацію білка можна оцінювати аналізом за Бредфорд (Biorad), рівні ендотоксинів можна оцінювати такими методиками, як портативна система тестування (Charles River Laboratories), і масу очищених поліпептидів можна вимірювати з використанням MALDI (матрично-активована лазерна десорбція/іонізація) або електророзпилювальних способів.

#### Композиції

У іншому аспекті згідно з даним винаходом запропонована композиція, що містить щонайменше одну з імуногенної комбінації, злитого поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора (наприклад, інфекційної вірусної частинки) або клітини-господаря за винаходом (також іменовані тут «активний агент») або будь-якої їх комбінації (наприклад, комбінації різних поліпептидів або векторів/вірусних частинок). Переважно композиція є фармацевтичною композицією, яка, крім терапевтично ефективної кількості активного агента(тів), містить один або більше ніж один фармацевтично прийнятний носій(і).

Мається на увазі, що термін «фармацевтично прийнятний носій» у тому вигляді, як він тут використовується, включає усі і будь-який носії, розчинники, розріджувачі, ексципієнти, ад'юванти, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові агенти, агенти, що затримують поглинання, і тому подібні, сумісні з введенням суб'єкту і, зокрема, людині.

Термін «терапевтично ефективна кількість» у тому вигляді, як він тут використовується, є достатньою дозою для наміченого застосування. При розгляді профілактичного застосування даний термін означає достатню дозу для попередження або затримки початку і/або

встановлення інфекції мікобактерією (наприклад, інфекції Mtb). Для «терапевтичного» застосування композицію вводять суб'єкту, вже інфікованому видом мікобактерії, з метою лікування активного захворювання або попередження реактивації у латентно інфікованих індивідів, зрештою, у комбінації з одним або більше ніж одним терапевтичним впливом, як тут описано. Зокрема, терапевтично ефективна кількість композиції за винаходом могла б бути тією кількістю, яка необхідна для виклику індукції або стимуляції імунної системи у суб'єкта, якому здійснюється введення (наприклад, приводячи до розвитку природженої і/або специфічної відповіді).

Суб'єктом, що підлягає лікуванню, може бути новонароджений, дитина до 2 років, молодий дорослий або дорослий. Суб'єкта можливо раніше імунізували бацилою Кальметта-Герена (BCG) або раніше лікували проти інфекції мікобактерією перед лікуванням описаним тут активним агентом(ами). Він може бути або може не бути соінфікований іншим патогенним організмом (наприклад, вірусом імунодефіциту людини - ВІЛ).

Зокрема, суб'єкт, що підлягає лікуванню, інфікований вірулентним видом мікобактерії (наприклад, Mtb), який може бути штамом з лікарською стійкістю (наприклад, MDR, XDR або TDR). Інфікуюча мікобактерія може бути тим самим штамом або ізолятом, що і будь-яка з мікобактерій, з якої походять антигени, що містяться в або кодується активним агентом, використовуваним в даному винаході, або вона може бути з іншого штаму або ізоляту.

Композиція за винаходом відповідним чином буферизована для того, щоб підходити для застосування у людини або тварини, при фізіологічному або злегка основному рН (наприклад, від приблизно рН 7 до приблизно рН 9). Відповідні буфери включають, без обмеження, фосфатний буфер (наприклад, PBS (фосфатно-сольовий буферний розчин)), бікарбонатний буфер і/або Tris буфер.

Композиція за даним винаходом, крім того, може містити відповідний розчинник для застосування у людини або тварини. Вона переважно є ізотонічною, гіпотонічною або слабо гіпертонічною і має відносно низьку іонну силу. Типові приклади включають стерильну воду, фізіологічний розчин (наприклад, хлориду натрію), розчин Рінгера, розчини глюкози, трегалози або цукрози, розчин Хенка і інші водні фізіологічно збалансовані сольові розчини (див., наприклад, останнє видання Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins).

Можна використовувати додаткові фармацевтично прийнятні ексципієнти для забезпечення бажаних фармацевтичних або фармакодинамічних властивостей, включаючи, наприклад, модифікацію або підтримання рН, осмолярності, в'язкості, прозорості, кольору, стерильності, стабільності, швидкості розчинення композиції, модифікування або підтримання вивільнення або поглинання у організм людини або тварини, стимулювання транспорту через гематоенцефалічний бар'єр або проникнення у конкретний орган (наприклад, у легеню).

Крім того, композиція за винаходом може містити один або більше ніж один відповідний ад'ювант(ти) для системного введення або нанесення на слизову оболонку у людини. Переважно даний ад'ювант може стимулювати імунітет на композицію за винаходом, особливо імунітет, опосередкований Т-клітинами, наприклад, за допомогою toll-подібних рецепторів (TLR), таких як TLR-7, TLR-8 і TLR-9. Типові приклади корисних ад'ювантів включають, без обмеження, галун, емульсію мінерального масла, таку як повний ад'ювант Фрейнда і неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), ліпополісахарид або його похідне (Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419), сапоніни, такі як QS21 (WO 98/56415), імідазо-хінолінові сполуки, такі як іміквімод (WO2007/147529), цитозинфосфатгуанозинові олігодезоксинуклеотиди, такі як CpG, і катіонні пептиди, такі як IC-31 (Kritsch et al., 2005, J. Chromatogr Anal. Technol Biomed Life Sci 822: 263), або їх будь-яке похідне.

Фармацевтично прийнятні носії, включені у композицію за винаходом, також повинні забезпечувати збереження її стабільності за умов виготовлення і довготривалого зберігання (тобто щонайменше протягом одного місяця, переважно протягом щонайменше одного року) при заморожуванні (наприклад, при -70 °C, -20 °C), охолодженні (наприклад, при 4 °C), температурах навколишнього середовища. Такі «довготривалі» композиції відомі в даній області (наприклад, WO98/02522; WO03/053463). Можна згадати (а) 1 М цукрозу, 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 54 мг/л Tween 80, 10 мМ Tris, рН 8,5, (б) 10 мг/мл маніт, 1 мг/мл HSA (людський сироватковий альбумін), 20 мМ Tris, рН 7,2 і 150 мМ NaCl, і (в) фізіологічний розчин, який особливо адаптований для композиції за винаходом.

Композиція за винаходом може знаходитися у різних формах, наприклад, у твердій, рідкій або замороженій. Тверді (наприклад, сухопорошкові або ліофілізовані) композиції можна отримувати способом, що включає вакуумне сушіння і ліофілізацію. У конкретному утіленні

композицію за винаходом готують для доставки у респіраторний тракт (наприклад, за допомогою інгаляції, інтраназальним або внутрішньолегеневим шляхом) у висушеній розпилюваній формі (див., наприклад, WO2010/135495) або у формі краплинок (з особливою перевагою відносно краплинок, що мають середній діаметр 100-5000 мкм).

5 Імуногенна комбінація, злитий поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, вектор, клітина-господар або композиція за даним винаходом підходять для цілого ряду способів введення. У контексті даного винаходу застосовні будь-які з традиційних шляхів введення, включаючи системний, місцевий шляхи або введення через слизову оболонку.

10 Системне введення включає, наприклад, підшкірну, внутрішньошкірну, внутрішньом'язову, внутрішньовенну, внутрішньоочеревинну, внутрішньосудинну, внутрішньоартеріальну ін'єкцію, а також скарифікацію. Ін'єкції можна робити традиційними шприцами і голками або будь-якими іншими відповідними пристроями, доступними в даній області (наприклад, електропорацією). Введення через слизову оболонку включає, без обмеження, пероральний/з їжею, інтраназальний, внутрішньотрахеальний, внутрішньолегеневий, інтравагінальний або  
15 інтаректальний шлях. Введення у респіраторний тракт може здійснюватися за допомогою розпилювання або створення краплинок аерозолі, спрею або сухопорошкових композицій з використанням відповідного дозатора. Місцеве введення також можна проводити з використанням черезшкірних засобів (наприклад, пластиру і т.п.). У контексті даного винаходу особливо переважними є внутрішньом'язовий, внутрішньошкірний і підшкірний шляхи, а також  
20 інтраназальне, внутрішньотрахеальне і внутрішньолегеневе введення.

Відповідне дозування можна адаптувати як функцію різних параметрів, зокрема, активного агента(тів), що міститься в композиції, способу введення; віку; стану здоров'я і маси суб'єкта; природи і ступеня розвитку симптомів; типу супутнього лікування; частоти лікування і/або потреби у попередженні або терапії. Додаткове уточнення розрахунків, необхідних для  
25 визначення відповідного дозування для лікування, традиційно здійснюється практикуючим лікарем у світлі релевантних обставин.

Що стосується загального керівництва, відповідне дозування для композиції, що містить вірусний вектор, варіює від приблизно  $10^4$  до приблизно  $10^{13}$  vp (вірусні частинки), iu (інфекційні  
30 одиниці) або pfu (бляшкоутворювальні одиниці), залежно від вектора і використовуваної кількісної методики. Доступні методики для оцінки кількості vp, iu і pfu, присутніх у зразку, є традиційними в даній області. Наприклад, число аденовірусних частинок (vp) зазвичай визначають вимірюванням поглинання при 260 нм або HPLC (високоєфективна рідинна хроматографія), титри iu - кількісною імунофлуоресценцією DBP (дибутилфталат), і pfu - підрахунком числа бляшок після інфекції пермісивних клітин. Переважно відношення vp/iu  
35 складає менше 100 згідно керуванню FDA (Федеральне управління з контролю якості харчових продуктів і лікарських засобів). Переважна доза містить від приблизно  $10^5$  до приблизно  $10^{12}$  vp аденовірусного вектора (наприклад, приблизно  $5 \times 10^8$ , приблизно  $10^9$ , приблизно  $5 \times 10^9$ , приблизно  $10^{10}$ , приблизно  $5 \times 10^{10}$  vp або приблизно  $10^{11}$  vp). Для композиції на основі вірусу вісповакцини (наприклад, MVA) переважною є доза від приблизно  $5 \times 10^5$  до приблизно  $10^9$  pfu, з особливою перевагою стосовно приблизно  $5 \times 10^6$ , приблизно  $10^7$ , приблизно  $5 \times 10^7$ , приблизно  
40  $10^8$  або приблизно  $5 \times 10^8$  pfu. Для композиції на основі вірусу кору переважною є доза від приблизно  $5 \times 10^4$  до приблизно  $10^7$  pfu, з особливою перевагою стосовно приблизно  $10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$  або  $5 \times 10^6$  pfu. Композицію на основі плазмідного вектора можна вводити в дозах від 10 мкг до 20 мг, переважно від 100 мкг до 2 мг. Композицію білка можна вводити в дозах від 10 мкг до  
45 20 мг з особливою перевагою стосовно від приблизно 0,1 мг до приблизно 2 мг на кг маси тіла для кожного з мікобактеріальних антигенів, що містяться у композиції. Введення може відбуватися в одній дозі або в дозах, що повторюються, після певного інтервалу часу.

Повторні введення (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 і т.д.) можуть бути відділені одне від одного відповідним періодом часу і здійснюватися однаковим шляхом або різними шляхами введення  
50 або у те саме місце, або в різні місця. Крім того, для кожного введення можна використовувати той самий активний агент(ти) або різні активні агенти. Для ілюстрації, для композицій на основі MVA особливо підходять два або три підшкірних введення, відділених одне від одного приблизно одним тижнем (наприклад, від 3 до 10 діб), тоді як для композицій на основі Ad (аденовірус), вірусу кору і плазмід особливо підходять одне або два внутрішньом'язових  
55 введення. Після першої серії примірующего введення(нь) можна проводити одне або більше ніж одне «нагадувальне» введення (наприклад, через 6 місяців - декілька років) так, щоб нагадувати приміровану імунну відповідь проти мікобактерії. Також можна продовжувати з використанням послідовних циклів введень (наприклад, циклу щотижневих введень), які повторюють після періоду відпочинку.

У конкретному утіленні введення можна здійснювати згідно з методикою примірування-бустінгу, яка включає послідовні введення однієї або більше ніж однієї примірувальної композиції і однієї або більше ніж однієї бустерної композиції. Типово у примірувальній і бустерній композиціях використовуються різні активні агенти, які містять або кодують щонайменше один спільний мікобактеріальний антиген, імуногенний домен або епітоп. Примірувальні і бустерні композиції можна вводити в те саме місце або в різні місця тим самим шляхом або різними шляхами введення. Наприклад, композиції, основані на поліпептиді, можна вводити шляхом через слизову оболонку, тоді як композиції, основані на векторах, переважно ін'єктують, наприклад, за допомогою підшкірного або внутрішньом'язового шляху. Для ілюстрації може розглядатися примірування відповіді господаря живою ослабленою бактерією (такою як BCG) і бустінг щонайменше одним описаним тут «активним агентом» (наприклад, імуногенною комбінацією, злитим поліпептидом, молекулою нуклеїнової кислоти, вектором (наприклад, інфекційна вірусна частинка), або клітиною-господарем за винаходом або будь-якою їх комбінацією).

#### Профілактичне і терапевтичне застосування

Імуногенна комбінація, злитий поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, вектор, клітина-господар або композиція за винаходом переважно призначені для застосування у попередженні або лікуванні інфекції мікобактерією або будь-якого захворювання і патологічного стану, викликаного або асоційованого з нею. Таке застосування націлене на індукування або стимулювання захисних імунних відповідей проти мікобактеріального антигена/епітопу.

В одному утіленні імуногенна комбінація, злитий поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, вектор, клітина-господар або композиція за винаходом призначені для застосування у способах попередження інфекції або зменшення ризику інфекції мікобактерією у суб'єкта, що потребує цього, особливо у суб'єкта, який перебував у тісному контакті з інфікованим індивідом, у якого розвинулося активне захворювання, і, таким чином, піддається ризику розвитку інфекції мікобактерією (наприклад, передача бацил інгаляцією у краплинках вологи, яку відкашлює індивід з ТВ).

В іншому утіленні імуногенна комбінація, злитий поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, вектор, клітина-господар або композиція за винаходом призначені для застосування у способах лікування активного захворювання у суб'єкта, інфікованого видами мікобактерій і особливо Mtb, причому даний спосіб включає стадію введення інфікованому суб'єкту, що має розвинуте активне захворювання, терапевтично ефективної кількості щонайменше одного з описаних тут імуногенної комбінації, злитого поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора, клітини-господаря або композиції таким чином, щоб індукувати імунну відповідь проти інфікуючого виду мікобактерії, за допомогою цього відкладаючи або зменшуючи ризик розвитку активного захворювання.

Термін «активне захворювання» відноситься до інфекції мікобактерією з проявом серйозних симптомів захворювання. Наприклад, у людського суб'єкта ТВ характеризується загальними клінічними ознаками (такими як втрата маси тіла, астения, лихоманка, потіння уві сні), клінічними ознаками і/або симптомами (такими як кашель, кровохаркання, біль у грудях у разі легеневого ТВ), і/або в деяких випадках позалегеновими ознаками згідно з місцями інфекції (такими як лімфатичні вузли, кісткові форми, менінгіт, урогенітальні форми).

У ще одному іншому утіленні імуногенна комбінація, злитий поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, вектор, клітина-господар або композиція за винаходом призначені для застосування у способах попередження або лікування реактивації у суб'єкта, латентно інфікованого видом мікобактерій і особливо M. tuberculosis, причому даний спосіб включає стадію введення вказаному латентно інфікованому суб'єкту терапевтично ефективної кількості щонайменше одного з описаних тут імуногенної комбінації, злитого поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора, клітини-господаря або композиції таким чином, щоб індукувати імунну відповідь проти інфікуючого виду мікобактерії, за допомогою цього попереджуючи або затримуючи реактивацію.

Під «латентно інфікованим суб'єктом» мається на увазі індивід, який вже інфікований вірулентним видом мікобактерії (наприклад, Mtb), але не демонструє симптомів, що проявляються, або клінічних ознак захворювання. Типово латентно інфікований суб'єкт, що зберігає мікобактерію в його організмі, не є клінічно хворим, але зберігає ризик подальшого прогресування до клінічного захворювання (реактивації), особливо у контексті ослаблення імунітету (наприклад, соінфекція іншим патогеном, таким як ВІЛ, або імунодепресивне лікування, як, наприклад, інгібіторами TNFα). Очікуватиметься, що латентно інфікований Mtb суб'єкт є позитивним при проведенні у нього будь-якого аналізу, що забезпечує діагноз інфекції

Mtb (наприклад, туберкулінова проба, аналіз Манту на реактивність відносно PPD (очищене білкове похідне) і/або аналізи на вивільнення IFNg).

Термін «реактивація» відноситься до пізнішого прояву симптомів захворювання, що з'являються, асоційованого з мікобактерією, у суб'єкта, який дає позитивну реакцію на інфекцію мікобактерією, але не проявляє явних симптомів захворювання. Наприклад, реактивація може відбуватися у інфікованого суб'єкта, який раніше можливо проявляв або не проявляв симптоми активного захворювання, або якого достатньою мірою лікували для того, щоб перевести інфекцію в латентний стан. Наприклад, суб'єкт, інфікований Mtb, був раніше імунізований BCG або піддавався раніше лікуванню проти інфекції Mtb (наприклад, одним або більше ніж одним хіміотерапевтичним лікарським засобом «першої лінії»).

У конкретному утіленні імуногенна комбінація, злитий поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, вектор, клітина-господар або композиція за винаходом призначені для застосування як бустер BCG для збільшення ефективності вакцинації BCG у вакцинованого суб'єкта.

Асоціація з хіміотерапією

Імуногенну комбінацію, злитий поліпептид, молекулу нуклеїнової кислоти, вектор, клітину-господаря або композицію за винаходом можна використовувати у асоціації з однією або більше ніж однією традиційною терапією, наприклад, одним або більше ніж одним хіміотерапевтичним лікарським засобом, ефективним проти інфекції мікобактерією (наприклад, інфекції Mtb).

Хіміотерапія типово визначається практикуючим лікарем, з використанням сучасної практики. Приклади таких хіміотерапевтичних лікарських засобів включають, без обмеження, антибіотик(ки), а також маленькі інгібуючі молекули прямої і непрямой дії, антитіла і імунотерапевтичні агенти, як описано в даній області. Типово хіміотерапія антибіотиками «першої лінії», використовується в даний час для лікування інфекції Mtb, яка не є стійкою до лікарських засобів, включає ізоніазид, рифаміцини (тобто рифампін, рифапентин і рифабутин), етамбутол, стрептоміцин, піразинамід і фторхінолони. Хіміотерапія «другої лінії», використовується для лікування інфекції Mtb, яка продемонструвала лікарську стійкість до однієї або більше ніж однієї терапії «першої лінії», включає офлоксацин, ципрофлоксацин, етіонамід, аміносаліцилову кислоту, циклосерин, амікацин, канаміцин і капреоміцин. Один або більше ніж один хіміотерапевтичний засіб зазвичай вводять протягом відповідного періоду часу, наприклад, протягом одного або декількох місяців (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 або 12 місяців) або довше. Відповідним є щодобове введення доз від 200 мг до 600 мг (наприклад, 300 мг або 400 мг) впродовж періоду часу, що варіює від 6 до 12 місяців.

В одному утіленні імуногенна комбінація, злитий поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, вектор, клітина-господар або композиція за винаходом призначені для застосування для зменшення тривалості хіміотерапії проти інфекції мікобактерією (наприклад, Mtb). Зазвичай введення описаного тут активного агента(тів) забезпечуватиме збільшення ефективності хіміотерапії (наприклад, зменшення тривалості і/або тяжкості клінічних ознак, поліпшення показника перетворення мокроти і т.д.), зменшення тривалості хіміотерапії і/або числа використовуваних хіміотерапевтичних лікарських засобів, особливо коли інфікуючі мікобактерії стійкі до лікарських засобів.

Згідно з даним винаходом імуногенну комбінацію, злитий поліпептид, молекулу нуклеїнової кислоти, вектор, клітину-господаря або композицію за винаходом можна вводити до, супутньо з або після введення одного або більше ніж одного хіміотерапевтичного лікарського засобу. В одному утіленні описаний тут активний агент вводять щонайменше через 2 тижні після початку введення хіміотерапії.

У переважному утіленні імуногенна комбінація, злитий поліпептид, молекула нуклеїнової кислоти, вектор, клітина-господар і/або композиція за винаходом призначені для застосування для індукції або посилення імунної відповіді у суб'єкта, якому здійснюється введення. Відповідно, даний винахід також охоплює спосіб індукції або стимулювання імунної відповіді проти мікобактеріального антигена при введенні суб'єкту імуногенної комбінації, злитого поліпептиду, молекули нуклеїнової кислоти, вектора, клітини-господаря і/або композиції за винаходом.

Індукована або стимульована імунна відповідь може бути специфічною (тобто спрямованою на мікобактеріальні епітопи/антиген) і/або неспецифічною (вродженою), гуморальною і/або клітинною. У контексті даного винаходу імунна відповідь переважно є відповіддю Т-клітин CD4+ або опосередкованою CD8+ або обома, спрямованою на мікобактеріальний антиген/епітоп.

Здатність описаного тут активного агента(тів) індукувати або стимулювати імунну відповідь можна оцінювати або *in vitro*, або *in vivo* з використанням цілого ряду прямих або непрямих аналізів, які стандартні в даній області. Тестування і підтвердження також проілюстровані у доданому розділі прикладів.

Наприклад, оцінювання індукції неспецифічного імунітету можна здійснювати вимірюванням клітин NK/NKT (наприклад, репрезентативність і рівень активації), а також каскадів продукції цитокінів, споріднених IFN, і/або хемокінів, активації TLR та інших маркерів вродженого імунітету (наприклад, Riano et al., 2012, Tuberculosis 92: 148-59).

5 Здатність стимулювати гуморальну відповідь можна визначати за збільшенням титру антитіла, яке є специфічним стосовно щонайменше одного з описаних тут антигенів, що містяться в або кодованих імунногенною комбінацією, і злитих поліпептидів. Типові методики включають, без обмеження, зв'язування антитіла, конкурентне зв'язування, а також ELISA і вестерн-блотінг.

10 Оцінювання клітинного імунітету можна здійснювати, наприклад, за збільшенням частоти імунних клітин, таких як Т-лімфоцити, специфічних стосовно щонайменше одного з описаних тут мікобактеріальних антигенів, що містяться в або які кодують імунногенною комбінацією, і злитого поліпептиду. Також можна відстежувати проліферацію клітин при радіоактивному міченні (наприклад, аналізи проліферації Т-клітин за допомогою аналізу включення [<sup>3</sup>H]тимідину). Іншим  
15 чутливим способом детектування імунної відповіді є метод імуоферментних плям, в якому визначається частота клітин, що продукують IFN $\gamma$ . Цитотоксичну здатність антигенспецифічних Т-лімфоцитів також можна оцінювати у сенсibilізованого суб'єкта або за допомогою імунізації відповідних тваринних моделей. Також можна здійснювати кількісне вимірювання вивільнення релевантного цитокіну(нів) Th1 і/або Th2, який продукують активовані Т-клітини, з  
20 використанням загальноприйнятих біопроб (наприклад, за допомогою проточної цитометрії з мультипараметричною оцінкою (ICS), за допомогою аналізу профілю цитокінів з використанням мультиплексних технологій або ELISA і т.д.). Для визначення присутності мРНК, що кодує релевантні цитокіни, також можна використовувати методики ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція). Для фахівця в даній області буде зрозуміло, що значуще збільшення або зменшення  
25 кількості таких релевантних цитокінів можна використовувати для оцінювання імунногенної активності одного або більше ніж одного з описаних тут активних агентів.

Нарешті, захисну імунну відповідь можна оцінювати *in vivo* у відповідній експериментальній тварині, наприклад, миші, щурі або морській свинці (див. Ashwin et al., 2008, Am J Resp, 39: 503-8; Acosta et al., 2011, Malays J Med, 18: 5-12), наприклад, за допомогою вимірювання зменшення  
30 мікобактеріальних колонієутворювальних одиниць (cfu) з гомогенатів селезінки, легені або інших тканин, виділених з тварин, які отримували заражувальну інфекцію вірулентним штамом виду мікобактерії (наприклад, Mtb) після попередньої імунізації одним або більше ніж одним описаним тут активним агентом, у порівнянні з мікобактеріальними cfu в контрольній групі експериментальних тварин, інфікованих таким самим вірулентним штамом мікобактерії, але які  
35 не були раніше імунізовані. Порівняння між обробленими і необробленими групами також можна оцінювати за виживанням тварин (підвищене виживання в обробленій групі корелюватиме із захисною імунною відповіддю).

Такі імунологічні показники є хорошим корелятом захисної імунної відповіді проти інфекції мікобактерією, наданої описаним тут активним агентом(тами).

40 Захисну відповідь, надану імунногенною комбінацією, злитим поліпептидом, молекулою нуклеїнової кислоти, вектором, клітиною-господарем або композицією за винаходом, також можна оцінювати при введенні людському суб'єкту згідно з описаними тут діями за перевищенням над початковим рівнем або над очікуваним рівнем у разі відсутності обробки. Захисну відповідь можна підтверджувати за допомогою будь-якого релевантного клінічного  
45 вимірювання, яке типово використовують практикуючі лікарі, або інший кваліфікований медичний персонал, що включає, наприклад, наступні:

- зменшення частоти виникнення захворювання і/або поширення, і/або частоти у даного населення, такого як китайське населення або населення мігрантів у даній країні (наприклад, менша частка нових індивідів, у яких було діагностовано інфекцію мікобактерією, або схильних  
50 до ризику розвитку інфекції мікобактерією або із захворюванням, асоційованим з інфекцією мікобактерією, у групі, що отримала описаний тут активний агент(ти);

- вища процентна частка показника перетворення мокроти в групі суб'єктів, що піддавалися лікуванню;

- вища процентна частка вилікування активного захворювання в групі суб'єктів, що  
55 піддавалися лікуванню;

- зменшення ступеня передачі мікобактерії після тісного контакту з інфікованим суб'єктом (наприклад, зменшення або відстрочення ризику інфікування або ризику розвитку активного захворювання і/або зменшення або відстрочення ризику реактивації у латентно інфікованих суб'єктів);

- зменшення інтенсивності хворобливого стану (наприклад, зменшення бактерійних cfu у тканині-мішені або в біологічному зразку; ослаблення симптомів захворювання або їх тяжкості (наприклад, числа і/або тяжкості уражень в органі-мішені) або стабілізація (не погіршення) хворобливого стану); і

- 5 - поліпшена відповідь суб'єкта, що піддавався лікуванню, на супутнє лікування (зменшення потреби, числа, тривалості введення і/або доз традиційних хіміотерапевтичних лікарських засобів).

У контексті даного винаходу захисна відповідь може бути тимчасовою (протягом двох тижнів після завершення введення) або тривалою (протягом декількох місяців або років). Оскільки природний хід змін клінічного стану може значно варіювати від одного суб'єкта до іншого, не потрібно, щоб захисна відповідь спостерігалася у кожного суб'єкта, що піддавався лікуванню, але у значного числа суб'єктів (наприклад, статистично значущі відмінності між двома групами можна визначати будь-яким статистичним критерієм, відомим в даній області, таким як параметричний критерій Тьюки, критерій Крускала-Уолліса і U-критерій Манна-Уїтні, t-критерій Стьюдента, критерій Вілкоксона і т.д.).

15 Такі вимірювання можна здійснювати до введення описаного тут активного агента(тів) (початковий рівень) і в різні моменти часу впродовж лікування і щонайменше протягом декількох (наприклад, 12) тижнів після припинення лікування.

Як загальне керування, інфекцію мікобактерією і асоційоване захворювання можна детектувати різними способами. Наприклад, інфекцію Mtb також можна визначати цілим рядом способів, що є зараз у клінічному застосуванні, такими як туберкуліновий шкірний аналіз Манту (TST), аналіз квантиферону, а також детекція in vitro відповідей на HBHA (гемаглютинін, що зв'язує гепарин; Hougardy et al., 2007; PLoS One 2(10): e926) або детекція IP10 після стимуляції in vitro ESAT6, CFP10 і TB7.7 (Ruhwald et al., 2008; Microbes Infect 9: 806-12). Суб'єктів, у яких розвивається активне захворювання, можна діагностувати згідно сучасній практиці. Для ілюстрації, діагноз ТВ оснований на детекції бактерії, що викликає захворювання, в клінічних зразках за допомогою мікроскопії, культуральних методик, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і її різних похідних. Також можна застосовувати способи відбитків пальців на основі ДНК і споліготипування. Мікобактеріальна культура є способом, що являє собою золотий стандарт для ідентифікації ізоляту комплексу *Mycobacterium tuberculosis* і проведення аналізу на чутливість до лікарського засобу. Для підтримки виявлення активного легеневого і/або позалегеневого захворювання також можна застосовувати рентгенівські методики і клінічні спостереження. З іншого боку, для діагностики інфекції Mtb розробили численні серологічні аналізи з використанням безлічі антигенів для детекції циркулюючих антитіл, включаючи реакції зв'язування комплекменту, аналізи гемаглютинації, радіоімуноаналіз і твердофазні імуносорбентні аналізи (ELISA).

#### Антитіло

У іншому аспекті даний винахід відноситься до антитіла, яке селективно зв'язується з щонайменше одним мікобактеріальним антигеном, що міститься в або який кодується імунотенною комбінацією, або зі злитим поліпептидом, за даним винаходом.

Термін «антитіло» у тому вигляді, як він тут використовується, охоплює будь-який поліпептид, який містить антигензв'язуючий фрагмент або антигензв'язуючий домен і селективно зв'язується з білком-мішенню, причому при зв'язуванні з білком-мішенню він значущо не зв'язується з неспорідненим білком. У певних випадках слід було б розуміти, що зв'язування антитіла з білком-мішенню все ще є селективним, не дивлячись на деяку міру перехресної реактивності. Типово зв'язування між антитілом і антигеном вважається специфічним, коли константа асоціації  $K_d$  більша, ніж  $10^{-6}$  М. Придатні умови для зв'язування, такі як концентрація антитіла, йонна сила розчину, температура, час, потрібний для зв'язування, концентрація блокуючого агента (наприклад, сироватковий альбумін, казеїн молока) і т.д. можуть бути оптимізовані фахівцем з використанням традиційних методик.

Антитіло за даним винаходом може бути поліклональним, моноклональним, моноспецифічним, поліспецифічним, людським, гуманізованим, однокланцевим, химерним, синтетичним, рекомбінантним, а також будь-яким фрагментом таких антитіл, які зберігають зв'язування антигена, включаючи фрагменти Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv і scFv, але не обмежуючись ними.

55 Антитіла за даним винаходом можна отримувати з використанням традиційних в даній області методик, наприклад, після введення тварині (наприклад, кролику, коню і т.д.) ефективною кількістю будь-якого описаного тут мікобактеріального антигена, злитого білка і/або його пептидного фрагмента, або за допомогою дисплея (наприклад, фагового, дріжджового або рибосомного дисплея), або гібридомних методик. Загальна методологія отримання моноклональних антитіл добре відома в даній області.



Антитіло за даним винаходом може бути надане у виділеній формі, в розчині (наприклад, тваринна антисироватка) або в клітинах-господарях (наприклад, гібридоми). Крім того, його можна кон'югувати з відповідними мітками (детектовними або функціональними мітками), включаючи радіоактивні ( $^{131}\text{I}$  або  $^{99}\text{Tc}$  і т.д.), ферментативні (пероксидаза хрину, лужна фосфатаза і т.д.) і хімічні (наприклад, біотин і т.д.) мітки.

Антитіла за даним винаходом мають безліч потенційних застосувань, які знаходяться в межах об'єму даного винаходу. Наприклад, такі антитіла можна використовувати (а) як реактиви в аналізах для детекції мікобактеріального антигена, використовованого в даному винаході, (б) як реактиви в аналізах для детекції присутності мікобактерії в біологічному зразку і/або (в) як інструменти для детекції і/або виділення рекомбінантно продукованих мікобактеріальних антигенів і злитого поліпептиду згідно способу за винаходом з суміші білків та інших домішок (наприклад, забезпечуючи очищення афінною хроматографією або імуноосадженням з клітин-господарів які культивують). Їх також можна використовувати з терапевтичною метою, наприклад, для лікування суб'єкта після впливу мікобактерії (наприклад, пасивна імунотерапія).

В одному утіленні даний винахід відноситься до способу детекції і/або кількісного вимірювання мікобактеріального антигена в біологічному зразку (наприклад, плазмі, сироватці, мокроті і т.д.), узятому у суб'єкта, інфікованого або чутливого до інфекції мікобактерією, з використанням антитіла за винаходом, який включає етапи приведення зазначеного біологічного зразка у контакт з антитілом за винаходом як реактивом за умов, що забезпечують утворення комплексу між мікобактеріальним антигеном і реактивом у вигляді антитіла, і детектування і/або кількісне вимірювання утворення зазначеного комплексу будь-яким відповідним способом. Детектування присутності мікобактеріального антигена-мішені вказує на інфекцію мікобактерією (наприклад, *Mtb*).

В іншому утіленні даний винахід відноситься до способу детекції і/або кількісного вимірювання антитіл, спрямованих на мікобактерію, в біологічному зразку (наприклад, плазма, сироватка і т.д., узятому у суб'єкта, інфікованого або чутливого до інфекції мікобактерією), який включає етапи приведення зазначеного біологічного зразка у контакт з реактивом, що містить будь-яку імуногенну комбінацію, злитий поліпептид, молекули нуклеїнової кислоти, вектори, інфекційні вірусні частинки, клітини-господарі за винаходом, за умов, що забезпечують утворення комплексу між антитілом і мікобактеріальним антигеном/епітопом, що міститься або кодується будь-яким з вищезазначених реактивів, і детектування і/або кількісне вимірювання утворення зазначеного комплексу будь-яким відповідним способом. Детектування присутності специфічного антитіла вказує на інфекцію мікобактерією (наприклад, *Mtb*).

Фахівець у даній області легко визначить кількість реактиву, що підлягає застосуванню в способах за винаходом. Способи детекції і/або кількісного вимірювання комплексу антиген/антитіло традиційні і добре відомі фахівцям в даній області. Як ілюстрацію, можна згадати блотінги, ELISA, так звані методики сендвічу, конкурентні методики і методики ПЛР, зокрема так звані методики «в реальному часі». Застосування вищезазначеного реактиву може полегшуватися зв'язуванням (наприклад, фізичним зв'язуванням) з речовиною, яку детектують. Приклади речовин, які детектують, включають різні ферменти (наприклад, пероксидазу хрину, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу), простетичні групи (наприклад, стрептавідин/біотин або авідин/біотин), флуоресцентні речовини (наприклад, умбеліферон, флуоресцеїн або похідні флуоресцеїну), люмінесцентні речовини, біоломінесцентні речовини (наприклад, люцифераза, люциферин або екворин) і радіоактивні речовини (наприклад,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  або  $^3\text{H}$ ).

Даний винахід також стосується набору реактивів для діагностики інфекції мікобактерією (наприклад, *Mtb*) для аналізу антигена, що включає антитіло за винаходом, і для аналізу антитіла, що включає імуногенну комбінацію, злитий поліпептид, молекулу нуклеїнової кислоти, вектор, клітину-господаря, композицію за винаходом.

Всі вищезазначені розкриття патентів, публікації і записи в базах даних конкретно включені сюди за допомогою посилання у всій їх повноті в тому ступені, як було б, якби кожний такий індивідуальний патент, публікація або запис були конкретно і індивідуально вказані як включені за допомогою посилання.

Опис графічних матеріалів

Фіг. 1 демонструє схематичне представлення різних злитих поліпептидів антигенів *Mtb*, які були отримані і використовувалися, як описано в доданому розділі Прикладів. "SS" позначає сигнальний пептид, "TM" – трансмембранний домен, "F" - мітка Flag, "M" - мітка Мус, і "H" - His мітка. \* вказує модифікацію антигена *Mtb* по відношенню до нативного аналога. На даній Фіг. також згадані № злитого поліпептиду, і посилання на експресуючий плазмідний вектор (pTGXXXXX) у тому вигляді, в якому вони використовуються нижче.

Фіг. 2 ілюструє експресію індивідуальних генів *Mtb* визначену вестерн-блотінгом з подальшою імунодетекцією специфічними антитілами.  $2 \times 10^6$  клітин HEK293 трансфікували 5 мкг ДНК з використанням ліпофектаміну 2000. Протеасомний інгібітор MG132 додавали у культуральне середовище через 18 год після трансфекції. Лізати клітин, відібрані після 48 год культури, аналізували електрофорезом на 10%-ному гелі Criterion, і імунодетекцію проводили з використанням кролячої антисироватки, розведеної 1/1000, такої, що розпізнає Rv2029\* (Фіг. 2A), RPFB-Dhyb (Фіг. 2B), і наявних у продажу антитіл, що розпізнають ESAT-6 (Фіг. 2C) і Rv2626 (Фіг. 2D).

Фіг. 3 ілюструє аналіз за допомогою вестерн-блотінгу гібридів *Mtb*, що охоплюють антигени латентної фази (pTG18295, що кодує гібрид №9), антигени активної фази (pTG18296, що кодує гібрид №10), антигени фази поживавлення (pTG18307, що кодує гібрид №12) і антигени і фази поживавлення, і активної фази (pTG18297, що кодує гібрид №11), з подальшою імунодетекцією Flag. +/- показує з або без MG132.

Фіг. 4 ілюструє аналіз за допомогою вестерн-блотінгу гібридів *Mtb*, що включають TB10.4 (Фіг. 4A), Rv0569 (Фіг. 4B) і Rv2626 (Фіг. 4C) відповідно, з подальшою імунодетекцією з використанням наявного у продажу антитіла проти TB10.4 (ABIN361292), кролячої антисироватки проти Rv0569 і мишачого моноклонального антитіла 26A11 проти Rv2626.

Фіг. 5 ілюструє клітини, що продукують IFN $\gamma$ , індуковані після імунізації тварин плазмідами, що кодують гібрид, pTG18266 (SS-Ag85B-TB10.4-ESAT6-TM; Фіг. 5a), pTG18296 (цитоплазматичний Ag85B-TB10.4-ESAT6; Фіг. 5b), сумішшю плазмід pTG18310, pTG18315 і pTG18308, що кодують індивідуальні антигени Ag85B, TB10.4 і ESAT6 (Figure 5c) і pGWiz (Фіг. 5d). Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами.

Фіг. 6 ілюструє клітини, що продукують IFN $\gamma$ , індуковані після імунізації тварин плазмідами, що кодують гібрид, pTG18268 (SS-RPFB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6-TM; Фіг. 6a), pTG18297 (цитоплазматичний RPFB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6; Фіг. 6b), сумішшю плазмід pTG18307, pTG18310, pTG18315 і pTG18308, що кодують індивідуальні антигени RPFB-Dhyb, Ag85B, TB10.4 і ESAT6 (Фіг. 6c) і pGWiz (Фіг. 6d). Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами.

Фіг. 7 ілюструє клітини, що продукують IFN $\gamma$ , індуковані після імунізації тварин плазмідами, що кодують гібрид, pTG18267 (SS-RPFB-TM; Фіг. 7A), pTG18307 (цитоплазматичний RPFB-Dhyb; Фіг. 7B) і pGWiz (Фіг. 7C). Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами, що охоплюють антигени RpfB і RpfD.

Фіг. 8 ілюструє клітини, що продукують IFN $\gamma$ , індуковані після імунізації тварин плазмідами, що кодують гібрид, pTG18269 (SS-Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TM; Фіг. 8a), pTG18295 (цитоплазматичний Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807; Фіг. 8b), сумішшю плазмід pTG18301, pTG18303, pTG18300, pTG18304 і pTG18302, що кодують індивідуальні антигени Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807 (Фіг. 8c) і pGWiz (Фіг. 8d). Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами.

Фіг. 9 ілюструє аналіз SDS-PAGE очищеного Rv2626 (Фіг. 9A), злиття RPFB-Dhyb (Фіг. 9B) і TB10.4 (Фіг. 9C).

Фіг. 10 ілюструє клітинну імунну відповідь, яку продукують після імунізації тварин плазмідною, що кодує гібрид, pTG18323 (Rv2029 - Rv2626 - Rv1733 - Rv0111; Фіг. 10a) або pGWiz (Фіг. 10b). Клітини, що продукують IFN $\gamma$ , оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами. Кожний стовпчик є відповіддю однієї миші (7 мишей/групу).

Фіг. 11 ілюструє клітинну імунну відповідь, індуковану після імунізації мишей (a) MVATG18365 (Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111 + RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6 без SS/TM) або (b) MVATG18364 (Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111 + RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6). Клітини, що продукують IFN $\gamma$ , оцінювали через один тиждень після ін'єкції MVA за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами. Кожний стовпчик є відповіддю індивідуальної миші (5 мишей/групу).

Фіг. 12 узагальнює рівні відповіді IFN $\gamma$  у мишей BALB/c, вакцинованих всіма кандидатами на основі MVA, отриманими згідно фази захворювання TB або біохімічному мотивуванню. Клітини, що продукують IFN $\gamma$ , оцінювали через один тиждень після ін'єкції MVA за допомогою аналізів

IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами 14 антигенів Mtb. Інтенсивність детектованих відповідей рангується згідно кратності збільшення значення медіани (плям/10<sup>6</sup> спленоцитів) для кожної повторної стимуляції по відношенню до значення відсікання з використанням кодування кольором (див. легенду з варіюванням -, +, ++, +++). Квадратики зі штрихуванням означають те, що антиген відсутній в даній вакцині на основі MVA.

Фіг. 13 ілюструє клітинну імунну відповідь, індуковану після імунізації трансгенних мишей HLA-A2 (a) MVATG18376 (Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111 + RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6 + Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807) або (в) порожнім MVATGN33.1. Клітини, що продукують IFN $\gamma$ , оцінювали через один тиждень після ін'єкції MVA за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами. Кожний стовпчик є відповіддю індивідуальної миші (6 мишей/групу).

Фіг. 14 ілюструє клітинну імунну відповідь, індуковану після імунізації мишей C3H/HeN (a) MVATG18377 (Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111 + RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6 без SS/TM + Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807) або (b) порожнім MVATGN33.1. Клітини, що продукують IFN $\gamma$ , оцінювали через один тиждень після ін'єкції MVA за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами. Кожний стовпчик є відповіддю індивідуальної миші (6 мишей/групу).

Фіг. 15 узагальнює рівні відповіді IFN $\gamma$  у трансгенних мишей HLA-A2, C57BL/6 і C3H/HeN, вакцинованих зазначеними кандидатами на основі MVA. Клітини, що продукують IFN $\gamma$ , оцінювали через один тиждень після ін'єкції MVA за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* специфічними пептидними пулами 14 антигенів Mtb. Інтенсивність детектованих відповідей рангували згідно кратності збільшення значення медіани (плям/10<sup>6</sup> спленоцитів) для кожної повторної стимуляції по відношенню до значення відсікання з використанням кодування кольором (див. легенду з варіюванням -, +, ++, +++). Квадратики зі штрихуванням означають те, що антиген відсутній в даній вакцині на основі MVA.

#### Матеріали і методи

##### Аналітичні методи

Існуючі дані по антигенам Mtb досліджували з доступної літератури і баз даних з метою ідентифікації першого набору генів/антигенів Mtb, які можуть бути корисними в імунотерапевтичній вакцині, здатній викликати імунітет проти ТВ упродовж усіх фаз природного ходу інфекції.

Вибрані антигени потім вносили до системи бальної оцінки аналізу даних, яка була розроблена для розшифровки і порівняння даних з різних джерел. Генерували загальний кінцевий «бал», що відображає значення для кожного антигена. Даний бал бере до уваги імуногенний потенціал антигена, а також його здатність захищати від інфекційного зараження у тваринних моделях і у людей (наприклад, дані по захисту у людей даватимуть більший бал, ніж індукування імуногенності у тваринних моделях). Як тільки зібрані всі дані для конкретного антигена, кожній категорії надається оцінка від 0 до 5, причому 0 є найгіршою можливою оцінкою, тоді як 5 є найкращою. Вибір оцінки також був оснований на якості даних (наприклад, на правильних контролях, використаних в експериментах, суворій інтерпретації), але також і на надійності даних (наприклад, на числі повторів експериментів, числі публікацій, що підтверджують/підтримують відкриття).

##### Біохімічні аналізи антигенів *in silico*

Біохімічні і біологічні дані також є ключовими даними для оптимізації експресії і конструкції злиття, дозволяючи передбачати потенційні проблеми з експресією. Наприклад, біологічні функції білка можуть приводити до потенційної токсичності, що призводить до генетичної нестабільності і/або негативного профілю безпеки при опосередкованій вектором експресії. Крім того, розгортання білка може впливати на стабільність і рівні експресії через вищу швидкість деградації у клітині.

Для всіх антигенів Mtb проводили широкий бібліографічний пошук для того, щоб краще зрозуміти і охарактеризувати структуру і функції даних білків.

Крім того, для характеристики антигенів Mtb також здійснювали біохімічне і біоінформаційне прогнозування. Для того, щоб подивитися на передбачені епітопи молекул HLA класу I і II використовували біоінформаційні інструменти прогнозування (Nielsen et al., 2007 PLoS One 2: e796; Nielsen et al., 2008, PLoS Comput Biol 4: e1000107). Ідентифікація даних епітопних областей може бути корисною для оптимізації вибраних антигенів Mtb або для полегшення розробки імунних аналізів.

Крім того, обширні аналізи прогнозування структури *in silico* проводили для того, щоб прогнозувати біохімічні властивості і/або біологічні властивості і, таким чином, забезпечувати відбір і конструювання антигенів Mtb (наприклад, з'ясування, чи експресується повнорозмірна нативна форма, або чи потрібні модифікації).

5 Конкретніше:

- Пошук структурних гомологів в банку даних білків (PDB). Використовуваною програмою була BLASTP з параметрами за умовчанням, і вибраною базою даних була NPS@ 3D SEQUENCES (від PDB). Цей пошук забезпечує знаходження спектрів ЯМР (ядерний магнітний резонанс) або кристалічних структур антигена або білків з гомологіями послідовності більше, ніж 25%. 3D (3-вимірні) структури візуалізували з використанням системи перегляду CN3D 4.1 або PDB.

10 - Пошук у базах даних UNIPROT-SWISSPROT або TB. Білки-гомологи антигенів Mtb, що цікавлять, шукали в базі даних UNIPROT-SWISSPROT з використанням первинних структур як пошукового запиту і пошуку BLAST у NPS@. Використовуваною програмою була BLASTP з параметрами за умовчанням, і вибраною базою даних була UNIPROT-SWISSPROT; записи UNIPROT-SWISSPROT дають доступ до загальної інформації з функції білка, доменам, потенційним сигнальним пептидам, посттрансляційним модифікаціям, а також бібліографічні посилання. Загальну інформацію (наприклад, функції генів, генетичний зв'язок між генами, фенотипи і мутації, асоційовані з генами, імуногенність, а також бібліографічні посилання) про вибрані антигени Mtb витягували з використанням назви білка Rv як пошукового запиту в базі даних TB.

20 - Прогнозування сигнальних пептидів: ці короткі послідовності на N-кінці часто прогножуються у вигляді трансмембранних доменів, але вони відсутні у нативних і зрілих білках. Про присутність сигнального пептиду для певних антигенів повідомляла база даних UNIPROT-SWISSPROT або використання прихованої моделі Маркова сигнального алгоритму v3.0.

За відсутності збігів під час пошуку гомологів здійснювали додаткові пошуки:

25 - Прогнозування потенційних трансмембранних доменів (ТМ) з використанням трьох різних програм (наприклад, способу щільного вирівнювання на поверхні (DAS), алгоритму ТМНММ і TopPred0.01). Спостереженням авторів винаходу є саме те, що присутність таких гідрофобних ТМ доменів може погіршувати генетичну стабільність відповідного антигена при експресії у вірусних векторах, таких як MVA.

30 - Пошук на відомий мотив білка, асоційований з білковими доменами, родинами і функціональними сайтами з використанням PROSITE SCAN.

35 - Прогнозування вторинних структур з використанням декількох способів прогнозування (а саме: SOPM, MLRC, HNN, DSC, PHD, PREDATOR). Вторинну структуру вважали високоімовірною, якщо 6 даних способів прогнозували її. Вторинну структуру вважали можливою, якщо 3 з 6 способів прогнозували її.

40 - Аналіз гідрофобних кластерів (HCA). Спосіб HCA оснований на істотних характеристиках згортання білка: гідрофільній/гідрофобній дихотомії і гідрофобній компактності глобулярних доменів білка. Графіки HCA використовували для ідентифікації гідрофобних кластерів уздовж послідовності білка. Ці кластери характерні для згорнутих білків з прихованим гідрофобним ядром. Вважали, що антиген імовірно має згорнутий стан, якщо гідрофобні кластери були присутні щонайменше в деякій частині білка.

45 - Прогнозування неупорядкованих областей у нативному стані, яке забезпечує ідентифікацію розгорнутих областей (прогнозування MetaRrDOS). Даний аналіз доповнює графік HCA шляхом прогнозування областей білка, які не згорнуті. Всі області, що перевищують поріг 0,5 (тенденція до неупорядкованості), вважалися розгорнутими частинами білка. Слід зазначити, що більшу частину часу N- і С-кінцеві частини білків є незгорнутими в їх нативному стані. За присутності таких відрізків на кінцях з довжиною менше, ніж 10 залишків, їх приймали як потенційні лінкери для злиття.

50 - Прогнозування суперспіралі (з використанням програми COILS). Стан олігомеризації антигена міг би впливати на конструкцію злиття антигена. Домен у вигляді суперспіралі прогнозували, якщо імовірність на виході демонструвала значення 1 для частини білка з щонайменше 14 залишками у вікні для аналізу.

55 Крім того, проводили вирівнювання послідовностей для того, щоб підтвердити, що вибрані антигени Mtb консервативні серед різних штамів і ізолятів Mtb. Конкретніше, множинні вирівнювання послідовностей між амінокислотною послідовністю кожного вибраного антигена (наведені як приклад антигени Mtb походять зі штаму H37Rv) і його еквівалента з 11 інших штамів Mtb (клінічні ізоляти) і *M. bovis*, які були ідентифіковані в базах даних білків (пошук BLASTP) проводили з використанням Clustal W2 (@.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Як

результат, антигени ТВ демонстрували високу консервативність серед 12 проаналізованих штамів мікобактерій з процентною часткою ідентичності, що варіює від 100% до 96%, залежно від антигена і штаму мікобактерії. Головний виняток спостерігали з Rv3478, для якого виявили тільки 88%-ну ідентичність між послідовностями H37Rv і CDC1551.

5 Нарешті, іншим ключовим критерієм для досягнення кінцевого вибору антигена ТВ було забезпечення збалансованого представлення антигенів з різних фаз інфекції. Наприклад, вибирали деякі антигени латентної фази, не дивлячись на менший кінцевий бал аналізу даних, ніж у більшості антигенів активної фази.

Конструювання злиття антигенів Mtb

10 Конструювали 12 гібридів антигенів Mtb, як проілюстровано на Фіг. 1. П'ять гібридів розробляли на основі біохімічних міркувань (злиття 3, 5, 6, 8 і 14), тоді як злиття 2, 4 і 13 розробляли відносно фази захворювання ТВ, причому гібрид 2 містив антигени активної фази, гібрид 4 - антигени активної фази і фази пожвавлення, і гібрид 13 був складений з антигенів латентної фази. Для того, щоб полегшувати детекцію різних гібридів генів і уникати необхідності  
15 використання специфічних антитіл стосовно кожного антигена Mtb, у кожному гібриді додавали послідовності міток, відповідно, мітки Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 25) на N-кінці і міток с-тус (EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 26) і His (HHHHHH; SEQ ID NO: 27) на C-кінці.

З іншого боку, сигнальні пептиди (також іменовані сигнальна послідовність або SS) і  
20 заякорюючі в мембрані пептиди (також іменовані трансмембранний або ТМ пептид/домен) додавали, відповідно, на N-кінці і C-кінці злитих білків Mtb для забезпечення заякорювання на поверхні клітини, яке, як передбачається, у певних випадках оптимізує імунотенну активність. Проте додавання ТМ домену не було необхідне для гібридів, що закінчуються Rv0111 або Rv1733, оскільки ці білки вже містять заякорюючі в мембрані пептиди. З метою порівняння також конструювали чотири злиття без будь-якої сигнальної послідовності (SS) і ТМ домену так,  
25 щоб досліджувати вплив локалізації у клітині (презентації на мембрані у присутності пептидів SS і ТМ відносно цитоплазматичної локалізації за відсутності таких пептидів) на рівень експресії та імунотенну активність. Наприклад, rTG18269 кодує ті самі антигени Mtb (Rv0569 - Rv1813\* - Rv3407 - Rv3478 - Rv1807), що і rTG18295, за винятком того, що гібрид, який кодується rTG18269, оснащений SS на його N-кінці і ТМ на його C-кінці між мітками Мус і His, тоді як  
30 гібрид, який кодується rTG18295, позбавлений таких пептидів SS і ТМ.

Синтетичні гени, що кодують різні антигени Mtb і гібриди, були синтезовані Geneart (Регенсбург, Німеччина). Послідовності були оптимізовані для використання кодонів у людини, і перед ініціюючим кодоном ATG була додана послідовність Козака (ACC). Крім того, були виключені деякі мотиви: TTTTNT, GGGGG, CCCCC, які шкідливі для експресії у векторі на  
35 основі вірусу віспи, і AAAGGG, AAAAGG, GGGAAA, GGGAAG (і комплементарні послідовності TTCCCC, TTCCCC, CCTTTT, CCCCTT), які можуть бути шкідливими для експресії у деяких інших векторах.

Дані злиття клонували у плазмиду pGWiz (Gelantis), розщеплену NotI і BamH1. Ця плазміда містить модифікований промотор CMV (вірус мозаїки цвітної капусти), з подальшим інтроном А  
40 з неповільного раннього гена CMV і високоєфективним штучним термінатором транскрипції.

Конструкція rTG18266 (гібрид №2)

Амінокислотна послідовність злиття №2 показана в SEQ ID NO: 28. Амінокислоти 1-23 відповідають сигнальному пептиду, присутньому на N-кінці попередника глікопротеїну штаму ERA вірусу сказу (описаний в Genbank № M38452), амінокислоти 24-31 відповідають мітці Flag,  
45 амінокислоти 32-317 відповідають Ag85B\*, амінокислоти 318-412 відповідають TB10.4, амінокислоти 413-506 відповідають ESAT6, амінокислоти 507-516 відповідають мітці с-тус, Ser лінкеру, амінокислоти 518-583 відповідають заякорюючому в мембрані пептиду, що походить з глікопротеїну штаму ERA вірусу сказу, і амінокислоти 584-589 відповідають His мітці. Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №2, показану в SEQ ID NO: 40, отримували  
50 синтетичним способом, і синтетичний ген клонували у pGWiz, розщеплену NotI і BamH1, з отриманням rTG18266.

Конструкція rTG18267 (гібрид №3)

Амінокислотна послідовність злиття №3 показана в SEQ ID NO: 30. Амінокислоти 1-23 відповідають сигнальному пептиду, присутньому на N-кінці попередника глікопротеїну штаму PG вірусу сказу (описаний в Genbank № ay009097 і SEQ ID NO: 2 у WO2008/138649), амінокислоти  
55 24-31 відповідають мітці Flag, амінокислоти 32-380 відповідають RPFb-Dnyb\*, амінокислоти 381-390 відповідають мітці с-тус, Ser лінкеру, амінокислоти 392-457 відповідають заякорюючому в мембрані пептиду, що походить з глікопротеїну штаму PG вірусу сказу (SEQ ID NO: 3 у WO2008/138649), і амінокислоти 458-463 відповідають His мітці. Нуклеотидну послідовність, що

кодує гібрид №3, показану в SEQ ID NO: 42, отримували синтетичним способом, і синтетичний ген клонували у рGWiz, розщеплену NotI і BamH1, з отриманням рTG18267.

Конструкція рTG18268 (гібрид №4)

Амінокислотна послідовність злиття №4 показана в SEQ ID NO: 32. Амінокислоти 1-23 відповідають сигнальному пептиду, присутньому на N-кінці попередника глікопротеїну штаму PG вірусу сказу (описаний в Genbank № ay009097), амінокислоти 24-31 відповідають мітці Flag, амінокислоти 32-380 відповідають RPFb-Dnyb\*, амінокислоти 381-666 відповідають Ag85B\*, амінокислоти 667-761 відповідають TB10.4, амінокислоти 762-855 відповідають ESAT6, амінокислоти 856-865 відповідають мітці c-мус, Ser лінкеру, амінокислоти 867-932 відповідають заякорюючому в мембрані пептиду, що походить з глікопротеїну штаму PG вірусу сказу, і амінокислоти 933-938 відповідають His мітці. Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №4, показану в SEQ ID NO: 44, отримували синтетичним способом, і синтетичний ген клонували у рGWiz, розщеплену NotI і BamH1, з отриманням рTG18268.

Конструкція рTG18269 (гібрид №5)

Амінокислотна послідовність злиття №5 показана в SEQ ID NO: 34. Амінокислоти 1-23 відповідають сигнальному пептиду, присутньому на N-кінці попередника глікопротеїну штаму ERA вірусу сказу (описаний в Genbank № M38452), амінокислоти 24-31 відповідають мітці Flag, амінокислоти 32-118 відповідають Rv0569, амінокислоти 119-227 відповідають Rv1813\*, амінокислоти 228-325 відповідають Rv3407, амінокислоти 326-717 відповідають Rv3478, амінокислоти 718-1115 відповідають Rv1807, амінокислоти 1116-1125 відповідають мітці c-мус, Ser лінкеру, амінокислоти 1127-1192 відповідають заякорюючому в мембрані пептиду, що походить з глікопротеїну штаму PG вірусу сказу (SEQ ID NO: 3 у WO2008/138649) і амінокислоти 843-848 відповідають His мітці. Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №5, показану в SEQ ID NO: 46, отримували синтетичним способом, і синтетичний ген клонували у рGWiz, розщеплену NotI і BamH1, з отриманням рTG18269.

Конструкція рTG18270 (гібрид №6)

Амінокислотна послідовність злиття №6 показана в SEQ ID NO: 36. Амінокислоти 1-23 відповідають сигнальному пептиду, присутньому на N-кінці попередника глікопротеїну штаму ERA вірусу сказу (описаний в Genbank № M38452), амінокислоти 24-31 відповідають мітці Flag, амінокислоти 32-317 відповідають Ag85B\*, амінокислоти 318-459 відповідають Rv2626, амінокислоти 460-808 відповідають RPFb-Dhyb\*, амінокислоти 809-956 відповідають Rv1733\*, амінокислоти 957-966 відповідають мітці c-мус, Ser лінкеру, амінокислоти 968-973 відповідають His мітці. Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №6, показану в SEQ ID NO: 48, отримували синтетичним способом, і синтетичний ген клонували у рGWiz, розщеплену NotI і BamH1, з отриманням рTG18270.

Конструкція рTG18272 (гібрид №8)

Амінокислотна послідовність злиття №8 показана в SEQ ID NO: 37. Амінокислоти 1-23 відповідають сигнальному пептиду, присутньому на N-кінці попередника глікопротеїну штаму ERA вірусу сказу (описаний в Genbank № M38452), амінокислоти 24-31 відповідають мітці Flag, амінокислоти 32-317 відповідають Ag85B\*, амінокислоти 318-459 відповідають Rv2626, амінокислоти 460-607 відповідають Rv1733\*, амінокислоти 608-617 відповідають мітці c-мус, Ser лінкеру, і амінокислоти 619-624 відповідають His мітці. Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №8, показану в SEQ ID NO: 49, отримували синтетичним способом, і синтетичний ген клонували у рGWiz, розщеплену NotI і BamH1, з отриманням рTG18272.

Конструкція рTG18323 (гібрид №13)

Амінокислотна послідовність злиття №13 показана в SEQ ID NO: 38. Амінокислоти 1-28 відповідають сигнальному пептиду, присутньому на N-кінці білка F вірусу кору (штам Hallé, описаний в Genbank № X05597-1), амінокислоти 29-36 відповідають мітці Flag, амінокислоти 37-349 відповідають Rv2029\*, амінокислоти 350-491 відповідають Rv2626, амінокислоти 492-639 відповідають Rv1733\*, амінокислоти 640-932 відповідають Rv0111\*, амінокислоти 933-942 відповідають мітці c-мус, Ser лінкеру, і амінокислоти 944-949 відповідають His мітці. Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №13, показану в SEQ ID NO: 50, отримували синтетичним способом, і синтетичний ген клонували у рGWiz, розщеплену NotI і BamH1, з отриманням рTG18323.

Конструкція рTG18324 (гібрид №14)

Амінокислотна послідовність злиття №14 показана в SEQ ID NO: 39. Амінокислоти 1-28 відповідають сигнальному пептиду, присутньому на N-кінці білка F вірусу кору (штам Hallé, описаний в Genbank № X05597-1), амінокислоти 29-36 відповідають мітці Flag, амінокислоти 37-349 відповідають Rv2029\*, амінокислоти 350-444 відповідають TB10.4, амінокислоти 445-538 відповідають ESAT6, амінокислоти 539-831 відповідають Rv0111\*, амінокислоти 832-841

відповідають мітці с-мус, Ser лінкеру, і амінокислоти 843-848 відповідають His мітці. Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №14, показану в SEQ ID NO: 51, отримували синтетичним способом, і синтетичний ген клонували у рGWiz, розщеплену NotI і BamHI, з отриманням рTG18324.

#### 5 Конструкція гібридів 9-12

Адресуючі послідовності видаляли з плазмід рTG18267, рTG18269, рTG18266 і рTG18268 за допомогою прямого мутагенезу (набір для сайт-спрямованого мутагенезу Quick Change, Stratagene) з використанням відповідних пар праймерів OTG20188 (CGCGGCCGACCATGGATTACAAGGATGACGACG; SEQ ID NO: 52) і OTG20189 (CGTCGTATCCTTGTAAATCCATGGTGCGGCCGCG; SEQ ID NO: 53) для видалення послідовності сигнального пептиду, і OTG20190 (CATCTCAGAAGAGGATCTGCATCATCATCATCATCATG; SEQ ID NO: 54) і OTG20191 (CAATGATGATGATGATGATGATGCAGATCCTCTTCTGAGATG; SEQ ID NO: 55) для видалення ТМ послідовності. Плазмідами, що утворювалися, були, відповідно, рTG18307 (гібрид №12 відповідає цитоплазматичному гібриду №3), рTG18295 (гібрид №9 відповідає цитоплазматичному гібриду №5), рTG18296 (гібрид №10 відповідає цитоплазматичному гібриду №2) і рTG18297 (гібрид №11 відповідає цитоплазматичному гібриду №4), відповідні амінокислотним послідовностям SEQ ID NO: 31, 35, 29 і 33, які кодуються нуклеотидними послідовностями SEQ ID NO: 43, 47, 41 і 45.

#### 20 Конструювання індивідуальних плазмід, що експресують ген Mtb

У плазміді рGWiz нижче промотора CMV вводили послідовність Flag і послідовності с-мус-His, розділені рестрикційним сайтом NheI. Синтетичний фрагмент ДНК, що містить кінець промотора CMV, послідовності Flag і с-мус-His, був синтезований Geneart і вставлений у плазміді FLAG\_TAG\_1. Цю плазміді розщеплювали PvuII і BglII, і фрагмент, що утворюється, вставляли у рGWiz, розщеплену тим самим ферментом, з утворенням рTG18282. Індивідуальні гени Rv3407, Rv0569, Rv1807, Rv1813\*, Rv3478 і Rv2626 потім ампліфікували ПЛР від рTG18269, за винятком Rv2626, для якого як матрицю використовували рTG18323.

Пари ампліфікуючих праймерів, використаних для виділення кожного гена TB, проілюстровані в Таблиці 1.

Таблиця 1

Ген TB	Назва праймера	Послідовність праймера
Rv3407	OTG20232 SEQ ID NO: 56	GATGACGACGATAAGGCTAGCAGAGCCACCGTGGGACTGG
	OTG20233 SEQ ID NO: 57	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCCTGTTTCATCCCGCATCTCGT
Rv0569	OTG20234 SEQ ID NO: 58	GATGACGACGATAAGGCTAGCAAGGCCAAAGTCGGCG
	OTG20235 SEQ ID NO: 59	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCTGTTCTCTGGCGTGC
Rv1807	OTG20236 SEQ ID NO: 60	GATGACGACGATAAGGCTAGCGATTTTGCCACCCTCCCACC
	OTG20237 SEQ ID NO: 61	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGCCAGCTGCAGGAGGTCTGG
Rv1813*	OTG20238 SEQ ID NO: 62	GATGACGACGATAAGGCTAGCGCCAACGGCAGCATGAGCG
	OTG20239 SEQ ID NO: 63	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGTTGCAGGCCAGTTCACGA
Rv3478	OTG20240 SEQ ID NO: 64	GATGACGACGATAAGGCTAGCGTGGACTTCGGCGCCCTGC
	OTG20241 SEQ ID NO: 65	GAGATGAGTTTTTGTTCGCTAGCGCCAGCGGCTGGAGTTCTGG
Rv2626	OTG20242 SEQ ID NO: 66	GATGACGACGATAAGGCTAGCACAACCGCCAGAGACATCATG
	OTG20243 SEQ ID NO: 67	GATGAGTTTTTGTTCGCTAGCAGAGGCCAGGGCCATGGGG

Амплікони, що утворювалися, клонували за допомогою способу ПЛР-клонування «In fusion Advantage» (Clontech) у рTG18282, лінеаризовану NheI. Це забезпечує злиття послідовностей міток з генами Mtb. Отримані плазмідні називали рTG18300 (Rv3407), рTG18301 (Rv0569), рTG18302 (Rv1807), рTG18303 (Rv1813\*), рTG18304 (Rv3478) і рTG18305 (Rv2626) відповідно.

Шість плазмід, що містять експресивні касети для ESAT6, Rv1733\*, Ag85B\*, TB10-4, Rv0111\* і Rv2029\*, злиті з Flag у 5' і послідовностями с-мус-His у 3', були синтезовані Geneart і вставлені у рGWiz. Вони були названі рTG18308 (ESAT6), рTG18309 (Rv1733\*), рTG18310 (Ag85B\*), рTG18315 (TB10.4), рTG18329 (Rv0111\*), рTG18317 (Rv2029\*) відповідно. Оскільки білки Rv1733\* і Rv0111\* містять ТМ домен, сигнальний пептид, представлений на N-кінці попередника глікопротеїну штаму ERA вірусу сказу, зливали вище послідовності Flag для того, щоб уникнути проблем з експресією.

Плазмідні, використовувані для імунізації, незалежно від того, чи кодують вони індивідуальні або злиті гени Mtb, отримували в умовах, що забезпечують відсутність ендотоксинів.

Конструювання рекомбінантного MVA

Видалення послідовностей міток

Послідовності міток видаляли з гібридів антигенів Mtb для того, щоб уникнути їх присутності у векторах на основі MVA. Послідовності міток, розташовані усередині касет злиття Mtb (наприклад, Flag, присутню між сигнальним пептидом і першою амінокислотою злиття Mtb, і мітку с-мус, присутню між останньою амінокислотою злиття Mtb і пептидом, закорюючим в мембрані), видаляли шляхом прямого мутагенезу з використанням набору для сайт-спрямованого мутагенезу QuikChange (Stratagene) і відповідних пар праймерів, як проілюстровано в Таблиці 2. Послідовності міток, розташовані зовні від касет злиття Mtb (для цитоплазматичного злиття і His мітки), видаляли за допомогою ПЛР з використанням праймерів, що забезпечують додавання ініціюючого Met, і термінуючого кодону, на обох кінцях гібридів.

Таблиця 2

Гібрид	Пари праймерів для делеції Flag	Пари праймерів для делеції с-мус	Плазмід, що утворюється
4	OTG20313 (SEQ ID NO: 68 ) OTG20314 (SEQ ID NO: 69)	OTG20315 (SEQ ID NO: 70 ) OTG20316 (SEQ ID NO: 71 )	рTG18339
5	OTG20317 (SEQ ID NO: 72) OTG20318 (SEQ ID NO: 73 )	OTG20319 (SEQ ID NO: 74) OTG20320 (SEQ ID NO: 75)	рTG18340
6	OTG20321 (SEQ ID NO: 76 ) OTG20322 (SEQ ID NO: 77)	NA	рTG18341
13	OTG20333 (SEQ ID NO: 78) OTG20334 (SEQ ID NO: 79)	NA	рTG18342
14	OTG20333 (SEQ ID NO: 78) OTG20334 (SEQ ID NO: 79)	NA	рTG18343

Конструкція MVATG18355 (гібрид №13)

Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №13 (SF-Rv2029\*-Rv2626-Rv1733\*-Rv0111\*, як проілюстровано частиною SEQ ID NO: 38 від 1 до 28 і від 37 до 932), поміщали під контроль промотора р7.5K (SEQ ID NO: 80; CCACCCACTTTTATAGTAAGTTTTCACCCATAAATAATAACAATAATTAATTTCTCGTAAAAG TAGAAAAATATATTCTAATTTATTGCACGTAAGGAAGTAGAATCATAAAGAACAGT). Цей останній ампліфікували за допомогою ПЛР з ДНК штаму Copenhagen VV (вірус вісповакцини) з використанням пари відповідних праймерів OTG20405 (SEQ ID NO: 81) і OTG20406 (SEQ ID NO: 82), тоді як послідовність злиття №13 ампліфікували з плазміді рTG18342 за допомогою ПЛР з OTG20407 (SEQ ID NO: 83) і OTG20408 (SEQ ID NO: 84). Потім р7.5K і послідовність, що кодує гібрид №13, повторно збирали за допомогою подвійної ПЛР з використанням праймерів OTG20405 (SEQ ID NO: 81) і OTG20408 (SEQ ID NO: 84). Фрагмент, що утворювався, вставляли в сайти рестрикції BglII і NotI плазміді переносу на основі вірусу вісповакцини - рTG17960, що приводило до утворення рTG18355.

Плазміді переносу на основі MVA, рTG17960, конструювали таким чином, щоб забезпечувати вставку нуклеотидної послідовності, що підлягає трансфекції, за допомогою гомологічної рекомбінації у делецію III генома MVA. Вона походить з плазміді рTG1E (описана в Braun et al., 2000, Gene Ther. 7:1447), в яку були клоновані фланкуючі послідовності (BRG3 і BRD3), оточуючі делецію III MVA (Sutter and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847). Ця плазміді переносу також містить злиття між посиленням зеленим флуоресцентним білком



*Aequorea victoria* (ген eGFP, виділений з pEGP-C1, Clontech) і геном ксантин-гуанінфосфорибозилтрансферази *Escherichia coli* (ген gpt) під контролем раннього пізнього синтетичного промотора p11K7.5 вірусу вісповакцини (люб'язно наданий R. Wittek, Університет Лозанни). Синтез ксантин-гуанінфосфорибозилтрансферази забезпечує зростання

5 рекомбінантного GPT<sup>+</sup> MVA в селективному середовищі, що містить мікофенолову кислоту, ксантин і гіпоксантин (Falkner et al, 1988, J. Virol. 62, 1849-54), і eGFP забезпечує візуалізацію

10 бляшок рекомбінантного MVA. Селективний маркер eGFP-GPT поміщений між двома гомологічними послідовностями у тій самій орієнтації. Після клональної селекції селективний маркер можна легко усувати за допомогою декількох пасажів без селекції, забезпечуючи

зростання eGFP-GPT рекомбінантного MVA.

Отримання MVATG18355 проводили шляхом гомологічної рекомбінації у первинних фібробластах ембріонів курки (CEF), інфікованих MVA і трансфікованих нуклеофекцією

15 рTG18355 (згідно технології Amaxa Nucleofector). Селекцію вірусу проводили шляхом очищення бляшок після зростання у присутності селективного середовища, що містить мікофенолову кислоту, ксантин і гіпоксантин. Як згадано вище, селективний маркер потім усувають за допомогою пасажу в неселективному середовищі. Відсутність забруднення батьківським MVA підтверджували ПЛР.

Конструкція MVATG18364 (гібрид №13 плюс гібрид №4)

Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №4 (SR-RPFB-Dhyb\*-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-TMR, як проілюстровано частиною SEQ ID NO: 32 від 1 до 23, з наступними 32-855 і 866-932),

20 поміщали під контроль промотора pH5R (SEQ ID NO: 85, TTTATTCTATACTTAAAAAATGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCG AGAAATAATCATAAATTATTTCAATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTG), клонованого з геномної

25 ДНК MVA дикого типу за допомогою ПЛР з парою праймерів OTG20445 (SEQ ID NO: 86) і OTG20446 (SEQ ID NO: 87). Ампліфікований продукт розщеплювали NotI і PacI. Послідовність, що кодує гібрид №4, ампліфікували з рTG18339 за допомогою ПЛР з використанням праймерів OTG20447 (SEQ ID NO: 88) і OTG20380 (SEQ ID NO: 89). Ампліфікований продукт розщеплювали PacI і XhoI. Обидва фрагменти разом клонували у рTG18355, розщеплену NotI і XhoI, що приводило до утворення рTG18364.

Отримання вірусу MVATG18364 проводили у CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

Конструкція MVATG18365 (гібрид №13 плюс гібрид №11)

Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №11 (RPFB-Dhyb\*-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6, як проілюстровано частиною SEQ ID NO: 33 від положення 10 до положення 833, якій передував

35 Met ініціатор в положенні 1), поміщали під контроль промотора pH5R. Цей промотор отримували з рTG18364 за допомогою ПЛР з праймерами OTG20445 (SEQ ID NO: 86) і OTG20446 (SEQ ID NO: 87), і ампліфікований фрагмент розщеплювали NotI і PacI. Послідовність, що кодує гібрид №11, клонували з рTG18297 за допомогою ПЛР з використанням

40 пари праймерів OTG20448 (SEQ ID NO: 90) і OTG20382 (SEQ ID NO: 91), і ампліфікований продукт розщеплювали PacI і XhoI. Обидва фрагменти разом клонували у рTG18355, розщеплену NotI і XhoI, з отриманням рTG18365.

Отримання вірусу MVATG18365 проводили в CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

Конструкція MVATG18376 (гібрид №13 плюс гібрид №4 плюс гібрид №5)

Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №5 (SR-Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR, як проілюстровано частиною SEQ ID NO: 34 від положень 1 до 23, з наступними

45 32-1115 і 1126-1192), поміщали під контроль промотора B2R (SEQ ID NO: 92, TATATTATTAAGTGTTGGTGTTCGATGTAAATTT-TTGTTCGATAAAAAATTAATAAATACTTAATTTATTATTGATCTCGTGTGTACAACCGAAATC). Цей

50 промотор ампліфікували з ДНК штаму Western Reserve VV за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів OTG20469 (SEQ ID NO: 93) і OTG20470 (SEQ ID NO: 94), і ампліфікований фрагмент розщеплювали XhoI і NheI. Послідовність, що кодує гібрид №5, ампліфікували з рTG18340 з використанням пари праймерів OTG20472 (SEQ ID NO: 95) і OTG20473 (SEQ ID NO: 96) перед рестрикцією NheI і BamHI. Обидва розщеплені фрагменти разом клонували у

55 рTG18364, лінеаризовану XhoI і BamHI, з отриманням рTG18376.

Отримання вірусу MVATG18376 проводили в CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

Конструкція MVATG18377 (гібрид №13 плюс гібрид №11 плюс гібрид №5)

Промотор B2R ампліфікували з рTG18376 з використанням пари праймерів OTG20469 і

60 OTG20470, описаних вище, і розщеплювали XhoI і NheI. Нуклеотидну послідовність, що кодує

гібрид №5 (SR-Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR), ампліфікували, як описано вище, і клонували під контролем промотора B2R у рTG18364, лінеаризовану XhoI і BamHI, з отриманням рTG18377.

5 Отримання вірусу MVATG18377 проводили в CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

Конструкція MVATG18378 (гібрид №13 плюс гібрид №4 плюс гібрид №9)

10 Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №9 (Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807, як проілюстровано частиною SEQ ID NO: 35 від положення 10 до 1093, якій передував Met ініціатор в положенні 1), ампліфікували з рTG18295 за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів OTG20483 (SEQ ID NO: 97) і OTG20474 (SEQ ID NO: 98). Ампліфікований продукт розщеплювали NheI і BamHI і клонували з промотором B2R, розщепленим XhoI і NheI (ампліфікованим з рTG18376, як описано вище), у рTG18364, лінеаризовану XhoI і BamHI, що приводило до утворення рTG18378.

15 Отримання вірусу MVATG18378 проводили в CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

Конструкція MVATG18379 (гібрид №13 плюс гібрид №11 плюс гібрид №9)

І нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №9 (Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807), і промотор B2R ампліфікували, як описано вище, і спільно клонували у рTG18365, лінеаризовану XhoI і BamHI, що приводило до утворення рTG18379.

20 Отримання вірусу MVATG18379 проводили в CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

Конструкція MVATG18404 (гібрид №14 плюс гібрид №6)

25 Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №14 (SF-Rv2029\*-TB10.4-ESAT6-Rv0111\*, як проілюстровано частиною SEQ ID NO: 39 від положення 1 до 28 і від 37 до 831), ампліфікували з рTG18343 за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів OTG20407 (SEQ ID NO: 83) і OTG20525 (SEQ ID NO: 99). Промотор р7.5K отримували з рTG18355 за допомогою ПЛР з праймерами OTG20524 (SEQ ID NO: 100) і OTG20406 (SEQ ID NO: 82). Послідовність, що кодує гібрид №14, потім клонували під контролем промотора р7.5K за допомогою подвійної ПЛР з використанням OTG20524 (SEQ ID NO: 100) і OTG20525 (SEQ ID NO: 99). Фрагмент, що утворювався, розщеплювали BamHI і NotI і вставляли в сайти рестрикції BglII і NotI плазмиди переносу на основі вірусу вісповакцини, рTG17960, що приводило до утворення рTG18395.

30 Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №6 (SS-Ag85B\*-Rv2626-RPFB-Dhyb\*-Rv1733\*, як проілюстровано частиною SEQ ID NO: 36 від положення 1 до 23 і від 32 до 956), ампліфікували з рTG18341 за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів OTG20527 (SEQ ID NO: 101) і OTG20376 (SEQ ID NO: 102), і продукт ампліфікації розщеплювали PacI і XhoI. Промотор рH5R ампліфікували з рTG18355, як описано вище, і розщеплювали NotI і PacI. Обидва розщеплені фрагменти разом клонували у рTG18395, лінеаризовану NotI і XhoI, що приводило до утворення плазмиди рTG18404.

40 Отримання вірусу MVATG18404 проводили в CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

Конструкція MVATG18417 (гібрид №14 плюс гібрид №6 плюс гібрид №5)

45 Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №5 (SR-Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-TMR), поміщену під контроль промотора B2R, отримували розщеплюванням рTG18376 XhoI і BamHI. Фрагмент, що утворювався, вставляли у рTG18404, розщеплену тими ж ферментами, з отриманням рTG18417.

Отримання вірусу MVATG18417 проводили в CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

Конструкція MVATG18418 (гібрид №14 плюс гібрид №6 плюс гібрид №9)

50 Нуклеотидну послідовність, що кодує гібрид №9 (Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807), поміщену під контроль промотора B2R, отримували розщеплюванням рTG18379 XhoI і BamHI. Фрагмент, що утворювався, вставляли у рTG18404, розщеплену тими ж ферментами, з отриманням рTG18418.

Отримання вірусу MVATG18418 проводили в CEF за допомогою гомологічної рекомбінації, як описано вище.

55 Продукція і очищення білка

60 Чотири штами E. coli тестували на експресію індивідуальних антигенів Mtb. Всі ці штами несуть у їх геномі профаг DE3, який забезпечує індукцію експресії полімерази T7 за допомогою лактози або аналога лактози (тобто IPTG). Чотири штами являли собою B121(DE3) (Lucigen) як класичний штам для експресії білка, C41(DE3) (Lucigen) для експресії токсичного білка, B121(DE3) Rosetta (Merck Chemical) для експресії білка із застосуванням кодонів, яке

відрізняється від застосування кодонів у *E. coli*, і C43(DE3) (Lucigen) для експресії білка з трансмембранними пептидами (наприклад, Rv1733). Крім того, для оптимізації продукції антигенів тестували три різних температури і часи продукції.

Аналізи експресії для визначення оптимальних умов

Кожний штам *E. coli* трансформували плазмідом, що кодує антиген Mtb, що підлягає продукції. Зі свіжотрансформованої чашки виділяли п'ять колоній, інокулювали у 50 мл середовища LB (середовище Лурія) у присутності ампіциліну і давали їм зростати протягом ночі при 37 °C при струшуванні. Колбу з автоіндуцибельним середовищем (AI середовище, що містить глюкозу/лактозу і антибіотик; Studier, 2005, Protein Expr Purif. 41: 207-34) інокулювали зразком передкультури і потім культивували за однієї з температур 18 °C, 30 °C і 37 °C протягом 24, 8 і 8 годин відповідно. В кінці інкубації вимірювали поглинання при 600 нм, і клітини відбирали центрифугуванням. Клітинний осад ресуспендували у PBS (фосфатно-сольовий буферний розчин), і доводили OD (оптична щільність) при 600 нм для кожної протестованої умови культури приблизно до 50 перед лізисом клітин за допомогою обробки ультразвуком. Клітинний лізат потім центрифугували при 10000 g протягом 10 хвилин при 4 °C, і зразок супернатанту (типово 10 мкл), і осад потім завантажували на гель SDS-PAGE для оцінки оптимальних умов.

Продукція і очищення антигенів Mtb

Очищення антигенів Mtb, що містять His мітку, здійснювали з 500 мл культури, вирощеної у 2 л колбах, застосовуючи визначені раніше оптимальні умови. Клітини відбирали центрифугуванням, і осади, що відповідають 250 мл культури, витримували при -20 °C до застосування. Відібрані бактерії ресуспендували у PBS або в гуанідині, залежно від розчинності антигена, піддавали обробці ультразвуком для лізису клітин і очищали афінною хроматографією IMAC (афінна хроматографія на іммобілізованих іонах металу) на смолі Ni sepharose 6 fast Flow (GE Healthcare; посилання 17-5318) або за нативних, або денатуруючих умов згідно з рекомендаціями постачальника. Білки елюювали шляхом застосування зростаючих концентрацій імідазолу (50 mM, 100 mM і 250 mM). Фракції, що містять чистий білок, об'єднували і діалізували проти PBS або сечовини, залежно від розчинності антигена.

Характеризація білка

Для оцінки кількості і якості очищених антигенів Mtb, присутніх в елююваних фракціях, можна проводити безліч аналізів.

Рівні ендотоксинів вимірювали з використанням портативної системи аналізу (PTS) від Charles River Laboratories. Використовували картриджі з інтервалом детекції від 0,005 до 0,5 EU/мл згідно з рекомендаціями виробника.

Концентрації білка визначали аналізом за Бредфорд (Biorad) згідно з рекомендаціями виробника. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA), розчинений у буфері для зразка.

Чистоту елююваних фракцій і діалізованого розчину можна оцінювати електрофорезом на гелі SDS-PAGE (4-12%, Invitrogen).

Масу очищених білків вимірювали з використанням MALDI (для матрично-активована лазерна десорбція/іонізація) або електророзпилювальних способів. Виміряні і розрахункові маси порівнювали для того, щоб визначити, чи є білок інтактним чи ні. Ідентичність білка або в розчині, або в смузі гелю перевіряли вимірюванням маси пептидів, генерованих після розщеплювання трипсином. Маси пептидів визначали MALDI і/або рідинною хроматографією у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією (ЖХ/МС/МС). Виміряні і розрахункові маси пептидів порівнювали для того, щоб підтвердити ідентичність білка.

Продукція антитіл проти антигенів Mtb

Антитіла, спрямовані проти різних антигенів Mtb, отримували після імунізації кроликів сумішшю двох різних антигенспецифічних пептидів (Eurogentec; Seraing, Бельгія). Такі пептиди з 15 або 16 амінокислотних залишків відбирали після аналізу програмами для прогнозування епітопу B. Антисироватки проти антигенів Rv1733\*, Rv2029\*, Rv0569, Rv1807, Rv0111, RPFb-Dhyb\*, Rv1813\* і Rv3407 отримували після імунізації кроликів двома специфічними пептидами у добу 0 і трьох бустер-імунізацій у добу 7, 10 і 18. Зразки крові відбирали до першої ін'єкції пептидів і у добу 21. Останній відбір крові у кроликів робили у добу 29. Стосовно Rv3478, кроликам проводили ін'єкцію у добу 0, 22, 49 і 77 двома специфічними 16-мірними пептидами. Зразки крові відбирали перед першою ін'єкцією пептидів і у добу 31 і 59. Кінцевий відбір крові у кроликів робили у добу 87.

Кінцеві сироватки оцінювали ELISA з використанням специфічних пептидів і аналізу вестерн-блотінгом з використанням плазмід, експресуючих індивідуальні гени Mtb.

Тестування злитих білків Mtb in vitro

Вестерн-блотінг на продуктах експресії, опосередкованої ДНК

2x10<sup>6</sup> клітин HEK293 трансфікували 5 мкг різних плазмід, що кодують злиття антигенів Mtb або індивідуальні гени, з використанням Lipofectamine 2000 (Invitrogen; #11668-019) у присутності інгібітора протеасом MG132 (10 мкМ), доданого до ростового середовища через 18 годин після трансфекції. Плазмиду рGWiz використовували як негативний контроль. Через 48 годин середовище відкидали, і клітини лізували 450 мкл/чашку 2 X буфера Tris-гліцин-SDS (посилання: LC2676; Novex), доповненого β-меркаптоетанолом (5% об./об.). Лізат потім обробляли ультразвуком і кип'ятили протягом 5 хв при 95 °С. Тридцять мікролітрів клітинних лізатів піддавали електрофорезу на преформованому 10%-ному гелі Criterion з використанням системи преформованого гелю Criterion (Biorad). Після електрофорезу білки переносили на PVDF (полівініліденфторид) мембрану (Macherey Nagel, 741260). Імунодетекцію проводили з використанням розведеного 1/500 моноклонального антитіла проти Flag M2, кон'югованого з пероксидазою (HRP) (пероксидаза хрину) (Sigma; #A8592), або з використанням розведеного 1/5000 моноклонального антитіла проти His, кон'югованого з пероксидазою (Invitrogen; #R931-25). Імунокомплекси виявляли з використанням набору ImmunStar WesternC (Biorad, посилання 170.5070).

Сироватку (розведену 1/1000), отриману після імунізації кролика, як описано вище, також використовували для детекції Rv1733\*, Rv2029\*, Rv0569, Rv1807, Rv0111\*, Rpf-B-D, Rv1813\*, Rv3407 і Rv3478 вестерн-блотінгом. Для детекції ESAT6, Ag85B \*, TB10.4 і Rv2626 використовували наявні у продажу антитіла, відповідно, мишаче моноклональне антитіло HYB076-08 (Santa-Cruz; #sc-57730, розведене 1/500) для ESAT6, кролячу поліклональну антисироватку NR-13800 (BEI, розведену 1/5000) для Ag85B\*, мишаче моноклональне антитіло 26A11 (Lifespan-Biosciences; #LS-C91052, розведене 1/1000) для Rv2626 і поліклональне кроляче антитіло ABIN361292 (Antibodies-online, розведене 1/1000) для TB10.4.

Вестерн-блотінг продуктів експресії, опосередкованої MVA

10<sup>6</sup> клітин A549 інфікували різними MVA, що продукують злиття антигенів Mtb, при MOI (множинність зараження) 1 у присутності інгібітора протеасом MG132 (10 мкМ), доданого до ростового середовища через 30 хв після інфекції. Як негативний контроль використовували порожній вектор MVATGN33.1. Через 24 години середовище відкидали, і клітини лізували 300 мкл/чашку 2 X буфера Tris-гліцин-SDS (посилання: LC2676; Novex), доповненого β-меркаптоетанолом (5% об./об.). Лізат потім обробляли ультразвуком і нагрівали протягом 5 хв при 95 °С. Двадцять мікролітрів клітинних лізатів піддавали електрофорезу на преформованому 4-15%-ному гелі Criterion з використанням системи преформованого гелю Criterion (Biorad). Після електрофорезу білки переносили на PVDF мембрану (система переносу Trans-blot® Turbo™ (#170-4155, Biorad)). Імунодетекцію проводили з використанням антитіл, специфічних відносно Mtb, як описано вище у зв'язку з експресійними продуктами ДНК-плазмід. Імунокомплекси виявляли з використанням набору ImmunStar WesternC (Biorad, посилання 170.5070).

Оцінка імуногенності в мишачій моделі

Протоколи ДНК-імунізації

Мишей імунізували три рази з 2- або 3-тижневим інтервалом або плазмідною, що кодує гібрид, або сумішшю плазмід, що кодують індивідуальні антигени Mtb, включені у гібрид. 100 мкг ДНК у 100 мкл стерильного PBS ін'єктували внутрішньом'язовим шляхом у передній великогомілковий м'яз. Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFNγ методом імуноферментних плям.

Протоколи імунізації за допомогою MVA

Імуногенність вакцин-кандидатів на основі MVA проти TB оцінювали у мишей BALB/c, трансгенних мишей HLA-A2, C57BL/6 і C3H/HeN. Кожний вектор на основі MVA вводили підшкірно у основу хвоста один раз у дозі 1x10<sup>7</sup> pfu в буфері Tris-HCl, що містить цукрозу. Клітинні імунні відповіді оцінювали через 7 діб після ін'єкції MVA за допомогою аналізу IFNγ методом імуноферментних плям.

Бібліотеки пептидів

Для повторної стимуляції спленоцитів з імунізованих мишей ex-vivo використовували бібліотеку пептидів. Точніше, синтезували 679 пептидів (15мери, що перекриваються 11 амінокислотами), що покривають усі 14 антигенів Mtb, що містяться в описаних вище злиттях (Prolimmune). Пули пептидів отримували в DMSO (диметилсульфоксид) з кінцевою концентрацією 1 мкмоль/л. Для покриття всієї довжини кожного антигена Mtb було потрібно від 1 до 4 пулів.

Rv1733 був покритий 2 пулами з 18 і 17 пептидів. Пул 1: 18 пептидів, що покривають залишки 62-144 Rv1733; пул 2: 17 пептидів, що покривають залишки 134-210 Rv1733.

Rv2029 був покритий 4 пулами з 19 пептидів. Пул 1: 19 пептидів, що покривають залишки 1-87 Rv2029; пул 2: 19 пептидів, що покривають залишки 77-163 Rv2029; пул 3: 19 пептидів, що покривають залишки 153-239 Rv2029; пул 4: 19 пептидів, що покривають залишки 229-314 Rv2029.

5 Rv0569 був покритий 1 пулом з 20 пептидів, що покривають Rv0569 від залишку 1 до 88.

Rv1807 був покритий 4 пулами з 25 пептидів для перших 3 пулів і 22 пептидів для четвертого пулу. Пул 1: 25 пептидів, що покривають залишки 1-111 Rv1807; пул 2: 25 пептидів, що покривають залишки 101-211 Rv1807; пул 3: 25 пептидів, що покривають залишки 201-311 Rv1807; пул 4: 22 пептиди, що покривають залишки 301-399 Rv1807.

10 Rv0111 був покритий 4 пулами з 20 пептидів для перших 3 пулів і 19 пептидів для четвертого пулу. Пул 1: 20 пептидів, що покривають залишки 361-451 Rv0111; пул 2: 20 пептидів, що покривають залишки 441-531 Rv0111; пул 3: 20 пептидів, що покривають залишки 521-611 Rv0111; пул 4: 19 пептидів, що покривають залишки 601-685 Rv0111.

15 RpfB-Dhyb був покритий 4 пулами з 22 пептидів для перших 3 пулів і 19 пептидів для четвертого пулу. Пул 1: 22 пептиди, що покривають залишки 30-127 RpfB; пул 2: 22 пептиди, що покривають залишки 117-215 RpfB; пул 3: 22 пептиди, що покривають залишки 205-284 RpfB і залишки 53-71 RpfD; пул 4: 19 пептидів, що покривають залишки 61-146 RpfD.

Rv1813 був покритий 1 пулом з 25 пептидів, що покривають залишки 34-143 Rv1813.

Rv3407 був покритий 1 пулом з 22 пептидів, що покривають залишки 1-99 Rv3407.

20 Rv3478 був покритий 4 пулами з 24 пептидів. Пул 1: 24 пептиди, що покривають залишки 1-107 Rv3478; пул 2: 24 пептиди, що покривають залишки 97-203 Rv3478; пул 3: 24 пептиди, що покривають залишки 193-299 Rv3478; пул 4: 24 пептиди, що покривають залишки 289-393 Rv3478.

25 Rv2626 був покритий 2 пулами з 17 і 16 пептидів. Пул 1: 17 пептидів, що покривають залишки 1-79 Rv2626; пул 2: 16 пептидів, що покривають залишки 69-143 Rv2626.

Ag85B був покритий 3 пулами з 23 пептидів. Пул 1: 23 пептиди, що покривають залишки 39-141 Ag85B; пул 2: 23 пептиди, що покривають залишки 131-233 Ag85B; пул 3: 23 пептиди, що покривають залишки 223-325 Ag85B.

ESAT-6 був покритий 1 пулом з 21 пептиду, що покриває залишки 1-95 ESAT-6.

30 TB10.4 був покритий 1 пулом з 21 пептиду, що покриває залишки 1-95 TB10.4.

Аналізи IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям

Відбирали спленоцити з імунізованих мишей і лізирували еритроцити (Sigma, R7757).  $2 \times 10^5$  клітин на лунку культивували у потрібній повторності протягом 40 годин на планшетах Multiscreen (Millipore, MSHA S4510), покритих моноклональним антитілом проти мишачого IFN $\gamma$  (BD Biosciences; 10 мкг/мл, 551216), в культуральному середовищі  $\alpha$ MEM (Gibco, 22571), доповненому 10% FCS (фетальна теляча сироватка) (JRH, 12003-100M), 80 U/мл пеніциліну/80 мкг/мл стрептоміцину (PAN, P06-07-100), 2 mM L-глутаміном (Gibco, 25030), 1x замінними амінокислотами (Gibco, 11140), 10 mM Hepes (Gibco, 15630), 1 mM піруватом натрію (Gibco, 31350) і 50 мкМ  $\beta$ -меркаптоетанолом (Gibco, 31350), і у присутності 10 одиниць/мл рекомбінантного мишачого IL2 (Peprotech, 212-12), одні, як негативний контроль, або з:

- вищеописаним пулом пептидів у кінцевій концентрації 1 мкмоль/л
- 5 мкг/мл конканаваліну A (Sigma, C5275) як позитивний контроль
- іррелевантним пептидом.

45 Т-клітини, що продукують IFN $\gamma$ , кількісно вимірювали методом імуноферментних плям (метод імуноферментних плям, специфічний відносно цитокіну), як описано раніше (Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76: 12735-46). Результати показані у вигляді середнього значення, отриманого для лунок у потрібній повторності. Експериментальний поріг позитивності для спостережуваних відповідей (або поріг відсікання) визначали шляхом розрахунку порогового значення, яке відповідає середньому значенню плям, спостережуваному з одним середовищем плюс два стандартних відхилення, приведеному для  $10^6$  клітин. Також був визначений технічний поріг, пов'язаний з рідером для методу імуноферментних плям CTL, що становить 50 плям/ $10^6$  клітин (який є значенням, вище якого CV (коефіцієнт варіації) рідера був систематично менший, ніж 20%). Статистичні аналізи відповідей методу імуноферментних плям проводили з використанням критерію Крускала-Уолліса, після якого, у разі отримання значущої відмінності, слідував критерій Манна-Уїтні. Значущим вважатиметься значення P, що дорівнює або менше 0,05.

Оцінка терапевтичної ефективності вакцин, що містять антигени Mtb, проти інфекції *Mycobacterium tuberculosis* у мишей

60 Самок мишей C57BL/6 (6-8-тижневих) заражували у тиждень 0 за допомогою аерозолі, що міститься в апараті Хендерсона у поєднанні з контрольним пристроєм для аерозолі (Hartings et

al., 2004, J Pharmacol Toxicol Methods 49: 39-55). Штам *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NCTC 7416), що заражує, культивували у хемостаті (James et al., 2000, J Appl Microbiol 88: 669-77), і дрібні частинки з середнім діаметром 2 мкм отримували в небулайзері Collison і доставляли безпосередньо у ніс тварини. Суспензію в небулайзері Collison коректували так, щоб доставляли кожній групі мишей оцінну інгальовану дозу, що становить приблизно 100 CFU/легеню.

Мишей імунізували у 10 і 14 тижнів після інфекції MVATG18364, MVATG18376 або MVATG18377, які давали підшкірно в одне місце біля основи хвоста ( $10^7$  pfu/100 мкл/мишу). Групі мишей ін'єктували MVATGN33.1 як негативний контроль ( $10^7$  pfu/100 мкл/мишу).

Мишей обробляли ізоніазидом (INH, 25 мг на кг маси тіла) і рифапентином (RIF, 10 мг на кг маси тіла) один раз на тиждень за допомогою перорального штучного годування протягом 10 тижнів з тижня 6 до тижня 15 (протокол адаптований з Aagaard et al., 2011, Nat Med, 17: 189-194). 5 мишей умертвляли в тиждень 6 перед обробкою лікарським засобом.

Мишей з кожної групи умертвляли: п'ять - в кінці обробки антибіотиком (15 тижнів після інфекції) для визначення кліренсу в кінці фази обробки, а інших - в тиждень 21. Органи (наприклад, селезінку) асептично видаляли, заморожували у добу розтину і обробляли для аналізу бактерійного навантаження. Серійні розведення зразків гомогенатів органів переносили на чашки на селективний агар 7H11 Middlebrook OADC і інкубували протягом аж до 3 тижнів для підрахунку життєздатних мікобактерій (CFU). Дані за бактерійним навантаженням виражали як Log<sub>10</sub> загального числа колонієутворювальних одиниць (CFU).

Терапевтичні ефективності кандидатів на основі MVA порівнювали і рангували з використанням критерію Манна-Уїтні. Значущим вважалось значення  $p$  менше 0,05.

#### РЕЗУЛЬТАТИ

Приклад 1: вибір відповідних антигенів Mtb для імуногенної комбінації

Геном Mtb експресує приблизно 4000 генів, але функція і роль в життєвому циклі Mtb величезної більшості генних продуктів ще не охарактеризована. Як описано в Матеріалах і Методах, існуючі дані по антигенах Mtb були досліджені з доступної літератури і баз даних з метою ідентифікації самого відповідного набору генів/антигенів з геному Mtb для пропозиції імунотерапевтичної вакцини, здатної індукувати імунітет проти ТВ упродовж всіх фаз природного перебігу інфекції.

Дані бібліографічні аналізи дозволяють «заздалегідь відібрати» набір з 33 антигенів Mtb, що належать до всіх трьох фаз інфекції, а саме сім антигенів активної фази, п'ять антигенів фази поживавлення (Rpf) і 19 антигенів латентної фази, а також два антигена PE/PPE.

- Антигени активної фази: ESAT-6 (Rv3875), CFP-10 (Rv3874), TB10.4 (Rv0288), Ag85A (Rv3804), Ag85B (Rv1886) і два "ESAT-6-подібних антигена" (Rv3620 і Rv3619);

- Два антигена PE/PPE (Rv2608 і Rv3478), які, мабуть, асоційовані з вірулентністю.

- Антигени фази поживавлення: заздалегідь відібрали п'ять існуючих генів Rpf (RpfA (Rv0867c), RpfB (Rv1009), RpfC (Rv1884c), RpfD (Rv2389), RpfE (Rv2450c)). Rpf є секретованими або мембранозв'язаними муралітичними ферментами, експресія яких потрібна для поживавлення клітин, що перебувають у спокої.

- Заздалегідь відібрали дев'ятнадцять антигенів латентної фази з понад 150 існуючих описаних генів латентної фази. Конкретніше, дванадцять належать до регулону DosR, набору з 45 генів, експресія яких збільшується упродовж періоду латентності, і п'ять були вибрані серед генів, експресія яких модулювалася упродовж умов культури, які, як вважають, імітують умови латентності, з якими Mtb стикається *in vivo*. Три антигена латентної фази також вибрали на основі нещодавно описаних доклінічної і ранньої клінічної фаз (Bertholet et al., 2008, J. Immunol. 181: 7948-57; Bertholet et al., 2010, Sci Transl Med 2: 53ra74, Mollenkopf et al., 2004, Infect Immun 72: 6471-9). Отже, 19 заздалегідь відібраними антигенами латентної фази були Rv1733c, Rv2029c, Rv1735, Rv1737, Rv2628, Rv0569, Rv2032, Rv2627c, Rv0111, Rv3812, Rv1806, Rv1807, Rv0198, Rv2626, Rv0081, Rv2005c, Rv2660, Rv3407 і Rv1813.

Потім був здійснений другий відбір для того, щоб рангувати 33 заздалегідь відібраних антигена Mtb. Другий відбір антигенів Mtb був оснований на способі відбору на основі аналізу даних (див. Матеріали і Методи), що відображають їх імунологічний і захисний потенціал (найвищий бал, що зберігається), а також на біохімічному прогнозуванні.

Були вибрані наступні антигени:

- Антигени латентної фази: Rv1733, Rv2029, Rv0569, Rv0111, Rv1807 і Rv3407. Rv2626 і Rv1813 також були вибрані через їх дуже хороший бал на основі аналізу даних і бала біохімічного прогнозування.

- Антигени активної фази: ESAT-6 (Rv3875), TB10.4 (Rv0288), Ag85B (Rv1886) і Rv3478. Слід зазначити, що заздалегідь відібраний антиген активної фази Rv3619 мав хороший бал на основі

аналізу даних, але, будучи ESAT-6-подібним білком, він не демонструє кращий бал, ніж сам ESAT-6, тому його не залишали у вибраному списку. Як інший приклад, антигени активної фази Rv2608 і Rv3478 мали однаковий бал на основі аналізу даних, але Rv3478 був вибраний на основі його здатності індукувати велику процентну частку респондерів в дослідженнях на когортах людей.

- Антигени фази пожвавлення: RpfB і RpfD. Серед 5 генних продуктів фази пожвавлення три Rpf виділялися (RpfB, D і E) дуже схожим балом після здійснення способу бальної оцінки на основі аналізу даних, але вибрали тільки RpfB і D з двох головних причин. По-перше, описана перехресна реактивність у показниках клітинних і гуморальних відповідей між 4 з 5 Rpf (Yeremeev et al., 2003, *Infect Immun* 71: 4789-94), за винятком RpfB, що, на думку авторів винаходу, виправдовувало вибір останнього. По-друге, RpfD був вибраний замість RpfE після аналізу послідовностей на основі меншої гомології послідовності в домені лізоциму (LD) між RpfB і D, ніж між RpfB і E. Таким чином, припускається, що збереження Rpf B і D було б достатнім для отримання імунної відповіді до 5 даних Rpf.

#### Приклад 2: конструкція гібриду

Проводили численні аналізи прогнозування структури *in silico* і бібліографічні аналізи для того, щоб прогнозувати біохімічні властивості і/або біологічні функції вибраних антигенів Mtb, як описано в Матеріалах і Методах.

14 вибраних антигенів-кандидатів класифікували на три групи, для яких були потрібні різні типи аналізу.

- Антигени з доступними даними, що стосуються їх експресії в різних вірусних векторах, а саме Ag85B, ESAT-6 і TB10-4 у MVA (Kolilab et al. 2010, *Clin Vaccine Immunol* 17: 793-801); віруси вісповакцини (Malin et al. 2000, *Microbes Infect* 2: 1677-85) і аденовіруси (Mu et al., 2009, *Mol Ther* 17: 1093-100; Dietrich et al. 2005, *J Immunol* 174: 6332-9 і Havenga et al. 2006; *J Gen Virol* 87: 2135-43). У даних випадках аналіз бібліографії був головним джерелом інформації для конструювання послідовності для вставки у конструкції векторів.

- Антигени без наведених даних щодо застосування у вірусних векторах, але ідентичні або гомологічні білку з відомою структурою. У даних випадках структурні дані були головним джерелом інформації для конструювання послідовності Mtb для вставки у конструкції векторів (Rv2626, Rv2029, RpfB, RpfD і Rv0569).

- Антигени без наведених даних щодо застосування у вірусних векторах і без гомології з будь-яким білком з відомою структурою. У даних випадках використовували біохімічні аналізи і прогнозування *in silico* для того, щоб охарактеризувати антигени і для конструювання послідовності Mtb для вставки у конструкції векторів (Rv0111, Rv3407, Rv3478, Rv1807 і Rv1813).

#### Конструкція антигена Ag85B

Ag85B демонструє пептидний сигнал завдовжки 40 залишків, який був консервативним у векторі на основі MVA від Kolilab, але не у вірусі вісповакцини Malin і аденовірусних конструкціях. Оскільки сигнальний пептид Ag85B прогнозували у вигляді ТМ домену, автори винаходу рекомендували не зберігати сигнальний пептид Ag85B у конструкціях векторів за даним винаходом. Рекомендована первинна структура Ag85B\*, що підлягає застосуванню в описаних тут конструкціях векторів, відповідає амінокислотній послідовності, показаній в SEQ ID NO: 20.

#### Конструкція антигена ESAT-6

ESAT-6 утворює гетеродимерний комплекс з CFP-10, і очікується, що дана гетеродимерна взаємодія індукує згортання обох білків. Один ESAT-6 приймає стан, подібний до розплавленої глобули, і структуру спіраль-поворот-спіраль при утворенні комплексу з CFP10. Таким чином, ESAT-6, зв'язаний з його партнером, міг би бути стабільнішим, ніж ESAT-6, експресований один. Проте рекомендована первинна структура ESAT-6, що підлягає застосуванню в описаних тут конструкціях векторів, відповідає повнорозмірному білку (амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO: 14), зрештою, без його Met, що ініціює (наприклад, якщо він займає внутрішнє положення у злитті).

#### Конструкція TB10-4 (Rv0288)

TB10-4 належить до тієї самої родини білків, що і ESAT-6. ЯМР (ядерний магнітний резонанс) структури TB10-4 продемонстрував, що він утворює гетеродимерний комплекс з Rv0287, який, як очікується, стабілізує структуру. Немає публікацій, що описують експресію TB10-4 вірусами віспи, тоді як експресія повнорозмірного TB10-4 була описана в аденовірусних векторах у формі злиття з С-кінцевою частиною або Ag85A, або Ag85B. На цій основі рекомендована первинна структура TB10.4, що підлягає застосуванню в описаних тут

конструкціях векторів, відповідає повнорозмірному білку (амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO: 2), зрештою, без його Met, що ініціює.

#### Конструкція Rv2626

Кристалізація Rv2626 (Sharpe et al., 2008, J Mol Biol 383: 822-36) продемонструвала, що він експресується у вигляді гомодимеру з внутрішньо- і міжсубодиничними дисульфідними зв'язками. Для Rv2626 не прогнозували сигнального пептиду. Оскільки Rv2626 має дуже добре визначене згортання, рекомендована первинна структура Rv2626, що підлягає застосуванню в описаних тут конструкціях векторів, відповідає повнорозмірному білку (амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO: 10), зрештою, без його Met, що ініціює.

#### 10 Конструкція Rv0569

Структура Rv0569 не відома, але цей білок демонструє 62%-ну ідентичність (81%-ну схожість) з Rv2302 в області, що перекривається, з 76 амінокислот (з 88 залишків). Структура останньої була визначена ЯМР (Buchko et al., 2006, Bacteriol 188: 5993-6001) і продемонструвала дуже добре згорнуту структуру в розчині з ядром у вигляді антипаралельної  $\beta$ -складчастої структури і C-кінцевою  $\alpha$ -спіраллю. З даним білком не асоційований прогноз суперспіралі. З білком Rv0569 не асоційована відома функція. Через потенційне дуже добре визначене згортання, рекомендована первинна структура Rv0569 Mtb, що підлягає застосуванню в описаних тут конструкціях векторів, відповідає повнорозмірному білку (амінокислотна послідовність, показана в SEQ ID NO: 3), зрештою, без його Met, що ініціює.

#### 20 Конструкція Rv2029

Структура Rv2029 не відома, але даний білок демонструє 35%-ну ідентичність з фосфофруктокіназою-2 (pfk2) *Escherichia coli* в області, що перекривається, з 310 ак (амінокислоти) (з 339). Крім того, пошук у PROSCAN дав ідентифікацію повністю консервативної сигнатури кіназ вуглеводів. Отже, Rv2029 імовірно має в Mtb фосфофруктокіназну активність. Фосфофруктокіназа каталізує фосфорилування фруктозо-6-фосфату під час гліколізу. Структура pfk2 *E. coli* є тетрамерною при зв'язуванні АТФ і димерною за відсутності АТФ у середовищі (алостерична регуляція ферментативної активності). У ферменті *E. coli* делеція останніх 4 C-кінцевих залишків повністю інгібує тетрамеризацію, індуковану АТФ. Таким чином, для того, щоб уникнути гетерогенності олігомеризації Rv2029 (суміші димерної і тетрамерної форм), рекомендується делеція C-кінцевої частини (тобто делеція останніх 25 залишків). Крім того, для усунення ферментативної активності Rv2029 рекомендована мутація D265N (положення 265, починаючи від Met, що ініціює, або 264 без Met), оскільки вона майже повністю усуває ферментативну активність pfk2 *E. coli* (Cabrera et al., 2010, Arch Biochem Biophys 502: 23-30). На цій підставі рекомендована первинна структура антигена Rv2029 (Rv2029\*), що підлягає застосуванню в описаних тут конструкціях векторів, відповідає амінокислотній послідовності, показаній в SEQ ID NO: 21.

#### Конструкція RpfB і RpfD

Чинниками, що стимулюють пожвавлення (Rpf), є секретовані білки, які утворюються під час фази реактивації бактерій (перехід від спокою до росту). *M. tuberculosis* має п'ять різних Rpf (від А до Е), які усі містять консервативний каталітичний домен (лізоцимподібний домен). Крім цього домена, серед цих п'яти білків немає значущої схожості. Структура RpfB була отримана приблизно для половини молекули (залишки 194-362) і прогнозували сигнальний пептид (залишки 1-29; Ruggiero et al. 2009, J Mol Biol 385: 153-62). Повнорозмірний білок (без його сигнального пептиду) при експресії у *E. coli* поводить як мономер.

На RpfB провели прогнозування і аналізи *in silico* для того, щоб проаналізувати частину білка (30-193), для якої не була доступна структура. За винятком сигнального пептиду, не прогнозували трансмембранний домен. Графіки HCA, прогноз вторинної структури і прогнози неупорядкованих областей в нативному стані узгоджуються з добре визначеним згортанням області 30-193. Прогнози суперспіралі і пошук відомих мотивів з використанням PROSCAN не дали якогось значущого результату.

Було показано, що активність каталітичного домена залежить від консервативного залишку, істотного в активності пожвавлення Rpf *Micrococcus luteus* в аналізі пожвавлення *Mycobacterium smegmatis* (мутація E292K; Mukamolova et al. 2006, Mol Microbiol 59: 84-98). Крім того, два залишки - T315 і Q347 беруть участь у зв'язуванні субстрату в лізоцимі і є консервативними в RpfB (Cohen-Gonsaud, et al. 2005, Nat Struct Mol Biol 12, 270-3).

Крім того, вибрали конструювання гібриду RPFB-D, який відповідає молекулі RpfB з її каталітичним доменом, заміненим самим дивергуючим каталітичним доменом серед Rpf (тобто каталітичним доменом RpfD). Отже, гібридом RPFB-D, що підлягає експресії у вірусних векторах, є гібридний білок з нейтралізованою каталітичною активністю за допомогою трьох мутацій (E292K, T315A і Q347A) і без сигнального пептиду. Рекомендована первинна структура



для цього гібридного білка RPFb-D, використовуваного у злитті, відповідає амінокислотній послідовності, показаній в SEQ ID NO: 31 від залишку 10 до залишку 283 RpfB, злитого із залишком 51 - залишком 147 RpfD, зрештою, без Met, що ініціює.

#### Конструкція Rv1807

Структура Rv1807 не є загальнодоступною, але пошук BLAST в базі даних PDB дав відповідність тільки з першими 150 залишками білка PPE Mtb (Rv2430). PE/PPE є великою родиною білків Mtb (приблизно 100 членів PE і 60 членів PPE), яка має загальний мотив PE (пролін, глутамінова кислота) або PPE (пролін, пролін, глутамінова кислота) у їх N-кінцевих частинах. Білки PE експресуються у вигляді гетеродимерів з PPE, і їхні функції ще не відомі. Пошук BLAST в UNIPROT-SWISSPROT дав декілька відповідностей, але всі вони були додатковими PPE Mtb, що не дозволяло отримувати додаткову інформацію.

У *E. coli* експресія розчинного PPE (Rv2430) або PE (Rv2431), мабуть, можлива тільки при експресії у вигляді гетеродимеру (Strong et al. 2006, Proc Natl Acad Sci 103: 8060-5). Ці автори повідомили про те, що Rv1807, який експресують в *E. coli* один, утворює тільки включення. Пошук PROSCAN не дав будь-якої значущої відповідності з відомим мотивом. Для даного білка не повідомляли або прогнозували сигнальний пептид або трансмембранний домен. Графіки HCA, а також прогнози вторинної структури узгоджувалися з добре визначеним згортанням усього білка, за винятком області останніх 60-70 залишків. Крім того, з використанням прогнозування неупорядкованих областей у нативному стані прогнозується, що останні 60 залишків є незгорнутими, тоді як прогнозування суперспіралі Rv1807 не дало будь-якого значущого результату.

Що стосується ESAT6 і TB10-4, соекспресія Rv1807 з його партнером (тобто Rv1806) імовірно надала б сприятливого впливу на стабільність білка і, отже, потенційно на його імуногенність. Експресія неправильно згорнутого білка (мономерного білка) могла б погіршити стабільність рекомбінантного вектора (токсичність білка). Крім того, незгорнута C-кінцева частина Rv1807 також могла б надавати несприятливого впливу або на імуногенність, і/або на стабільність рекомбінантного вірусу. Рекомендована первинна структура Rv1807, використовуваного у злитті, відповідає повнорозмірному білку (SEQ ID NO: 6). У разі проблеми, з якою зустрічаються при використанні повнорозмірного білка, можна використовувати антиген з усиченим C-кінцем з видаленими останніми 60 залишками (як показано в SEQ ID NO: 18).

#### Конструкція Rv3478

Rv3478 є іншим білком PPE. Його домен PPE на 57% ідентичний домену PPE Rv1807 (41%-на ідентичність між двома цілими білками). Пошук BLAST в UNIPROT-SWISSPROT дав декілька відповідностей, які усі являли собою інші PPE Mtb. Графік HCA продемонстрував присутність гідрофобних ділянок уздовж всієї послідовності білка. Іншими словами, графік HCA не свідчить про наявність у Rv3478 незгорнутої гідрофільної області. Але, як і для Rv1807, прогнозується, що останні 40-50 залишків Rv3478 є незгорнутими (на основі прогнозування і вторинної структури, і неупорядкованих областей в нативному стані). Для цього білка не повідомляли або прогнозували сигнальний пептид або трансмембранний домен. Прогнози суперспіралі на Rv3478 не дали будь-якого значущого результату. Як і для Rv1807, рекомендованою первинною структурою є повнорозмірний білок (SEQ ID NO: 13) або, за наявності проблем, усичений на C-кінці антиген з видаленими останніми 40 залишками (як показано в SEQ ID NO: 24).

#### Конструкція Rv0111

Прогнозується, що Rv0111 є мембранним білком з можливою ацилтрансферазною активністю. За допомогою DAS, TMHMM і TopPred прогнозуються десять трансмембранних доменів, що охоплюють залишки 58-427. Сигнальний пептид не прогнозувався. Вторинні структури прогнозуються уздовж всієї первинної структури з пропуском 449-469, який відповідає прогнозованій неупорядкованій області в нативному стані. Прогнозування суперспіралі на Rv0111 не дали будь-якого значущого результату.

Аналіз Proscan дав чотири збіги зі схожістю, більшою або рівною 80%: сайт ферменту альдо/кеторедуктази, ліпоїлзв'язуючий сайт ацилтрансферази, сигнатура білка транспорту цукрів і білки ліпокаліни еукаріот. Оскільки три перші сигнатури знаходяться у перших 300 залишках білка, рекомендується, таким чином, видаляти щонайменше дану частину білка для того, щоб уникнути будь-якої потенційної біологічної активності. Це також дозволило б позбавитися від більшості трансмембранних доменів білка. Отже, рекомендована первинна структура Rv0111, що підлягає застосуванню у вірусних векторах, є C-кінцевою частиною білка (наприклад, залишки 393-685 нативного антигена, як показано в SEQ ID NO: 15) з тільки одним ТМ для закріплення в плазматичній мембрані у разі конструкції, яку секретують. У разі проблем з експресією можна використовувати навіть більш усичений антиген без будь-якого ТМ домена (залишки 429-685 нативного Rv0111, починаючи із залишку 37 SEQ ID NO: 15).

## Конструкція Rv1813

Структура Rv1813 не є загальнодоступною, і пошук BLAST у PDB не дав відповідності. Rv1813 є маленьким білком (143 залишки), для якого прогнозується наявність сигнального пептиду (1-32) і відсутність трансмембранного домена. Він не демонструє значущої гомології з іншими білками в базі даних Uniprot-Swissprot. І графіки HCA, і прогнозування вторинної структури, і прогнозування невідповідних областей в нативному стані узгоджуються з добре визначеним згортанням усього білка. Прогнозування суперспіралі не дало будь-якого значущого результату. У базі даних ТБ не приводиться функція, і пошук PROSCAN не дав значущої відповідності з відомим мотивом. Отже, рекомендована первинна структура Rv1813, що підлягає застосуванню у вірусних векторах, є повнорозмірним білком без його сигнального пептиду (залишки 1-34), амінокислотна послідовність якого показана в SEQ ID NO: 19.

## Конструкція Rv3407

Структура Rv3407 не є загальнодоступною, і пошук BLAST у PDB не дав будь-якої відповідності. Rv3407 є маленьким білком (99 залишків) без значущої гомології з іншим білком у базі даних Uniprot-Swissprot. Для цього білка не повідомляли або прогнозували сигнальний пептид або трансмембранний домен. Графік HCA і прогнозування вторинної структури узгоджувалися з добре визначеним згортанням всього білка. Проте прогнозування невідповідних областей в нативному стані показало, що останні 33 залишки можуть бути незгорнутими у певну структуру. Цей останній результат, який не узгоджується з HCA і прогнозуванням вторинної структури, міг би бути сигнатурою MORE ("елемент молекулярного розпізнавання"), який згортається при зв'язуванні з білком-партнером. У випадку Rv3407 С-кінцева альфа-спіраль могла б бути присутньою тільки при зв'язуванні Rv3407 з його партнером. Прогнозування суперспіралі не дало будь-якого значущого результату. У базі даних ТБ для цього білка не приведена функція, і пошук PROSCAN не дав будь-якої значущої відповідності з відомим мотивом. Рекомендованою первинною структурою Rv3407 є повнорозмірний білок (SEQ ID NO: 12). За наявності проблеми зі стабільністю можна використовувати антиген, усічений на С-кінці, з делецією останніх 33 залишків (як показано в SEQ ID NO: 23).

## Конструкція Rv1733

Згідно UNIPROT-SWISSPROT і базі даних TB Rv1733 прогнозується як мембранний білок з двома трансмембранними доменами (які також прогнозуються з використанням DAS, TMHMM і TopPred). Перший ТМ домен прогнозувався у вигляді сигнального пептиду. Крім даних трансмембранних доменів для цього білка прогнозується мало вторинних структур. Графік HCA демонструє присутність невеликого числа гідрофобних ділянок між двома трансмембранними спіралями. Нарешті, між двома трансмембранними спіралями прогнозували невідповідну область в нативному стані (завдовжки приблизно 20 залишків). У сукупності ці результати вказують на імовірно слабе згортання крім трансмембранних доменів. Пошук PROSCAN по Rv1733 без його сигнального пептиду не дав будь-якої значущої відповідності з відомим мотивом. Прогнозування суперспіралі в Rv1733 не дало будь-якого значущого результату. Таким чином, рекомендованою первинною структурою Rv1733, що підлягає застосуванню у вірусних векторах, є весь білок мінус його сигнальний пептид (62 перших залишки), як показано в SEQ ID NO: 17. Як альтернативу, також можна використовувати повнорозмірний Rv1733 (SEQ ID NO: 5).

## Приклад 3: конструювання гібридів генів Mtb

Конструювали дванадцять різних злитих білків, як проілюстровано на Фіг. 1 і в Таблиці 3. Конкретніше, 5 гібридів конструювали на підставі біохімічних міркувань, як описано нижче, відповідно:

- гібрид №3 (RPFB-Dhyb\*);
- гібрид №5 (Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807);
- гібрид №6 (Ag85B\*-Rv2626-RPFB-Dhyb\*-Rv1733\*);
- гібрид №8 (Ag85B\*-Rv2626- Rv1733\*) і
- гібрид №14 (Rv2029\*-TB10.4-ESAT6-Rv0111\*).

Для конструювання гібридів слідували наступним біохімічним міркуванням:

- В одному злитті не слід зливати два димерних білка (тобто Rv2626 і Rv2929\*) для того, щоб уникнути будь-яких стеричних конфліктів.

- В одному злитті не слід використовувати два мембранних білка (тобто Rv1733\* і Rv0111\*) для того, щоб уникнути потенційної проблеми з токсичністю.

- Білки з ТМ (Rv1733\* і Rv0111\*) слід вставляти в кінці злиття для забезпечення закорювання конструкцій, які секретиують, в плазматичній мембрані.

- Якщо це можливо, злитий білок повинен починатися з добре згорнутого білка (тобто Ag85B\*, Rv2029\*, Rv2626, Rv0569, гібрид RPFB-D\*) для того, щоб мати ефект «шаперона» на решту частини злиття.

5 - Зробити три злиття, два з яких з мінімальним набором антигенів (тобто Ag85B\*, Rv2029\*, Rv2626, Rv0111\*, Rv1733\*, TB10-4, ESAT-6, гібрид RPFB-D\*) і останнє - гібрид з рештою (використовуваними як опція) антигенів (тобто Rv0569, Rv1813\*, Rv3407, Rv1807, Rv3478).

3 іншого боку, злиття також конструювали відносно фази захворювання TB. Гібрид №2 містить антигени активної фази (Ag85B\*-TB10.4-ESAT6), тоді як гібрид №4 містить антигени активної фази і фази поживлення (RPFB-Dhyb\*-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6). Гібрид №13 складено антигенами латентної фази (Rv2029\*-Rv2626-Rv1733\*-Rv0111\*).

10 Як описано в Матеріалах і Методах, до гібриду антигенів Mtb додавали ряд пептидів, відповідно, пептиди N-кінцевої мітки Flag і C-кінцевих с-мус і His мітки, з метою полегшення детекції кодованих генних продуктів, а також N-кінцевий сигнальний і C-кінцевий заякорюючий в мембрані пептиди для посилення імуногенної активності (слід зазначити, що додавання ТМ домена не було необхідним для гібридів, що закінчуються Rv0111\* або Rv1733\*, оскільки дані білки вже містять такі домени).

15 З метою порівняння також були сконструйовані злиття без будь-яких SS і ТМ пептидів для того, щоб оцінити цитоплазматичну експресію антигенів Mtb, які кодують. У гібридів №3 (pTG18267), №5 (pTG18269), №2 (pTG18266) і №4 (pTG18268) були піддані делеції SS і ТМ пептиди, даючи злиття №12 (pTG18307), №9 (pTG18295), №10 (pTG18296) і №11 (pTG18297). В даних конструкціях зберігали N-кінцеву мітку Flag і C-кінцеві с-мус і His мітки.

У Таблиці 3 приведено резюме різних гібридів, сконструйованих у даному дослідженні.

Таблиця 3

	Гібрид №	Антигени TB	Плазміди
Злиття на основі фази	13	Rv2029*-Rv2626-Rv1733*-Rv0111*	pTG18323
	2	Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18266
	4	RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18268
Максимальний список	5	Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807	pTG18269
Злиття на основі біохімічних правил	6	Ag85B*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733*	pTG18270
	14	Rv2029-TB10.4-ESAT6-Rv0111*	pTG18324
	8	Ag85B*-Rv2626-Rv1733*	pTG18272
	3	RPFB-Dhyb	pTG18267
Злиття без SS і ТМ	9	Rv0569-Rv1813*-Rv3407-Rv3478-Rv1807	pTG18295
	10	Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18296
	11	RPFB-Dhyb-Ag85B*-TB10.4-ESAT6	pTG18297
	12	RPFB-Dhyb	pTG18307

25 З метою порівняння, плазміди, що кодують індивідуальні гени Mtb, використані у вищеописаних злиттях, ампліфікували ПЛР, або послідовність гена була синтезована Geneart. Точніше, pTG18269 використовували як матрицю для ампліфікації Rv3407, Rv0569, Rv1807, Rv1813\* і Rv3478, тоді як pTG18323 використовували для ампліфікації Rv2626, ESAT6, Rv1733\*, Ag85B\*, TB10-4, Rv0111\* і Rv2029\* отримували у вигляді синтетичних генів.

30 Індивідуальні гени поміщали у той самий контекст, що і злиття, тобто вставляли в pGWiz нижче промотора CMV і зливали з Flag у 5' і с-мус-His послідовностями у 3'. Оскільки білки Rv1733\* і Rv0111\* містять ТМ домен, сигнальний пептид, присутній на N-кінці попередника глікопротеїну штаму ERA вірусу сказу, зливали вище послідовності Flag для того, щоб уникнути проблем з експресією. Отримані плазміди називали відповідно pTG18300 (Rv3407), pTG18301 (Rv0569), pTG18302 (Rv1807), pTG18303 (Rv1813\*), pTG18304 (Rv3478), pTG18305 (Rv2626), pTG18308 (ESAT6), pTG18309 (Rv1733\*), pTG18310 (Ag85B\*), pTG18315 (TB10.4), pTG18329 (Rv0111\*), pTG18317 (Rv2029\*).

40 Різні злиті білки оцінювали в еукаріотичній системі експресії після введення відповідних експресійних плазмід. Експресію оцінювали вестерн-блотінгом, тоді як імуногенну активність оцінювали аналізами IFN $\gamma$  методом імуоферментних плям після ДНК-імунізації мишей. При нагоді порівнювали експресію і імуногенність цитоплазматичних (без SS і ТМ) і заякорених у мембрані версій, а також імуногенність, надану гібридами, з імуногенністю, отриманою з використанням суміші плазмід, експресуючих індивідуальні антигени Mtb.

Приклад 4: Аналіз експресії антигенів Mtb і гібридів

Незалежно від того, експресувалися вони індивідуально або у злитті, експресію генів Mtb аналізували за допомогою вестерн-блотінгу з лізатів клітин, отриманих з трансфікованих клітин HEK293.

4.1 Аналіз вестерн-блотінгом лізату клітини, трансфікованої плазмідами, що кодують індивідуальні антигени Mtb

Імунодетекцію індивідуальних антигенів Mtb проводили або з використанням антитіл, спрямованих на пептиди міток, включених в експресійні касети (наприклад, антитіло проти Flag M2, кон'юговане з пероксидазою (HRP), моноклональне антитіло проти с-тус, кон'юговане з пероксидазою, і моноклональне антитіло проти His, кон'юговане з пероксидазою), або антитіл, специфічних відносно антигенів Mtb. Зокрема, сироватки, отримані після імунізації кроликів (див. Матеріали і Методи), використовували для детекції Rv1733\*, Rv2029\*, Rv0569, Rv1807, Rv0111\*, Rpf-B-D, Rv1813\*, Rv3407 і Rv3478, тоді як наявні у продажу антитіла використовували для детекції ESAT6, Ag85B\*, TB10.4 і Rv2626.

Результати узагальнено в Таблиці 4. Конкретніше, смуга, що відповідає очікуваному розміру, була детектована для усіх індивідуальних білків, якою б не була використана система імунодетекції (антитіла проти Flag, проти His, специфічні кролячі сироватки і наявні у продажу антитіла). Для деяких білків і, залежно від використаної системи імунодетекції, також були детектовані додаткові продукти. Крім того, були детектовані високі рівні експресії, за винятком Rv3407 і, у меншій мірі, TB10.4 і ESAT6. Приклади детекції експресії показані на Фіг. 2 для ряду репрезентативних антигенів Mtb, а саме - Rv2029\* (Фіг. 2A), RPF-B-D (Фіг. 2B), ESAT6 (Фіг. 2C) і Rv2626 (Фіг. 2D).

Таблиця 4

Антиген TB (плазмід)	Очікуваний розмір (рівень експресії)	Додаткові продукти при використанні антитіл проти Flag і проти His	Додаткові продукти при використанні антитіл проти Mtb
Rv3407 (pTG18300)	14,4 кДа (+)		
Rv0569 (pTG18301)	12,9 кДа (+++)		1 слабка смуга $\approx$ 10 кДа
Rv1807 (pTG18302)	43,3 кДа (++)		
Rv1813* (pTG18303)	15,1 кДа (+++)		
Rv3478 (pTG18304)	42,8 кДа (+++)	2 N-кінцевих розщеплених продукта (розпізнаваних антитілом проти Flag), що мають розмір приблизно 16 і 26 кДа	1 смуга $\approx$ 30 кДа
Rv2626 (pTG18305)	18,9 кДа (+++)	Додаткова смуга, що відповідає димерам Rv2626	Димер $\approx$ 43 кДа
ESAT6 (pTG18308)	13,0 кДа (++)		
Rv1733* (pTG18309)	21,2 кДа (+++)	Один N-кінцевий розщеплений продукт, що має розмір приблизно 20 кДа, і 3 C-кінцевих продукта, що мають розмір від 8 до 10 кДа	2 смуги $\approx$ 10 і 20 кДа
Ag85B* (pTG18310)	33,9 кДа (+++)	5 мінорних N-кінцевих розщеплених продуктів, що мають розмір приблизно 26, 24, 20, 17 і 12 кДа, а також C-кінцевий розщеплений продукт (детектований антитілом проти His), що має розмір приблизно 34 кДа.	3 слабкі смуги $\approx$ 26, 28 і 34 кДа
TB10.4 (pTG18315)	13,5 кДа (++)		
Rv0111* (pTG18329)	37,6 кДа (+++)	один N-кінцевий розщеплений продукт, що має розмір приблизно 8 кДа, і один C-кінцевий продукт, що має розмір приблизно 34 кДа	1 смуга $\approx$ 34 кДа і 2 дуже слабкі смуги $\approx$ 18 і 20 кДа
Rv2029* (pTG18317)	35,8 кДа (+++)		

Продовження таблиці 4

RfpB-Dhyb* (pTG18307)	39,4 кДа (+++)	2 слабкі смуги ≈ 40 кДа
--------------------------	-------------------	-------------------------

4.2 Аналіз вестерн-блотінгом лізату клітин, трансфікованих плазмідами, що кодують злиття антигенів Mtb

Клітини HEK293 трансфікували плазмідами, що експресують різні злиття генів Mtb, і продукти експресії аналізували вестерн-блотінгом в таких самих умовах, які описані вище. Трансфекції проводили у присутності, але також і за відсутності інгібітора протеасом MG132. Тут імунодетекцію знову проводили з використанням антитіла проти Flag M2, кон'югованого з пероксидазою (HRP), моноклонального антитіла проти с-мус, кон'югованого з пероксидазою, і моноклонального антитіла проти His, кон'югованого з пероксидазою, а також антитіл, специфічних відносно антигенів Mtb.

Очікувані розміри мічених гібридів наведені нижче:

- гібрид №2 (pTG18266): 63,6 кДа
- гібрид №3 (pTG18267): 49,0 кДа
- гібрид №4 (pTG18268): 99,7 кДа
- гібрид №5 (pTG18269): 122,0 кДа
- гібрид №6 (pTG18270): 103,5 кДа
- гібрид №8 (pTG18272): 67,3 кДа
- гібрид №9 (pTG18295): 112,9 кДа
- гібрид №10 (pTG18296): 53,8 кДа
- гібрид №11 (pTG18297): 90,0 кДа
- гібрид №12 (pTG18307): 39,3 кДа
- гібрид №13 (pTG18323): 101,5 кДа
- гібрид №14 (pTG18324): 90,6 кДа.

Усі злиття антигенів Mtb детектували моноклональними антитілами проти Flag і проти His. Злиті продукти Mtb також детектували моноклональним антитілом проти с-мус, за винятком pTG18266, pTG18267, pTG18268 і pTG18269. Епітоп с-мус можливо недоступний в даних злиттях через суміжні ТМ домени, оскільки цитоплазматичні аналоги (pTG18296, pTG18307, pTG18297 і pTG18295) добре детектуються антитілом проти мус. На Фіг. 3 проілюстрований аналіз вестерн-блотінгом гібридів Mtb, що охоплюють антигени латентної фази (pTG18295, що кодує гібрид №9), антигени активної фази (pTG18296, що кодує гібрид №10), антигени фази пожвавлення (pTG18307, що кодує гібрид №12) і антигени і фази пожвавлення, і активної фази (pTG18297, що кодує гібрид №11) після імунодетекції антитілами проти Flag. Імунодетекція антитілами проти His давала таку ж картину експресії.

На Фіг. 4 проілюстрований аналіз вестерн-блотінгом гібридів Mtb, що включають TB10.4 (Фіг. 4A), Rv0569 (Фіг. 4B) і Rv2626 (Фіг. 4C), після імунодетекції відповідними специфічними сироватками, відповідно, TB10.4-місних гібридів №2 (pTG18266), №10 (pTG18296), №4 (pTG18268), №11 (pTG18297), №14 (pTG18324); Rv0569-місних гібридів №5 (pTG18269) і №9 (pTG18295) і Rv2626-місних гібридів №13 (pTG18323), №6 (pTG18270) і №8 (pTG18272). pGWiz показана як негативний контроль, і pTG18315, що кодує TB10.4, як позитивний контроль.

Якою б не була система імунодетекції, для всіх гібридів відмічено смугу, що відповідає очікуваному розміру, і в деяких випадках також спостерігали додаткові злиті продукти. Зокрема, для pTG18270, pTG18272 і pTG18323 детектували димери. Ці три злиття містять Rv2626, який має здатність утворювати димери, стійкі до відновлювальних умов. Імунодетекція антитілами проти Flag і проти His виявляла деякі додаткові міnorні протеолітичні продукти для pTG18323 і pTG18269. Крім того, додаткові продукти, що мають розмір більший, ніж очікуваний, детектували для pTG18266, pTG18268, pTG18269, pTG18270, pTG18272, pTG18323 і pTG18324 антитілами проти Flag і проти His. Дані смуги відповідають N-глікозилюваним продуктам, оскільки це було продемонстровано обробкою N-глікозидазою F in vitro (тобто після обробки клітинних екстрактів N-глікозидазою були отримані продукти експресії очікуваного розміру). Усі злиття, що містять сигнальний пептид, приводили до N-глікозилюваних продуктів, за винятком злиття №4 (pTG18267, RpfB-D\*). N-глікозилювані продукти також детектували антигенспецифічними антитілами, як і димери для гібридів pTG18270, pTG18272 і pTG18323, що містять Rv2626. Для деяких гібридів з використанням специфічних сироваток також були доведені протеолітичні продукти (дані не показані), залежно від гібридів і сироваток. Наприклад, з використанням сироватки, специфічної відносно Rv3407, детектували додаткові смуги ≈40 кДа

для рTG18269 і  $\approx 36$  і 38 кДа для рTG18295, але їх не видно при використанні сироватки, специфічної відносно Rv0569.

У присутності MG132 отримували аналогічні і більш високі рівні експресії для всіх гібридів і детектували великі кількості продуктів. Рівні експресії гібридів, заякорених в мембрані (рTG18269, рTG18268) були зіставні з рівнями, детектованими з їх цитоплазматичними еквівалентами (рTG18295, рTG18297), за винятком рTG18266, який експресувався краще, ніж цитоплазматичний гібрид (рTG18296). Гібрид №5 (рTG18269) дуже слабо детектувався антитілом, специфічним відносно Rv1807, тоді як це було не так для цитоплазматичного злиття (рTG18295). Специфічні епітопи Rv1807 можливо недоступні в даному злитті через суміжну ТМ послідовність.

Приклад 5: оцінка ДНК-імунізації

Імуногенну активність різних гібридів антигенів Mtb оцінювали в різних мишачих моделях після ДНК-імунізації.

5.1. Оцінка імуногенності, індукованої гібридами на основі антигенів Mtb активної фази

Мишей BALB/c три рази з 3-тижневим інтервалом імунізували плазмідною, що експресує гібрид "Ag85B - TB10.4 - ESAT6", або у формі, заякореній в клітинній мембрані (SS/TM: рTG18266), або у цитоплазматичній формі (рTG18296) за допомогою внутрішньом'язового шляху. З метою порівняння мишей також імунізували сумішшю плазмід, що кодують індивідуальні антигени Mtb, включені в гібрид (рTG18310 (Ag85B) плюс рTG18315 (TB10.4) плюс рTG18308 (ESAT6)), і порожньою рGWiz в якості негативного контролю. Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* різними пептидними пулами, описаними в Матеріалах і Методах.

Як проілюстровано на Фіг. 5, сильна клітинна відповідь проти антигенів Ag85B і TB10.4 була індукована у всіх мишей, імунізованих рTG18266 (експресуючою заякорену версію злиття Ag85B-TB10.4-ESAT), тоді як IFN $\gamma$ -продукуючі клітини проти ESAT-6 генерувалися у 6 з 8 тварин (Фіг. 5a). У мишей, імунізованих рTG18296 (експресуючою цитоплазматичну версію злиття Ag85B-TB10.4-ESAT), також була детектована активація IFN $\gamma$ -продукуючих клітин проти антигенів Ag85B і TB10.4, але на меншому рівні у порівнянні з активацією, індукованою заякореним гібридом, тоді як проти ESAT-6 були детектовані дуже слабкі відповіді (Фіг. 5b). Дуже цікаво, що при порівнянні Фіг. 5a/5b і Фіг. 5c найсильніші відповіді проти усіх трьох антигенів були детектовані при експресії Ag85B, TB10.4 і ESAT-6 у вигляді злитого білка (рTG18266 і рTG18296), а не при незалежній експресії з індивідуальних плазмід (суміш рTG18310, рTG18315 і рTG18308). Як і очікувалося, імунізація порожньою плазмідною не індукувала будь-якої специфічної імунної відповіді (Фіг. 5d).

Таким чином, щонайменше для антигенів Mtb активної фази, дані результати підкреслюють користь конструювання гібридів антигенів, які експресують на поверхні клітини (з пептидами SS і TM), для оптимізації імуногенної активності гібридів антигенів Mtb, що утворюються.

5.2. Оцінка імуногенності, індукованої гібридами на основі антигенів Mtb активної фази і фази пожвавлення

Мишей BALB/c три рази з 3-тижневим інтервалом імунізували плазмідною, що експресує гібрид "RpfB-Dhуb - Ag85B - TB10.4 - ESAT6" або у формі, заякореній в клітинній мембрані (SS/TM: рTG18268), або у цитоплазматичній формі (рTG18297), за допомогою внутрішньом'язового шляху. З метою порівняння мишей також імунізували сумішшю плазмід, що кодують індивідуальні антигени TB, включені в гібрид (рTG18307 (RpfB-Dhуb) плюс рTG18310 (Ag85B) плюс рTG18315 (TB10.4) плюс рTG18308 (ESAT6)), і порожньою рGWiz в якості негативного контролю. Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* різними пептидними пулами, описаними в Матеріалах і Методах.

Як проілюстровано на Фіг. 6, імунізація плазмідною рTG18268 (експресуючою заякорену версію злиття RpfB-Dhуb-Ag85B-TB10.4-ESAT6) приводила до сильної відповіді, специфічної відносно антигенів RpfB-Dhуb, Ag85B і TB10.4, що характеризується детекцією високих рівнів IFN $\gamma$ -продукуючих клітин після повторної стимуляції *ex vivo* відповідними пептидними пулами, тоді як IFN $\gamma$ -продукуючі клітини проти ESAT-6 індукувалися у меншого числа тварин і з меншими рівнями індукції (Фіг. 6a). У мишей, імунізованих рTG18297 (експресуючою цитоплазматичну версію злиття RpfB-Dhуb-Ag85B-TB10.4-ESAT6), також була детектована активація IFN $\gamma$ -продукуючих клітин проти антигенів RpfB-Dhуb, Ag85B і TB10.4, але з меншим рівнем у порівнянні з активацією, індукованою заякореним гібридом, тоді як проти ESAT-6 генерувалися дуже слабкі відповіді (Фіг. 6b). За винятком ESAT-6, як проілюстровано на Фіг. 6c, найсильніші відповіді проти Mtb були отримані проти RpfB-Dhуb, Ag85B і TB10.4 при експресії у

вигляді злитого білка (pTG18268 і pTG18297, Фіг. 6a і 6b), а не при незалежній експресії з індивідуальних плазмід (суміш pTG18307 плюс pTG18310 плюс pTG18315 плюс pTG18308). Як і очікувалося, імунізація порожньою плазмідною не індукувала будь-якої специфічної імунної відповіді (Фіг. 6d).

5.3. Оцінка імуногенності, індукованої гібридами на основі антигенів Mtb фази пожвавлення Мишей BALB/c три рази з 3-тижневим інтервалом імунізували плазмідною, що експресує гібрид "RpfB-Dhyb" або у формі, заякореній в клітинній мембрані (SS/TM: pTG18267), або у цитоплазматичній формі (pTG18307), за допомогою внутрішньом'язового шляху. Порожню pGWiz використовували в якості негативного контролю. Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* чотирма пептидними пулами, описаними в Матеріалах і Методах.

Як проілюстровано на Фіг. 7, високі рівні IFN $\gamma$ -продукуючих клітин спостерігали у мишей, вакцинованих pTG18267 (що експресує заякорену версію злиття RpfB-Dhyb з пептидами SS/TM), зазначаючи, що у даних мишей встановлювалася сильна специфічна клітинна відповідь (Фіг. 7A). Імунізація pTG18307 (що експресує цитоплазматичну версію злиття RpfB-Dhyb) також приводила до активації IFN $\gamma$ -продукуючих клітин, але у трохи меншій мірі (Фіг. 7B). Крім того, дана відповідь здавалася більш гомогенною в групі тварин, оброблених pTG18267, ніж в групі, обробленій pTG18307. Як і очікувалося, імунізація порожньою плазмідною не індукувала будь-якої специфічної імунної відповіді (Фіг. 7C).

5.4. Оцінка імуногенності, індукованої гібридами на основі антигенів Mtb латентної фази

Мишей BALB/c три рази з 3-тижневим інтервалом імунізували плазмідною, що експресує гібрид "Rv0569 - Rv1813 - Rv3407 - Rv3478 - Rv1807" або у формі, заякореній в клітинній мембрані (pTG18269), або у цитоплазматичній формі (pTG18295), за допомогою внутрішньом'язового шляху. З метою порівняння мишей також імунізували сумішшю плазмід, що кодують індивідуальні антигени Mtb, включені в гібрид (pTG18300 (Rv3407) плюс pTG18301 (Rv0569) плюс pTG18302 (Rv1807) плюс pTG18303 (Rv1813) плюс pTG18304 (Rv3478)), і порожньою pGWiz в якості негативного контролю. Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* різними пептидними пулами, описаними в Матеріалах і Методах.

Як проілюстровано на Фіг. 8, імунізація плазмідною pTG18269 (що експресує заякорену версію злиття Rv0569 - Rv1813 - Rv3407 - Rv3478 - Rv1807) приводила до сильної відповіді, специфічної відносно антигенів Rv3407 і Rv3478, і у меншій мірі - відносно Rv1807 (Фіг. 8a). Аналогічні рівні IFN $\gamma$ -продукуючих клітин проти цих трьох антигенів були отримані у мишей, імунізованих pTG18295 (що експресує цитоплазматичну версію злиття Rv0569 - Rv1813 - Rv3407 - Rv3478 - Rv1807), (Фіг. 8b). Відповіді у мишей, яким ін'єктували суміш плазмід, знаходилися в межах того самого порядку (Фіг. 8c). З іншого боку, в усіх випадках не могли бути детектовані значущі відповіді проти Rv1813 і Rv0569 (Фіг. 8a, b і c). Як і очікувалося, імунізація порожньою плазмідною не індукувала будь-якої специфічної імунної відповіді (Фіг. 8d).

Для дослідження відповідей проти антигенів Mtb також використовували інші лінії мишей для того, щоб покрити різні гаплоти МНС: мишей BALB/c, що є H-2<sup>d</sup>, мишей C57BL/6, що є H-2<sup>b</sup>, мишей CBA/J і C3H/HeN, що є H-2<sup>k</sup>.

Мишей три рази з 2-тижневим інтервалом імунізували pTG18323, що експресує антигени з латентної фази "Rv2029 - Rv2626 - Rv1733 - Rv0111", або порожньою pGWiz в якості негативного контролю за допомогою внутрішньом'язового шляху. Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* різними пептидними пулами, описаними у розділі Матеріалів і Методів. Як проілюстровано на Фіг. 10, імунізація мишей C3H/HeN плазмідною pTG18323 приводила до сильної імунної відповіді, специфічної відносно антигенів Rv2029 (позитивний пул пептидів №1), Rv2626 (позитивний пул №2) і Rv1733 (позитивний пул №2) (Фіг. 10a). Після імунізації pGWiz і повторної стимуляції *ex vivo* пептидними пулами Rv0111 детектували неспецифічну фонову відповідь (Фіг. 10b), таким чином, утруднюючу детекцію специфічної відповіді проти Rv0111 після вакцинації pTG18323.

Імунні відповіді, специфічні відносно антигенів Rv2029, Rv2626 і Rv1733, також детектували з аналогічними рівнями, що і спостережували у мишей H-2<sup>k</sup> CBA/J, імунізованих pTG18323. На відміну від цього, у мишей BALB/c IFN $\gamma$ -продукуючі клітини специфічно детектували тільки після повторної стимуляції пептидами Rv2626, тоді як у мишей C57BL/6 не був детектований сигнал.

В цілому, дані результати підкреслюють той факт, що протестовані послідовності гібридів антигенів Mtb здатні індукувати надійні, основані на клітинах, імунні відповіді у мишей різних гаплотипів.

5.5. Оцінка імуногенності, індукованої гібридами, сконструйованими на основі біохімічних правил

Мишей BALB/c або мишей C57BL/6 три рази з 2-тижневим інтервалом імунізували плазмідками, що кодують гібрид номер 6, 8 або 14, сконструйований згідно біохімічним властивостям антигенів Mtb, тобто pTG18270 (Ag85B - Rv2626 - RpfB-Dhyb - Rv1733), pTG18272 (Ag85B - Rv2626 - Rv1733) і pTG18324 (Rv2029 - TB10.4 - ESAT-6 - Rv0111), за допомогою внутрішньом'язового шляху. З метою порівняння мишей також імунізували порожньою pGWiz в якості негативного контролю. Клітинну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції *ex vivo* різними пептидними пулами, описаними в розділі Матеріалів і Методів.

Сильна клітинна відповідь, специфічна відносно антигенів Ag85B і RpfB-Dhyb, індуковалася і у BALB/c, і у C57BL/6 мишей, імунізованих pTG18270, тоді як високий рівень IFN $\gamma$ -продукуючих клітин, специфічних відносно Rv2626, детектували тільки у мишей BALB/c. Імунізація pTG18272 приводила до активації IFN $\gamma$ -продукуючих клітин, специфічних відносно Ag85B, у мишей BALB/c і специфічних відносно антигенів Ag85B і Rv2626 у мишей C57BL/6, але до меншого рівня у порівнянні з відповіддю, індукованою pTG18270. У мишей, імунізованих pTG18324, детектували високі рівні IFN $\gamma$ -продукуючих клітин, специфічних відносно антигенів TB10.4 і ESAT-6, тоді як IFN $\gamma$ -продукуючі клітини, специфічні відносно Rv2029 і Rv0111, також індуковалися, але до менших рівнів. Як і очікувалося, імунізація порожньою плазмідкою не індукувала будь-якої специфічної імунної відповіді.

В цілому, протестовані злиття, сконструйовані згідно з міркуваннями, основаними на біохімії, для того, щоб збільшувати стабільність і продукцію гібридів, демонструють хорошу імуногенну відповідь, специфічну відносно антигенів Mtb з різних фаз інфекції.

5.6. Оцінка гуморальної відповіді проти Rv1733, індукованої гібридами антигенів Mtb

Мишей BALB/c три рази з 3-тижневим інтервалом імунізували плазмідками, що експресують гібрид "Ag85B\* - Rv2626 - Rv1733\*" (pTG18270) і гібрид "Ag85B\* - Rv2626 - RpfB-Dhyb\* - Rv1733\*" (pTG18272), за допомогою внутрішньом'язового шляху. З метою порівняння мишей також імунізували сумішшю плазмід, що кодують індивідуальні антигени Mtb, включені в гібрид (pTG18310 (Ag85B\*) плюс pTG18305 (Rv2626) плюс pTG18309 (Rv1733\*)), і порожньою pGWiz в якості негативного контролю. Гуморальну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК. Сироватки імунізованих мишей об'єднували і аналізували вестерн-блотінгом. Конкретніше, 100 нг/смугу рекомбінантного білка Rv1733 (продукованого у *E. coli*, див. приклад №8) завантажували на акриламідний гель, і імунодетекцію проводили з використанням сироваток, розведених 1/200. В результаті спостерігали специфічну детекцію білка Rv1733 з використанням сироваток мишей, імунізованих pTG18270, pTG18272 і сумішшю плазмід, що кодують індивідуальні антигени Mtb.

5.7. Оцінка гуморальної відповіді проти Rv1813, індукованої гібридами антигенів Mtb

Мишей BALB/c три рази з 3-тижневим інтервалом імунізували плазмідкою, що експресує гібрид "Rv0569 - Rv1813 - Rv3407 - Rv3478 - Rv1807" або у формі, заякореній в клітинній мембрані (SS/TM: pTG18269), або у цитоплазматичній формі (pTG18295), за допомогою внутрішньом'язового шляху. З метою порівняння мишей також імунізували сумішшю плазмід, що кодують індивідуальні антигени Mtb, включені в гібрид (pTG18300 (Rv3407) плюс pTG18301 (Rv0569) плюс pTG18302 (Rv1807) плюс pTG18303 (Rv1813) плюс pTG18304 (Rv3478)), і порожньою pGWiz в якості негативного контролю. Гуморальну імунну відповідь оцінювали через 2 тижні після останньої ін'єкції ДНК. Сироватки імунізованих мишей об'єднували і аналізували вестерн-блотінгом з використанням 100 нг/смугу рекомбінантного білка Rv1813 (продукованого у *E. coli*, див. приклад №8), завантаженого на акриламідний гель. Імунодетекцію проводили з використанням сироваток, розведених 1/200. В результаті білок Rv1813 специфічно детектувався з використанням сироваток мишей, імунізованих pTG18269 (що кодує гібрид у формі, заякореній в клітинній мембрані).

Приклад 6: отримання рекомбінантного MVA, що експресує антигени Mtb

Для експресії одного або аж до трьох гібридів Mtb конструювали всього 10 вакцин-кандидатів на основі MVA, і експресію різних антигенів Mtb аналізували вестерн-блотінгом з клітинних лізатів, отриманих з інфікованих клітин A549.

6.1 Отримання рекомбінантного MVA на основі фази захворювання TB

Конструювали сім рекомбінантних кандидатів на основі MVA таким чином, щоб вони містили одну, дві або три касети для експресії гібридів Mtb, репрезентативних для різних фаз



захворювання ТВ. І гібрид №4, і гібрид №11 містять антигени активної фази і фази поживлення (RPFB-Dhyb\*-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6), які експресують або заякорені в клітинній мембрані (гібрид №4, оснащений N-кінцевим сигнальним пептидом і C-кінцевим пептидом, що заякорює в мембрані), або в цитоплазмі (гібрид №11 відповідає цитоплазматичній версії злиття №4). Гібрид №13 містить антигени латентної фази (Rv2029\*-Rv2626-Rv1733\*-Rv0111\*). І гібрид №5, і гібрид №9 містять додаткові антигени латентної фази (Rv056-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807), які експресують в різній клітинній локалізації: або заякорені в клітинній мембрані (гібрид №5 містить N-кінцевий сигнальний і C-кінцевий, що заякорює в мембрані, пептиди), або в цитоплазмі (гібрид №9).

В цілому, сім кандидатів на основі MVA є такими:

- MVATG18355 містить гібрид №13 під контролем промотора p7.5K.
- MVATG18364 містить гібрид №13 під контролем промотора p7.5K і гібрид №4 під контролем промотора pH5R.

- MVATG18365 містить гібрид №13 під контролем промотора p7.5K і гібрид №11 під контролем промотора pH5R.

- MVATG18376 містить гібрид №13 під контролем промотора p7.5K, гібрид №4 під контролем промотора pH5R і гібрид №5 під контролем промотора B2R.

- MVATG18377 містить гібрид №13 під контролем промотора p7.5K, гібрид №11 під контролем промотора pH5R і гібрид №5 під контролем промотора B2R.

- MVATG18378 містить гібрид №13 під контролем промотора p7.5K, гібрид №4 під контролем промотора pH5R і гібрид №9 під контролем промотора B2R.

- MVATG18379 містить гібрид №13 під контролем промотора p7.5K, гібрид №11 під контролем промотора pH5R і гібрид №9 під контролем промотора B2R.

#### 6.2 Отримання рекомбінантного MVA на основі біохімічних міркувань

Конструювали три рекомбінантних кандидата на основі MVA таким чином, щоб вони містили дві або три касети для експресії гібридів Mtb, розроблених у зв'язку з біохімічними міркуваннями. Гібрид №6 містить наступні антигени Ag85B\*-Rv2626-RPFB-Dhyb\*-Rv1733\*, тоді як гібрид №14 містить Rv2029\*-TB10.4-ESAT6-Rv0111\*. Для обох гібридів додавали N-кінцеві сигнальні пептиди, тоді як TM домен не додавали, оскільки дані злиття закінчуються Rv0111 або Rv1733, які вже містять пептиди, що заякорюють в мембрані.

- MVATG18404 містить гібрид №14 під контролем промотора p7.5K і гібрид №6 під контролем промотора pH5R.

- MVATG18417 містить гібрид №14 під контролем промотора p7.5K, гібрид №6 під контролем промотора pH5R і гібрид №5 під контролем промотора B2R.

- MVATG18418 містить гібрид №14 під контролем промотора p7.5K, гібрид №6 під контролем промотора pH5R і гібрид №9 під контролем промотора B2R.

#### 6.3 Аналіз вестерн-блотінгом антигенів Mtb і гібридів, які експресують MVA

Клітини A549 інфікували (MOI 1) різними кандидатами на основі MVA, описаними вище, і продукти експресії аналізували вестерн-блотінгом за умов, описаних в Матеріалах і Методах. Імунодетекцію проводили антитілами, специфічними відносно різних описаних тут антигенів Mtb. Конкретно, сироватки, отримані після імунізації кроликів (див. Матеріали і Методи), використовували для детекції Rv1733\*, Rv2029\*, Rv0569, Rv1807, Rv0111\*, RPFB-Dhyb\*, Rv1813\*, Rv3407 і Rv3478, тоді як наявні у продажу антитіла використовували для детекції ESAT6, Ag85B\*, TB10.4 і Rv2626.

Як наслідок, для всіх гібридів була виявлена смуга, що відповідала очікуваному розміру, яким би не був тестований рекомбінантний MVA. Конкретніше, смуга, що відповідала приблизно 98,4 кДа (очікуваний розмір для злиття №13), була детектована в клітинних лізатах, що походять з клітин, інфікованих MVATG18355, MVATG18364, MVATG18365, MVATG18376, MVATG18377, MVATG18378 і MVATG18379, після імунодетекції антитілами проти Rv2626 і Rv0111. Смуга, що відповідає приблизно 96,7 кДа (очікуваний розмір для злиття №4), і смуга, що відповідає приблизно 87 кДа (очікуваний розмір для злиття №11), була детектована в клітинних лізатах, що походять з клітин, інфікованих, відповідно, MVATG18364, MVATG18376 і MVATG18378, що містять гібрид №4, і MVATG18365, MVATG18377 і MVATG18379, що містять гібрид №11, після імунодетекції антитілами проти ESAT6. Крім того, смуга, що відповідає приблизно 119,7 кДа (очікуваний розмір для злиття №5), і смуга, що відповідає приблизно 109,9 кДа (очікуваний розмір для злиття №9), була детектована в клітинних лізатах, що походять з клітин, інфікованих, відповідно, MVATG18376 і MVATG18377, що містять гібрид №5, і MVATG18378 і MVATG18379, що містять гібрид №9, після імунодетекції антитілами проти Rv3407. Нарешті, смуга, що відповідає приблизно 100,4 кДа (очікуваний розмір для злиття №6), і смуга, що відповідає приблизно 87,5 кДа (очікуваний розмір для злиття №14), була

детектована в клітинних лізатах, що походять з клітин, інфікованих MVATG18404, після імунодетекції антитілами проти Rv2626 і Rv0111 відповідно.

Крім того, в деяких випадках також спостерігали додаткові злиті продукти. Зокрема, для злиття №13 і злиття №6 детектували димери, що імовірно утворюються як наслідок здатності Rv2626 формувати димери, стійкі до відновлювальних умов. Що стосується злиття №13, експресія всього злиття №13 (очікуваний розмір 98,4 кДа) була насправді детектована, але на низькому рівні. Мажорні протеолітичні продукти, що свідчать про протеолітичне розщеплення злиття №13, спостерігали при використанні антитіла проти Rv2626 (приблизно 70 кДа) і при використанні антитіла проти Rv0111 (приблизно 30 кДа).

Аналогічний рівень експресії детектували для гібридів №4 і №11, які містять ті самі антигени (RPFb-Dhyb\*-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6), але або заякорені в мембрані (гібрид №4), або цитоплазматичні (гібрид №11). Для гібрида №4 спостерігали смугу, що має розмір, більший, ніж очікуваний (115 кДа замість 96,7 кДа), яка імовірно відповідає N-глікозильованим продуктам. Для обох гібридів також детектували міnorні протеолітичні продукти.

Аналогічний рівень експресії також виявляли з використанням антитіла проти Rv3407 в клітинних лізатах MVA, експресуючого злиття №5 і №9 (які обидва відповідають злиттю антигенів Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807, але які експресують у формі, заякореній в мембрані (гібрид №5) або у цитоплазматичній формі (гібрид №9)). У лізатах клітин, що експресують гібрид №5, була присутня смуга, що має розмір, більший, ніж очікуваний (120 кДа замість 98,4 кДа), що імовірно відповідала N-глікозильованим продуктам. З іншого боку, гібрид №5 дуже слабо детектувався антитілом проти Rv1807, тоді як це було не так для цитоплазматичної версії. Припускається, що епітопи, специфічні для Rv1807, можуть бути недоступними у заякореному в мембрані злитті через суміжну послідовність TMR.

Приклад 7: оцінка імуногенності вакцин-кандидатів на основі MVA, що експресують антигени Mtb

7.1 Оцінка імуногенності вакцин-кандидатів на основі MVA, що експресують антигени Mtb, у мишей BALB/c

Мишей BALB/c імунізували MVATG18365 і MVATG18364, які обидві експресували "Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111" (відповідне злиттю №13), а також "RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6" (відповідне злиттю №4 або №11). У злитті №13 домен SS присутній на N-кінці, і Rv1733 і Rv0111 експресуються з ТМ доменом, який повинен спрямовувати експресію злиття до поверхні клітини. Гібрид №4, який експресують MVATG18364, містить і SS, і ТМ домен, тоді як гібрид №11 (MVATG18365) не містить і теоретично повинен зберігати цитоплазматичну експресію. Специфічні клітинні імунні відповіді оцінювали через один тиждень після ін'єкції за допомогою аналізу IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції описаними тут пулами пептидів. Мишей також імунізували порожнім вектором на основі MVA (MVATGN33.1) в якості негативного контролю.

Як проілюстровано на Фіг. 11a і b відповідно, обидва вектори, MVATG18365 і MVATG18364, індукували у мишей BALB/c позитивні відповіді IFN $\gamma$ , специфічні відносно Rv2626, Rv0111, RpfB-Dhyb, Ag85B і TB10.4, у порівнянні з вектором MVATGN33.1. Дані відповіді були систематично сильніші при використанні MVATG18364 (заякорена версія) у порівнянні з MVATG18365 (цитоплазматична версія), за винятком того, що Rv2626 демонстрував аналогічні відповіді. Детектували слабкіші і спорадичні відповіді, специфічні відносно Rv2029, Rv1733 і ESAT6.

Крім того, усі рекомбінантні вакцини-кандидати на основі MVA, описані в розділі "Приклад 6", ін'єктували мишам BALB/c, і клітинні імунні відповіді, специфічні відносно всіх антигенів Mtb, оцінювали за допомогою аналізів IFN $\gamma$  методом імуноферментних плям, як описано в розділі Матеріалів і Методів. Короткий огляд охопту і інтенсивності відповідей, індукованих у мишей BALB/c кожним кандидатом на основі MVA, описаний на Фіг. 12. Усі вакцини на основі MVA з гібридами антигенів Mtb, сконструйованими згідно фази захворювання TB або біохімічним міркуванням, могли індукувати у мишей BALB/c відповідь IFN $\gamma$ , специфічну відносно 12 з 14 антигенів. Не детектували позитивну клітинну відповідь, специфічну відносно двох антигенів латентної фази: Rv1733 і Rv0569.

7.2 Оцінка імуногенності вакцин-кандидатів на основі MVA, що експресують антигени Mtb, у трансгенних мишей HLA-A2

Як автори винаходу спостерігали в дослідженнях на основі ДНК, гаплотип мишей має вплив на імуногенність вибраних антигенів Mtb (див. розділ 5). Для того, щоб додатково проаналізувати імуногенність антигенів Rv1733 і Rv0569, індуковану кандидатами на основі MVA, трансгенним мишам, що експресують людську молекулу MHC (головний комплекс гістосумісності) класу I, HLA-A2, ін'єктували рекомбінантні MVA, що експресують обидва антигена. Клітинну імунну відповідь оцінювали через один тиждень після ін'єкції за допомогою

аналізу INF $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції описаними тут пулами пептидів. Мишей також імунізували порожнім вектором на основі MVA (MVATGN33.1) в якості негативного контролю. Зокрема, мишей HLA-A2 імунізували вакцинами MVATG18376 або MVATG18378, що експресують "Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111" (що відповідає злиттю №13), "RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6" (що відповідає злиттю №4), а також "Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807" (що відповідає злиттю №5 або №9). У злитті №5, яке експресують MVATG18376, домени SS і TM експресувалися на N-кінцевій і C-кінцевій частині відповідно. На Фіг. 13 проілюстрована відповідь INF $\gamma$ , індукована у мишей HLA-A2, імунізованих вакциною MVATG18376. Детектували імунну відповідь, специфічну відносно 7 з 14 антигенів (Фіг. 13а). Високі рівні клітин, що продукують INF $\gamma$ , детектували при повторній стимуляції спленоцитів пептидами, специфічними відносно антигенів RpfB-Dhyb і Ag85B (1397 плям/10<sup>6</sup> клітин і 1160 плям/10<sup>6</sup> клітин відповідно). На відміну від цього, вакцина MVATG18376 індукувала менші рівні клітинних відповідей, специфічних відносно Rv1807, Rv1813, Rv3407 і ESAT6. Крім того, низький (1х поріг відсікання < медіана < 2х поріг відсікання, 186 плям/10<sup>6</sup> клітин, Фіг. 13а), але значущий рівень клітин, продукуючих INF $\gamma$ , детектували при повторній стимуляції клітин Rv0569-специфічними пептидами у порівнянні з сигналом, детектованим при використанні порожньої вакцини MVATGN33.1 (36 плям/10<sup>6</sup> клітин, Фіг. 13b). Аналогічні результати також були індуковані у мишей HLA-A2, вакцинованих кандидатом MVATG18378, який індукував додаткові слабкі відповіді, специфічні відносно антигенів Rv0111 і TB10.4. Відповіді INF $\gamma$ , індуковані обома вакцинами, MVATG18376 і MVATG18378, узагальнені на Фіг. 15. Яким би не був ін'єктований кандидат на основі MVA, у трансгенних мишей HLA-A2 не могли спостерігати детектовної відповіді, специфічної відносно Rv1733, Rv2029, Rv2626 і Rv3478.

7.3 Оцінка імуногенності вакцин-кандидатів на основі MVA, що експресують антигени Mtb, у мишей C57BL/6

Мишей C57BL/6 гаплотипу H-2<sup>b</sup> імунізували вакцинами MVATG18377 або MVATG18379, що експресують "Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111" (що відповідає злиттю №13), "RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6" (що відповідає злиттю №11), а також "Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807" (що відповідає злиттю №5 або №9), для того, щоб продемонструвати імуногенність антигенів Rv0569 і Rv1733. Клітинну імунну відповідь оцінювали через один тиждень після ін'єкції за допомогою аналізів INF $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції описаними тут пулами пептидів. Мишей також імунізували порожнім вектором на основі MVA (MVATGN33.1) в якості негативного контролю. Клітинні відповіді INF $\gamma$  узагальнені на Фіг. 15. Обидві вакцини на основі MVA могли запускати сильну імунну відповідь, специфічну відносно антигенів Rv1807, RpfB-Dhyb, Rv3478, Ag85B і ESAT6 (що варіює від 92 до 861 плям/10<sup>6</sup> клітин), тоді як позитивну відповідь INF $\gamma$ , специфічну відносно антигенів TB10.4 і Rv0569, детектували тільки у мишей, імунізованих кандидатом MVATG18379 (78 і 58 плям/10<sup>6</sup> клітин відповідно). У імунізованих мишей C57BL/6 не детектували позитивну відповідь, специфічну відносно Rv1733, Rv2029, Rv2626, Rv0111, Rv1813 і Rv3407.

7.4 Оцінка імуногенності вакцин-кандидатів на основі MVA, що експресують антигени Mtb, у мишей C3H/HeN

Оскільки імуногенність, специфічна відносно Rv1733, була продемонстрована у мишей C3H/HeN гаплотипу H-2<sup>k</sup>, вакцинованих плазмідами (див. розділ 5.4), даній лінії мишей ін'єктували MVATG18376, MVATG18378, MVATG18377 і MVATG18379, що експресують злиття, які містять білок Rv1733. Клітинну імунну відповідь оцінювали через один тиждень після ін'єкції за допомогою аналізів INF $\gamma$  методом імуноферментних плям після повторної стимуляції описаними тут пулами пептидів. Мишей також імунізували порожнім вектором MVATGN33.1 в якості негативного контролю. Як проілюстровано на Фіг. 14, вакцина MVATG18377 індукувала відповіді INF $\gamma$  у мишей C3H/HeN у порівнянні з MVATGN33.1. Високі рівні клітин, продукуючих INF $\gamma$ , детектували при повторній стимуляції спленоцитів пептидами Rv2029 і Rv2626 (660 і 353 плями/10<sup>6</sup> клітин відповідно). У імунізованих мишей C3H/HeN також індукувалася слабка клітинна імунна відповідь, специфічна відносно антигенів RpfB-Dhyb, Rv1813, Rv3407 і Rv3478, що варіює від 78 до 250 плям/10<sup>6</sup> клітин. Як продемонстровано у мишей C3H/HeN, вакцинованих ДНК, у даної лінії мишей запускала відповідь INF $\gamma$ , специфічна відносно Rv1733 (183 плями/10<sup>6</sup> клітин), у порівнянні з сигналами, що виникали у мишей, яким ін'єктували порожню вакцину MVATGN33.1 (9 плям/10<sup>6</sup> клітин, Фіг. 14b). Після імунізації MVATGN33.1 і повторної стимуляції ex vivo пулами пептидів Rv0111, Ag85B і Rv1807 детектували неспецифічну фонову відповідь (Фіг. 14b), що утруднює детекцію відповіді, специфічної відносно даних антигенів, після вакцинації MVATG18377.

Крім MVATG18377, на Фіг. 15 проілюстровані імунні відповіді, індуковані у мишей C3H/HeN MVATG18376, MVATG18378 і MVATG18379. Серед чотирьох протестованих кандидатів на

основі MVA MVATG18377 був самим імуногенним (7 з 14 антигенів). MVATG18376 і MVATG18378 індукували клітинні імунні відповіді, специфічні тільки відносно 2 (Rv2029 і Rv2626) з 14 антигенів, тоді як MVATG18379 міг запускати відповідь не тільки відносно обох антигенів, але і Rv1733. MVATG18377 і MVATG18379 експресують ті самі злиті білки, за винятком злиття "Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807". У MVATG18377 домени SS і TM експресуються на N-кінцевій і C-кінцевій частині злиття №5 відповідно, тоді як у MVATG18379 обидва домени відсутні. З 3 з 5 антигенів, присутніх в даному злитті, були імуногенними у MVATG18377, тоді як жоден не був імуногенним у MVATG18379. Дані результати демонструють те, що адресація злитого білка в клітинну мембрану покращує його імуногенність.

В цілому, імунізація векторами на основі MVA, а також ДНК-плазмідками приводить до індукції сильних і специфічних клітинних відповідей, спрямованих на усі антигени Mtb, включені в злиття, описані в даній заявці. У мишей, імунізованих ДНК, також детектували гуморальні імунні відповіді, специфічні відносно двох протестованих антигенів. Як і у випадку з ДНК-плазмідками, закрючування в мембрані гібридів Mtb, які експресуються MVA, в деякій мірі покращує рівень індукції специфічних імунних відповідей.

Приклад 8: продукція і очищення антигенів Mtb

8.1 Оптимальні умови для продукції біомаси вибраних антигенів Mtb

Чотири штами E.coli тестували на експресію індивідуальних антигенів Mtb, а також за різних умов культури (наприклад, температура).

Дані аналізи підкреслюють, що усі 14 вибраних антигенів могли експресуватися щонайменше в одному бактерійному штамі за однієї певної температури, але спостерігали значні відмінності від одного антигена Mtb до іншого. Насправді, деякі антигени Mtb могли легко продукуватися в різних штаммах E.coli і за будь-яких культуральних умов (наприклад, гібрид Rv0111, Rv0569, Rv1807, Rv2029, Rv2626, RpfB-D), тоді як для інших антигенів потрібні дуже специфічні клітини-господарі і умови (наприклад, Rv1733, Rv1813, TB10-4). З іншого боку, високі рівні експресії могли бути отримані для більшості антигенів Mtb в різних штаммах E.coli, за винятком того, що Rv3407, Ag85B і Rv1813 експресувалися з низькими, але детектовними рівнями. Крім того, певні антигени Mtb продукуються у вигляді розчинної речовини (наприклад, Rv2626, Rv3407 і Ag85B, які могли бути відібрані безпосередньо з супернатантів клітинних лізатів), тоді як інші знаходяться у нерозчинній речовині (наприклад, RPFb-D, Rv0111, Rv1733, Rv2029, Rv3478, Rv1807, ESAT6 і TB10.4, які відбирають з осаду після лізису клітин). Цікаво, що Rv0569 є розчинним при отриманні з трансформованих клітин BI21, які культивують при 18 °C, і знаходиться і в розчинній, і в нерозчинній речовині (у супернатанті і осаді після лізису) при культивуванні клітин BI21 при 37 °C.

8.2 Очищення антигенів Mtb

Як описано в Матеріалах і Методах, антигени Mtb очищали за допомогою хроматографії ІМАС на нікелевих колонках, після якої, зрештою, слідувало очищення на гель-фільтраційних колонках.

Репрезентативні аналізи очищення показані для Rv2626 (очищений з розчинної речовини, продукованої у клітинах C41 (DE3) при 37 °C), злиття RPFb-D (денатурований RpfB-D, очищений з солюбілізованих тілець включення, продукованих у BI21 (DE3) при 37 °C) і TB10.4 (очищений з розчинної і нерозчинної речовини, продукованої у клітинах C41 (DE3) при 37 °C). Елюйовані фракції аналізували на SDS-PAGE, як показано на Фіг. 9A, B і C відповідно.

Як проілюстровано на Фіг. 9A, очищений пул Rv2626 не демонстрував будь-яких видимих домішок. Мажорну смугу спостерігали при очікуваній для Rv2626 молекулярній масі, так само як і мінорну смугу (так звану смугу B), яка була ідентифікована МС (мас-спектрометрія) як Rv2626. Відомо, що Rv2626 утворює димери, які частково стійкі до денатурації і відновлення. Отже, припускається, що мінорна смуга B відповідає димерній формі Rv2626.

При візуалізації на SDS-PAGE (смуги 1-8 є проміжними фракціями в ході очищення, і смуги 9-11 - 5, 10 і 15 мкл очищеного пулу) очищений пул RPFb-Dhyb не демонстрував будь-яких видимих домішок (див. Фіг. 9B).

TB10-4 очищали за денатуруючих умов з подальшою кінцевою стадією за нативних умов. Як проілюстровано на Фіг. 9C, аналіз гелю очищеного пулу не демонстрував будь-яких видимих домішок (смуги 2-6 є проміжними фракціями в ході очищення, і смуги 7-9 - 1, 3 і 6 мкл очищеного пулу).

У трьох даних випадках в очищених пулах вимірювали рівні ендотоксинів, і вони продемонстрували максимальний рівень 10 EU/мг білка.

Отже, три білка були очищені в прийнятній кількості, з прийнятною чистотою і рівнем ендотоксинів.

На закінчення, згідно з даним винаходом запропонована оптимізована комбінація антигенів Mtb. 14 антигенів Mtb відбирали після численних бібліографічних аналізів, бальної оцінки аналізу даних і біохімічних аналізів *in silico* і клонували у плазмідні вектори або індивідуально, або у формі гібридів. Як продемонстровано вестерн-блотінгом, усі злиття експресувалися з високими рівнями і детектувалися з правильним очікуваним розміром з подальшою імунодетекцією серією антитіл, спрямованих проти міток, присутніх на N- і C-кінцях, або проти кожного антигена Mtb, присутнього у злитті. Аналізи імунізації у мишей BALB/c підтримують імуногенний потенціал вибраних комбінацій антигенів Mtb і гібридів для індукції відповідей Т-клітин.

Крім того, вибрані антигени Mtb (RpfB і RpfD у злитті) індивідуально продукували в бактеріях способами генної інженерії. Умови для експресії в *E. coli* були оптимізовані шляхом дослідження таких критеріїв, як бактерійні штами і культуральні умови (наприклад, ростова температура). Усі білки були успішно експресовані і продуковані у масштабі літрів.

Приклад 9: оцінка терапевтичної ефективності вакцин, що містять антигени Mtb, проти інфекції *Mycobacterium tuberculosis* у мишей

Терапевтичні ефективності трьох кандидатів на основі MVA, що експресують Mtb: MVATG18364, MVATG18376 і MVATG18377, досліджували при плані лікування, що включає сумісне введення з антибіотиками, у мишей, яких раніше інфікували штамом H37Rv Mtb. Як негативний контроль, в одній групі також ін'єктували MVATGN33.1. Бактерійне навантаження оцінювали у селезінках, відібраних у мишей, що піддавалися лікуванню, в кінці лікування антибіотиками (у тиждень 15 після інфекції) і через 6 тижнів (у тиждень 21 після інфекції). Групи мишей, схема введення лікарського засобу і схема імунізації описані в Таблиці 5.

Таблиця 5

Група	Число мишей	Лікування	Тиждень 0 заражен-ня аеро-золем	CFU до лікування (доба 1, тиждень 6)	Лікування INH/RIF (від тижня 6 до тижня 15)			CFU (рецидив) тиждень 21
					MVA тиждень 10	MVA тиждень 14	CFU тиждень 15	
1	5	Немає	5	5				
2	20	INH/RIF	20	-			5	15
3	20	INH/RIF плюс MVATG18376	20	-	20	20	5	15
4	20	INH/RIF плюс MVATG18377	20	-	20	20	5	15
5	20	INH/RIF плюс MVATG18364	20	-	20	20	5	15
6	20	INH/RIF плюс MVATGN33.1	20		20	20	5	15

Через шість тижнів після інфекції Mtb і перед початком хіміотерапії і імунізації MVA мікобактерії розвивалися у селезінці у всіх груп мишей ( $2,64 \log_{10}$  загального числа cfu). Як і очікувалося, мікобактеріальне навантаження зменшувалося під час хіміотерапевтичного лікування. У групі 2, яку лікували тільки хіміотерапією, рівень Mtb прогресуюче знижувався з досягненням  $1,18 \log_{10}$  загального числа cfu у тиждень 15 і  $0,70 \log_{10}$  загального числа cfu у тиждень 21. Цікаво, що у тиждень 15 мікобактеріальні навантаження були нижчі у мишей, яких лікували разом антибіотиками і MVA, що експресують антигени Mtb ( $0,70 \log_{10}$  загального числа cfu у тиждень 15 у групах 3-5), ніж у мишей, яких лікували тільки антибіотиками (група 2), і контролю з порожнім вектором на основі MVA у комбінації з антибіотиками (група 6), засвідчуючи те, що MVA, що експресують антигени Mtb, сприяли сильнішому антибактеріальному ефекту. Варто уваги, що через 6 тижнів після завершення лікування (тиждень 21) мікобактерії не проліферували, і навантаження у мишей, вакцинованих MVA, контролювалися (варіюючи від  $0,70$  до  $0,85 \log_{10}$  загального числа cfu) на рівні, аналогічному рівню, спостережуваному у мишей, яких лікували терапією тільки антибіотиками. Як контроль, порожній вектор MVATGN33.1, об'єднаний з терапією лікарськими засобами, не індуктував будь-якого антимікобактеріального ефекту, кращого, ніж схема лікування тільки антибіотиками у тиждень 15 і тиждень 21.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; TRANSGENE SA

&lt;120&gt; Вакцина на основі мікробактеріальних агентів

&lt;130&gt; 363353D32654

&lt;150&gt; EP 12305825.7

&lt;151&gt; 2012-07-10

&lt;150&gt; EP 12306539.3

&lt;151&gt; 2012-12-07

&lt;150&gt; EP 13305737.2

&lt;151&gt; 2013-06-03

&lt;160&gt; 102

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 685

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mycobacterium tuberculosis

&lt;400&gt; 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly Gly Glu Lys Pro Asp Gly Arg Leu  
595 600 605

Tyr Pro Glu Asp Gln Pro Glu Arg Val Asn Lys Trp Asn Ala Met Leu  
610 615 620

His Asn Ala Ile Ser Gln His Ser Asn Val Gly Met Ile Asp Leu Asn  
625 630 635 640

Lys Lys Leu Cys Pro Asp Gly Val Tyr Thr Ala Lys Val Asp Gly Ile  
645 650 655

Lys Val Arg Ser Asp Gly Val His Leu Thr Gln Glu Gly Val Lys Trp  
660 665 670

Leu Ile Pro Trp Leu Glu Asp Ser Val Arg Val Ala Ser  
675 680 685

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2

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> 3

<211> 88

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 3

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

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

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

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

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

Ala Ile Leu His Ala Arg Gly Thr  
85

<210> 4

<211> 362

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 210

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Arg  
210

<210> 6

<211> 399

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 143

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 325

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 8

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

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

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

Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val  
 50 55 60  
 Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro  
 85 90 95  
 Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val  
 100 105 110  
 Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly  
 115 120 125  
 Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu  
 130 135 140  
 Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala  
 165 170 175  
 Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu  
 180 185 190  
 Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met  
 195 200 205  
 Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser  
 210 215 220  
 Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu  
 225 230 235 240  
 Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro  
 245 250 255  
 Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe  
 260 265 270  
 Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly  
 275 280 285  
 Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp  
 290 295 300  
 Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Gly Ala Gly  
 325

<210> 9  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

&lt;400&gt; 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Pro

<210> 10

<211> 143

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 154

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 99

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Asp Glu Gln

<210> 13

<211> 393

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 13

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

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

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

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

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

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

Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly  
385 390

<210> 14

<211> 95

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 14

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 293

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> N-кінцево усічений Rv0111 антиген (393-685)

<400> 15

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

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

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

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

<210> 16  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> N та C-кінцево усічений RpfB  
 <400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 148

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> N-кінцево усічений Rv1733 (63-210) без сигнального пептиду

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Thr Gln Arg  
145

<210> 18

<211> 339

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> С-кінцево усічений Rv1807 (1-339)

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala

<210> 19

<211> 109

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> N-кінцево усічений Rv1813 (35-143) без сигнального пептиду

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 286

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> N-кінцево усічений Ag85B (40-325) без сигнального пептиду

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 313

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> С-кінцево усічений (2-314) та мутований D265N Rv2029

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu  
305 310

<210> 22

<211> 95

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> каталітичний домен RpfD

<400> 22

Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala  
1 5 10 15

Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala  
20 25 30

Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln  
35 40 45

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

Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly  
65 70 75 80

Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly  
85 90 95

<210> 23

<211> 65

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> С-кінцево усічений Rv3407 (2-66)

<400> 23

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

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

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

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

Pro

65

<210> 24

<211> 352

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> С-кінцево усічений Rv3478 (2-353)

<400> 24

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

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

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

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

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

Gly Gln Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala  
 85 90 95  
 Tyr Glu Thr Ala Tyr Arg Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu  
 100 105 110  
 Asn Arg Thr Glu Leu Met Thr Leu Thr Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln  
 115 120 125  
 Asn Thr Pro Ala Ile Glu Ala Asn Gln Ala Ala Tyr Ser Gln Met Trp  
 130 135 140  
 Gly Gln Asp Ala Glu Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Ala Thr Glu Ala Leu Leu Pro Phe Glu Asp Ala Pro Leu Ile Thr Asn  
 165 170 175  
 Pro Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Val Ala Val Glu Glu Ala Ile Asp  
 180 185 190  
 Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln  
 195 200 205  
 Gln Leu Ala Gln Pro Ala Gln Gly Val Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly  
 210 215 220  
 Gly Leu Trp Thr Ala Val Ser Pro His Leu Ser Pro Leu Ser Asn Val  
 225 230 235 240  
 Ser Ser Ile Ala Asn Asn His Met Ser Met Met Gly Thr Gly Val Ser  
 245 250 255  
 Met Thr Asn Thr Leu His Ser Met Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Ala  
 260 265 270  
 Ala Gln Ala Val Glu Thr Ala Ala Glu Asn Gly Val Trp Ala Met Ser  
 275 280 285  
 Ser Leu Gly Ser Gln Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly  
 290 295 300  
 Ala Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Val Pro Pro Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala  
 325 330 335  
 Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Gln Thr Ala  
 340 345 350

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> FLAG tag

<400> 25

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> MYC tag

<400> 26

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
1 5 10

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> His tag

<400> 27

His His His His His His  
1 5

<210> 28

<211> 589

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "SS-Flag-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His tag"

<400> 28

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu  
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala  
20 25 30

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro  
35 40 45

Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn  
50 55 60

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

Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser

85	90	95
Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser		
100	105	110
Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys		
115	120	125
Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn		
130	135	140
Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala		
145	150	155
Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile		
165	170	175
Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly		
180	185	190
Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala		
195	200	205
Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp		
210	215	220
Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp		
225	230	235
Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile		
245	250	255
Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe		
260	265	270
Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe		
275	280	285
Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn		
290	295	300
Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile		
305	310	315
Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly		
325	330	335
Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln		
340	345	350
Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln		
355	360	365
Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala		
370	375	380
Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met		
385	390	395
		400

Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln  
405 410 415

Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn  
420 425 430

Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr  
435 440 445

Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly  
450 455 460

Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu  
465 470 475 480

Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser  
485 490 495

Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
500 505 510

Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu Thr Ala  
515 520 525

Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val Asn Arg  
530 535 540

Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu Val Ser  
545 550 555 560

Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys  
565 570 575

Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu His His His His His His  
580 585

<210> 29

<211> 500

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "Flag-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-Myc-His tag"

<400> 29

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu  
1 5 10 15

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

Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu  
35 40 45

Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn  
50 55 60

Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met  
 65 70 75 80  
 Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala  
 85 90 95  
 Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr  
 100 105 110  
 Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr  
 115 120 125  
 Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile  
 130 135 140  
 Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu  
 165 170 175  
 Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro  
 195 200 205  
 Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly  
 210 215 220  
 Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu  
 225 230 235 240  
 Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala  
 245 250 255  
 Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His  
 260 265 270  
 Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu  
 275 280 285  
 Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala  
 290 295 300  
 Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala  
 325 330 335  
 Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp  
 340 345 350  
 Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser  
 355 360 365



Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu  
370 375 380

Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile  
385 390 395 400

Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser  
405 410 415

Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp  
420 425 430

Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp  
435 440 445

Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr  
450 455 460

Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr  
465 470 475 480

Gly Met Phe Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His  
485 490 495

His His His His  
500

<210> 30

<211> 463

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "SS-Flag-RPFB-Dhyb-Myc-TM-His tag"

<400> 30

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Ser Leu  
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr  
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ile Ala Gln Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly  
290 295 300

Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser  
305 310 315 320

Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile  
325 330 335

Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro  
340 345 350

Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr  
355 360 365

His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Glu Gln Lys Leu  
370 375 380

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu  
385 390 395 400

Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val  
405 410 415

Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn  
420 425 430

Val Ser Val Thr Ser Gln Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser  
435 440 445

His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu His His His His His  
450 455 460

<210> 31

<211> 374

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "Flag-RPFB-Dhyb-Myc-His tag"

<400> 31

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr Val Asp Gly Thr Ala Met  
1 5 10 15

Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile Asp Ile Val Glu Glu Asn  
20 25 30

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

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

Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys Gln Val Trp Thr Thr Ala  
65 70 75 80

Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu Ala Met Thr Asp Thr Ala  
85 90 95

Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val Pro Leu Ser Gly Met Ala  
100 105 110

Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln Leu Asn Asp Gly Gly Leu  
115 120 125

Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn Val Ala Gly Leu Leu Ser  
130 135 140

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

Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val Thr Arg Asn Arg  
165 170 175

Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu Pro Pro Asn Ala Arg Arg  
180 185 190

Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val Val Glu Asp Pro  
195 200 205

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

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

Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro Gly Thr Glu Val  
245 250 255

Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Lys  
260 265 270

Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly  
275 280 285

Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser  
290 295 300

Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile  
305 310 315 320

Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser  
325 330 335

Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu  
340 345 350

Ala Ala Glu Thr Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
355 360 365

His His His His His His  
370

<210> 32

<211> 938

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "SS-Flag-RFPB-Dhyb-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His tag"

<400> 32

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Leu Val Pro Leu Leu Gly Phe Ser Leu  
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr  
20 25 30

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

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

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

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

Gln Val Trp Thr Thr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu

100	105	110
Ala Met Thr Asp Thr Ala Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val		
115	120	125
Pro Leu Ser Gly Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln		
130	135	140
Leu Asn Asp Gly Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn		
145	150	155
		160
Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp		
165	170	175
His Val Val Pro Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile		
180	185	190
Gln Val Thr Arg Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu		
195	200	205
Pro Pro Asn Ala Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg		
210	215	220
Glu Val Val Glu Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe		
225	230	235
		240
Ala Val Ala Glu Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala		
245	250	255
Asn Val Val Val Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr		
260	265	270
Lys Pro Gly Thr Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp		
275	280	285
Ala Ile Ala Gln Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly		
290	295	300
Asn Gly Leu Tyr Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser		
305	310	315
		320
Asn Gly Gly Val Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile		
325	330	335
Glu Val Ala Asp Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro		
340	345	350
Lys Cys Ser Ser Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr		
355	360	365
His Ile Leu Thr Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Ala Phe Ser Arg		
370	375	380
Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly		
385	390	395
		400
Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala		
405	410	415

Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp  
420 425 430

Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser  
435 440 445

Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr  
450 455 460

Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr  
465 470 475 480

Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val  
485 490 495

Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser  
500 505 510

Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly  
515 520 525

Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu  
530 535 540

Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met  
545 550 555 560

Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln  
565 570 575

Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys  
580 585 590

Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu  
595 600 605

Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala  
610 615 620

Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn  
625 630 635 640

Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys  
645 650 655

Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile Met Tyr Asn  
660 665 670

Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly  
675 680 685

Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu  
690 695 700

Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln  
705 710 715 720

Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala  
725 730 735

Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp  
740 745 750

Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe  
755 760 765

Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser  
770 775 780

Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala  
785 790 795 800

Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln  
805 810 815

Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu  
820 825 830

Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly  
835 840 845

Asn Val Thr Gly Met Phe Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp  
850 855 860

Leu Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met Leu  
865 870 875 880

Ile Ile Phe Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu Ser  
885 890 895

Thr Gln Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr Ser  
900 905 910

Gln Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly  
915 920 925

Glu Thr Arg Leu His His His His His His  
930 935

<210> 33

<211> 849

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-Myc-His tag"

<400> 33

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr Val Asp Gly Thr Ala Met  
1 5 10 15

Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile Asp Ile Val Glu Glu Asn  
20 25 30

Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp Leu Tyr Pro Ala Ala Gly Val

35	40	45
Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu Arg Arg Ser Arg Pro Leu		
50	55	60
Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys Gln Val Trp Thr Thr Ala		
65	70	80
Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu Ala Met Thr Asp Thr Ala		
85	90	95
Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val Pro Leu Ser Gly Met Ala		
100	105	110
Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln Leu Asn Asp Gly Gly Leu		
115	120	125
Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn Val Ala Gly Leu Leu Ser		
130	135	140
Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp His Val Val Pro Ala Ala		
145	150	160
Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val Thr Arg Asn Arg		
165	170	175
Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu Pro Pro Asn Ala Arg Arg		
180	185	190
Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val Val Glu Asp Pro		
195	200	205
Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe Ala Val Ala Glu Val Asn		
210	215	220
Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala Asn Val Val Val Thr Pro		
225	230	240
Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro Gly Thr Glu Val		
245	250	255
Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln Cys Lys		
260	265	270
Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr Gly Gly		
275	280	285
Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val Gly Ser		
290	295	300
Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp Asn Ile		
305	310	320
Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser Cys Ser		
325	330	335
Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr Phe Leu		
340	345	350



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

Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln  
370 375 380

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

Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala  
405 410 415

Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly  
420 425 430

Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys  
435 440 445

Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu  
450 455 460

Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala  
465 470 475 480

Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala  
485 490 495

Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu  
500 505 510

Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly  
515 520 525

Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp  
530 535 540

Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val  
545 550 555 560

Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn  
565 570 575

Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val  
580 585 590

Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly  
595 600 605

His Asn Ala Val Phe Asn Phe Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu  
610 615 620

Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser  
625 630 635 640

Leu Gly Ala Gly Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly  
645 650 655

His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly  
660 665 670

Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly  
675 680 685

Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala  
690 695 700

Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu  
705 710 715 720

Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys  
725 730 735

Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala  
740 745 750

Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp  
755 760 765

Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser  
770 775 780

Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala  
785 790 795 800

Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu  
805 810 815

Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe  
820 825 830

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His  
835 840 845

His

<210> 34

<211> 1198

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "SS-Flag-Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-TM-His tag"

<400> 34

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu  
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys  
20 25 30

Ala Lys Val Gly Asp Trp Leu Val Ile Lys Gly Ala Thr Ile Asp Gln  
35 40 45

Pro Asp His Arg Gly Leu Ile Ile Glu Val Arg Ser Ser Asp Gly Ser  
 50 55 60  
 Pro Pro Tyr Val Val Arg Trp Leu Glu Thr Asp His Val Ala Thr Val  
 65 70 75 80  
 Ile Pro Gly Pro Asp Ala Val Val Val Thr Ala Glu Glu Gln Asn Ala  
 85 90 95  
 Ala Asp Glu Arg Ala Gln His Arg Phe Gly Ala Val Gln Ser Ala Ile  
 100 105 110  
 Leu His Ala Arg Gly Thr Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met  
 115 120 125  
 Ser Glu Ile Ala Gly Leu Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala  
 130 135 140  
 Ile Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Pro Ala Arg Ala Glu Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys  
 165 170 175  
 Thr Cys Lys Val Val Ser Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr  
 180 185 190  
 Asn Gly Ser Lys Tyr Gln Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala  
 195 200 205  
 Glu Asp Asp Ala Val Asn Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp  
 210 215 220  
 Ala Cys Asn Arg Ala Thr Val Gly Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Arg  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Arg Gln His Ala Ser Arg Tyr Leu Ala Arg Val Glu Ala Gly  
 245 250 255  
 Glu Glu Leu Gly Val Thr Asn Lys Gly Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile  
 260 265 270  
 Pro Val Gln Ala Ala Glu Arg Ser Arg Glu Ala Leu Ile Glu Ser Gly  
 275 280 285  
 Val Leu Ile Pro Ala Arg Arg Pro Gln Asn Leu Leu Asp Val Thr Ala  
 290 295 300  
 Glu Pro Ala Arg Gly Arg Lys Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Asn Glu  
 305 310 315 320  
 Met Arg Asp Glu Gln Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn  
 325 330 335  
 Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala  
 340 345 350  
 Ala Lys Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser

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

Ala Ala Gln Thr Ala Pro Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly  
675 680 685

His Ser Val Asn Ala Gly Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro  
690 695 700

Ala Arg Ala Tyr Ala Ile Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly Asp Phe Ala  
705 710 715 720

Thr Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ser Gly Ala Gly  
725 730 735

Ser Ala Pro Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp His Gly Leu Ser Ala  
740 745 750

Glu Leu Arg Ala Ser Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Val Leu Ser Thr Leu  
755 760 765

Thr Gly Glu Glu Trp His Gly Pro Ala Ser Ala Ser Met Thr Ala Ala  
770 775 780

Ala Ala Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Val Arg Ala Glu  
785 790 795 800

Gln Ala Gly Ala Gln Ala Glu Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Ala Ala  
805 810 815

Phe Ala Ala Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Glu Ala Asn Arg Ala Gln  
820 825 830

Leu Met Ala Leu Ile Ala Thr Asn Val Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala  
835 840 845

Ile Ala Ala Thr Glu Ala Gln Tyr Ala Glu Met Trp Ser Gln Asp Ala  
850 855 860

Met Ala Met Tyr Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Thr Gln Leu  
865 870 875 880

Thr Pro Phe Thr Glu Pro Val Gln Thr Thr Asn Ala Ser Gly Leu Ala  
885 890 895

Ala Gln Ser Ala Ala Ile Ala His Ala Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ala  
900 905 910

Gln Gln Thr Thr Leu Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ile Pro Ser Val Leu  
915 920 925

Gln Gly Leu Ser Ser Ser Thr Ala Ala Thr Phe Ala Ser Gly Pro Ser  
930 935 940

Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Ser Trp Leu Asp Lys Leu  
945 950 955 960

Trp Ala Leu Leu Asp Pro Asn Ser Asn Phe Trp Asn Thr Ile Ala Ser  
965 970 975

Ser Gly Leu Phe Leu Pro Ser Asn Thr Ile Ala Pro Phe Leu Gly Leu  
980 985 990

Leu Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gly Asp Val Leu Gly Glu  
995 1000 1005

Ala Thr Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Leu Val Ala Pro Leu Gly  
1010 1015 1020

Ser Ala Gly Gly Leu Gly Gly Thr Val Ala Ala Gly Leu Gly Asn  
1025 1030 1035

Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr Ala  
1040 1045 1050

Ala Ala Pro Leu Ala Ser Pro Leu Gly Ser Ala Leu Gly Gly Thr  
1055 1060 1065

Pro Met Val Ala Pro Pro Pro Ala Val Ala Ala Gly Met Pro Gly  
1070 1075 1080

Met Pro Phe Gly Thr Met Gly Gly Gln Gly Phe Gly Arg Ala Val  
1085 1090 1095

Pro Gln Tyr Gly Phe Arg Pro Asn Phe Val Ala Arg Pro Pro Ala  
1100 1105 1110

Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Tyr Val  
1115 1120 1125

Leu Leu Ser Ala Gly Thr Leu Ile Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe  
1130 1135 1140

Leu Ile Thr Cys Cys Lys Arg Val Asp Arg Pro Glu Ser Thr Gln  
1145 1150 1155

Arg Ser Leu Arg Gly Thr Gly Arg Asn Val Ser Val Thr Ser Gln  
1160 1165 1170

Ser Gly Lys Phe Ile Ser Ser Trp Glu Ser His Lys Ser Gly Gly  
1175 1180 1185

Glu Thr Arg Leu His His His His His His  
1190 1195

<210> 35

<211> 1109

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "Flag-Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-His tag"

<400> 35

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Ala Lys Val Gly Asp Trp  
1 5 10 15

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

Ile Ile Glu Val Arg Ser Ser Asp Gly Ser Pro Pro Tyr Val Val Arg  
 35 40 45  
 Trp Leu Glu Thr Asp His Val Ala Thr Val Ile Pro Gly Pro Asp Ala  
 50 55 60  
 Val Val Val Thr Ala Glu Glu Gln Asn Ala Ala Asp Glu Arg Ala Gln  
 65 70 75 80  
 His Arg Phe Gly Ala Val Gln Ser Ala Ile Leu His Ala Arg Gly Thr  
 85 90 95  
 Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met Ser Glu Ile Ala Gly Leu  
 100 105 110  
 Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala Pro Ser  
 115 120 125  
 Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg Ala Glu  
 130 135 140  
 Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val Val Ser  
 145 150 155 160  
 Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys Tyr Gln  
 165 170 175  
 Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala Glu Asp Asp Ala Val Asn  
 180 185 190  
 Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn Arg Ala Thr  
 195 200 205  
 Val Gly Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Arg Glu Leu Arg Gln His Ala  
 210 215 220  
 Ser Arg Tyr Leu Ala Arg Val Glu Ala Gly Glu Glu Leu Gly Val Thr  
 225 230 235 240  
 Asn Lys Gly Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile Pro Val Gln Ala Ala Glu  
 245 250 255  
 Arg Ser Arg Glu Ala Leu Ile Glu Ser Gly Val Leu Ile Pro Ala Arg  
 260 265 270  
 Arg Pro Gln Asn Leu Leu Asp Val Thr Ala Glu Pro Ala Arg Gly Arg  
 275 280 285  
 Lys Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Asn Glu Met Arg Asp Glu Gln Val  
 290 295 300  
 Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp Asp Ser  
 325 330 335  
 Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val

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



Gly His Met Leu Gly Gly Leu Pro Leu Gly His Ser Val Asn Ala Gly  
 660 665 670  
 Ser Gly Ile Asn Asn Ala Leu Arg Val Pro Ala Arg Ala Tyr Ala Ile  
 675 680 685  
 Pro Arg Thr Pro Ala Ala Gly Asp Phe Ala Thr Leu Pro Pro Glu Ile  
 690 695 700  
 Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Ala Pro Met Leu Ala  
 705 710 715 720  
 Ala Ala Ser Ala Trp His Gly Leu Ser Ala Glu Leu Arg Ala Ser Ala  
 725 730 735  
 Leu Ser Tyr Ser Ser Val Leu Ser Thr Leu Thr Gly Glu Glu Trp His  
 740 745 750  
 Gly Pro Ala Ser Ala Ser Met Thr Ala Ala Ala Ala Pro Tyr Val Ala  
 755 760 765  
 Trp Met Ser Val Thr Ala Val Arg Ala Glu Gln Ala Gly Ala Gln Ala  
 770 775 780  
 Glu Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Phe Ala Ala Thr Val Pro  
 785 790 795 800  
 Pro Pro Val Ile Glu Ala Asn Arg Ala Gln Leu Met Ala Leu Ile Ala  
 805 810 815  
 Thr Asn Val Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Thr Glu Ala  
 820 825 830  
 Gln Tyr Ala Glu Met Trp Ser Gln Asp Ala Met Ala Met Tyr Gly Tyr  
 835 840 845  
 Ala Gly Ala Ser Ala Ala Ala Thr Gln Leu Thr Pro Phe Thr Glu Pro  
 850 855 860  
 Val Gln Thr Thr Asn Ala Ser Gly Leu Ala Ala Gln Ser Ala Ala Ile  
 865 870 875 880  
 Ala His Ala Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ala Gln Gln Thr Thr Leu Ser  
 885 890 895  
 Gln Leu Ile Ala Ala Ile Pro Ser Val Leu Gln Gly Leu Ser Ser Ser  
 900 905 910  
 Thr Ala Ala Thr Phe Ala Ser Gly Pro Ser Gly Leu Leu Gly Ile Val  
 915 920 925  
 Gly Ser Gly Ser Ser Trp Leu Asp Lys Leu Trp Ala Leu Leu Asp Pro  
 930 935 940  
 Asn Ser Asn Phe Trp Asn Thr Ile Ala Ser Ser Gly Leu Phe Leu Pro  
 945 950 955 960  
 Ser Asn Thr Ile Ala Pro Phe Leu Gly Leu Leu Gly Gly Val Ala Ala  
 965 970 975

Ala Asp Ala Ala Gly Asp Val Leu Gly Glu Ala Thr Ser Gly Gly Leu  
980 985 990

Gly Gly Ala Leu Val Ala Pro Leu Gly Ser Ala Gly Gly Leu Gly Gly  
995 1000 1005

Thr Val Ala Ala Gly Leu Gly Asn Ala Ala Thr Val Gly Thr Leu  
1010 1015 1020

Ser Val Pro Pro Ser Trp Thr Ala Ala Ala Pro Leu Ala Ser Pro  
1025 1030 1035

Leu Gly Ser Ala Leu Gly Gly Thr Pro Met Val Ala Pro Pro Pro  
1040 1045 1050

Ala Val Ala Ala Gly Met Pro Gly Met Pro Phe Gly Thr Met Gly  
1055 1060 1065

Gly Gln Gly Phe Gly Arg Ala Val Pro Gln Tyr Gly Phe Arg Pro  
1070 1075 1080

Asn Phe Val Ala Arg Pro Pro Ala Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile  
1085 1090 1095

Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His  
1100 1105

<210> 36

<211> 973

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "SS-Flag-Ag85B\*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733\*-Myc-His tag"

<400> 36

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu  
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala  
20 25 30

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro  
35 40 45

Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn  
50 55 60

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

Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser  
85 90 95

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

Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys  
 115 120 125  
 Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn  
 130 135 140  
 Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile  
 165 170 175  
 Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly  
 180 185 190  
 Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala  
 195 200 205  
 Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp  
 210 215 220  
 Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp  
 225 230 235 240  
 Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile  
 245 250 255  
 Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe  
 260 265 270  
 Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe  
 275 280 285  
 Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn  
 290 295 300  
 Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Thr Thr Ala  
 305 310 315 320  
 Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly Glu His Glu Thr  
 325 330 335  
 Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu  
 340 345 350  
 Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met Leu Thr Asp Arg  
 355 360 365  
 Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala  
 370 375 380  
 Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn  
 385 390 395 400  
 Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg  
 405 410 415  
 Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu  
 420 425 430

Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val  
435 440 445

Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Thr Val Asp Gly Thr  
450 455 460

Ala Met Arg Val Thr Thr Met Lys Ser Arg Val Ile Asp Ile Val Glu  
465 470 475 480

Glu Asn Gly Phe Ser Val Asp Asp Arg Asp Asp Leu Tyr Pro Ala Ala  
485 490 495

Gly Val Gln Val His Asp Ala Asp Thr Ile Val Leu Arg Arg Ser Arg  
500 505 510

Pro Leu Gln Ile Ser Leu Asp Gly His Asp Ala Lys Gln Val Trp Thr  
515 520 525

Thr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Gln Leu Ala Met Thr Asp  
530 535 540

Thr Ala Pro Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Arg Val Pro Leu Ser Gly  
545 550 555 560

Met Ala Leu Pro Val Val Ser Ala Lys Thr Val Gln Leu Asn Asp Gly  
565 570 575

Gly Leu Val Arg Thr Val His Leu Pro Ala Pro Asn Val Ala Gly Leu  
580 585 590

Leu Ser Ala Ala Gly Val Pro Leu Leu Gln Ser Asp His Val Val Pro  
595 600 605

Ala Ala Thr Ala Pro Ile Val Glu Gly Met Gln Ile Gln Val Thr Arg  
610 615 620

Asn Arg Ile Lys Lys Val Thr Glu Arg Leu Pro Leu Pro Pro Asn Ala  
625 630 635 640

Arg Arg Val Glu Asp Pro Glu Met Asn Met Ser Arg Glu Val Val Glu  
645 650 655

Asp Pro Gly Val Pro Gly Thr Gln Asp Val Thr Phe Ala Val Ala Glu  
660 665 670

Val Asn Gly Val Glu Thr Gly Arg Leu Pro Val Ala Asn Val Val Val  
675 680 685

Thr Pro Ala His Glu Ala Val Val Arg Val Gly Thr Lys Pro Gly Thr  
690 695 700

Glu Val Pro Pro Val Ile Asp Gly Ser Ile Trp Asp Ala Ile Ala Gln  
705 710 715 720

Cys Lys Ser Gly Gly Asn Trp Ala Ala Asn Thr Gly Asn Gly Leu Tyr  
725 730 735

Gly Gly Leu Gln Ile Ser Gln Ala Ala Trp Asp Ser Asn Gly Gly Val

740            745            750  
 Gly Ser Pro Ala Ala Ala Ser Pro Gln Gln Gln Ile Glu Val Ala Asp  
      755            760            765  
 Asn Ile Met Lys Thr Ala Gly Pro Gly Ala Trp Pro Lys Cys Ser Ser  
      770            775            780  
 Cys Ser Gln Gly Asp Ala Pro Leu Gly Ser Leu Thr His Ile Leu Thr  
      785            790            795            800  
 Phe Leu Ala Ala Glu Thr Gly Gly Ala Gly Thr Ala Val Gln Asp Ser  
      805            810            815  
 Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His Pro Ala Thr  
      820            825            830  
 Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn Thr Thr Ala  
      835            840            845  
 Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala Arg Trp Val  
      850            855            860  
 Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys Pro Gly Thr  
      865            870            875            880  
 Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala Gly Gln Leu  
      885            890            895  
 Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp Ala Ala Leu  
      900            905            910  
 Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala Gly Ala Leu  
      915            920            925  
 Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn Ala Ser Trp  
      930            935            940  
 Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu Gln Lys Leu  
      945            950            955            960  
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His His His His His His  
      965            970  
  
 <210> 37  
 <211> 624  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> злиття "SS-Flag-Ag85B\*-Rv2626-Rv1733\*-Myc-His tag"  
  
 <400> 37  
  
 Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu  
      1            5            10            15  
 Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala  
      20            25            30

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro  
 35 40 45  
 Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn  
 50 55 60  
 Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr  
 65 70 75 80  
 Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser  
 85 90 95  
 Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser  
 100 105 110  
 Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys  
 115 120 125  
 Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gln Trp Leu Ser Ala Asn  
 130 135 140  
 Arg Ala Val Lys Pro Thr Gly Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Ser Ala Met Ile Leu Ala Ala Tyr His Pro Gln Gln Phe Ile  
 165 170 175  
 Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp Pro Ser Gln Gly Met Gly  
 180 185 190  
 Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala  
 195 200 205  
 Ala Asp Met Trp Gly Pro Ser Ser Asp Pro Ala Trp Glu Arg Asn Asp  
 210 215 220  
 Pro Thr Gln Gln Ile Pro Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu Trp  
 225 230 235 240  
 Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu Gly Gly Ala Asn Ile  
 245 250 255  
 Pro Ala Glu Phe Leu Glu Asn Phe Val Arg Ser Ser Asn Leu Lys Phe  
 260 265 270  
 Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His Asn Ala Val Phe Asn Phe  
 275 280 285  
 Pro Pro Asn Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn  
 290 295 300  
 Ala Met Lys Gly Asp Leu Gln Ser Ser Leu Gly Ala Gly Thr Thr Ala  
 305 310 315 320  
 Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly Glu His Glu Thr  
 325 330 335  
 Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu

340 345 350

Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met Leu Thr Asp Arg  
355 360 365

Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala  
370 375 380

Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn  
385 390 395 400

Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg  
405 410 415

Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu  
420 425 430

Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val  
435 440 445

Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Ala Gly Thr Ala Val  
450 455 460

Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His  
465 470 475 480

Pro Ala Thr Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn  
485 490 495

Thr Thr Ala Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala  
500 505 510

Arg Trp Val Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys  
515 520 525

Pro Gly Thr Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala  
530 535 540

Gly Gln Leu Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp  
545 550 555 560

Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala  
565 570 575

Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn  
580 585 590

Ala Ser Trp Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu  
595 600 605

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His His His His His  
610 615 620

<210> 38  
<211> 949  
<212> PRT  
<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "SS-Flag-Rv2029\*-Rv2626-Rv1733\*-Rv0111\*-Myc-His tag"

<400> 38

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

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asp Tyr Lys Asp  
20 25 30

Asp Asp Asp Lys Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg  
35 40 45

Ile Ile Thr Leu Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val  
50 55 60

Asp Val Val Arg Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr  
65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu  
85 90 95

Gly Gly Cys Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ala Gly Gly Ser Thr Gly Ser  
100 105 110

Leu Leu Met Ala Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile  
115 120 125

Pro Ile Ala Ala Ser Thr Arg Glu Ser Phe Thr Val Asn Glu Ser Arg  
130 135 140

Thr Ala Lys Gln Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val  
145 150 155 160

Ala Glu Gln Glu Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser  
165 170 175

Ala Ala Phe Val Val Ala Ser Gly Ser Leu Pro Pro Gly Val Ala Ala  
180 185 190

Asp Tyr Tyr Gln Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro  
195 200 205

Leu Ile Leu Asp Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly  
210 215 220

Val Phe Leu Leu Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly  
225 230 235 240

Ser Glu Leu Leu Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala Ala His Glu Leu  
245 250 255

Ile Asp Arg Gly Arg Ala Glu Val Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln  
260 265 270

Gly Ala Leu Leu Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile  
275 280 285

Pro Met Thr Ala Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asn Ala Met Val Ala



290	295	300	
Ala Ile Thr Val Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val			
305	310	315	320
Arg Leu Gly Asn Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr			
	325	330	335
Ala Ala Cys Asn Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu Thr Thr Ala			
	340	345	350
Arg Asp Ile Met Asn Ala Gly Val Thr Cys Val Gly Glu His Glu Thr			
	355	360	365
Leu Thr Ala Ala Ala Gln Tyr Met Arg Glu His Asp Ile Gly Ala Leu			
	370	375	380
Pro Ile Cys Gly Asp Asp Asp Arg Leu His Gly Met Leu Thr Asp Arg			
	385	390	395
Asp Ile Val Ile Lys Gly Leu Ala Ala Gly Leu Asp Pro Asn Thr Ala			
	405	410	415
Thr Ala Gly Glu Leu Ala Arg Asp Ser Ile Tyr Tyr Val Asp Ala Asn			
	420	425	430
Ala Ser Ile Gln Glu Met Leu Asn Val Met Glu Glu His Gln Val Arg			
	435	440	445
Arg Val Pro Val Ile Ser Glu His Arg Leu Val Gly Ile Val Thr Glu			
	450	455	460
Ala Asp Ile Ala Arg His Leu Pro Glu His Ala Ile Val Gln Phe Val			
	465	470	475
Lys Ala Ile Cys Ser Pro Met Ala Leu Ala Ser Ala Gly Thr Ala Val			
	485	490	495
Gln Asp Ser Arg Ser His Val Tyr Ala His Gln Ala Gln Thr Arg His			
	500	505	510
Pro Ala Thr Ala Thr Val Ile Asp His Glu Gly Val Ile Asp Ser Asn			
	515	520	525
Thr Thr Ala Thr Ser Ala Pro Pro Arg Thr Lys Ile Thr Val Pro Ala			
	530	535	540
Arg Trp Val Val Asn Gly Ile Glu Arg Ser Gly Glu Val Asn Ala Lys			
	545	550	555
Pro Gly Thr Lys Ser Gly Asp Arg Val Gly Ile Trp Val Asp Ser Ala			
	565	570	575
Gly Gln Leu Val Asp Glu Pro Ala Pro Pro Ala Arg Ala Ile Ala Asp			
	580	585	590
Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Leu Trp Leu Ser Val Ala Ala Val Ala			
	595	600	605

Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Arg Ala Ile Leu Ile Arg Val Arg Asn  
 610 615 620  
 Ala Ser Trp Gln His Asp Ile Asp Ser Leu Phe Cys Thr Gln Arg Glu  
 625 630 635 640  
 Gln Pro Ile Arg Arg Trp Arg Pro Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu  
 645 650 655  
 Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Ala Ala Ala Val Thr Met Leu Val Val  
 660 665 670  
 Pro Val Gly Ala Gly Pro Gly Leu Arg Glu Ile Gly Leu Pro Pro Gly  
 675 680 685  
 Val Ser Ala Val Ala Ala Val Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Ser Gln  
 690 695 700  
 Pro Ala Pro Gly Pro Arg Asp Pro Asn Arg Pro Phe Thr Val Ser Val  
 705 710 715 720  
 Phe Gly Asp Ser Ile Gly Trp Thr Leu Met His Tyr Leu Pro Pro Thr  
 725 730 735  
 Pro Gly Phe Arg Phe Ile Asp His Thr Val Ile Gly Cys Ser Leu Val  
 740 745 750  
 Arg Gly Thr Pro Tyr Arg Tyr Ile Gly Gln Thr Leu Glu Gln Arg Ala  
 755 760 765  
 Glu Cys Asp Gly Trp Pro Ala Arg Trp Ser Ala Gln Val Asn Arg Asp  
 770 775 780  
 Gln Pro Asp Val Ala Leu Leu Ile Val Gly Arg Trp Glu Thr Val Asp  
 785 790 795 800  
 Arg Val Asn Glu Gly Arg Trp Thr His Ile Gly Asp Pro Thr Phe Asp  
 805 810 815  
 Ala Tyr Leu Asn Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ser Ile Val Gly Ser  
 820 825 830  
 Thr Gly Val Arg Val Met Val Thr Thr Val Pro Tyr Ser Arg Gly Gly  
 835 840 845  
 Glu Lys Pro Asp Gly Arg Leu Tyr Pro Glu Asp Gln Pro Glu Arg Val  
 850 855 860  
 Asn Lys Trp Asn Ala Met Leu His Asn Ala Ile Ser Gln His Ser Asn  
 865 870 875 880  
 Val Gly Met Ile Asp Leu Asn Lys Lys Leu Cys Pro Asp Gly Val Tyr  
 885 890 895  
 Thr Ala Lys Val Asp Gly Ile Lys Val Arg Ser Asp Gly Val His Leu  
 900 905 910  
 Thr Gln Glu Gly Val Lys Trp Leu Ile Pro Trp Leu Glu Asp Ser Val  
 915 920 925

Arg Val Ala Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser His  
930 935 940

His His His His His  
945

<210> 39

<211> 848

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злиття "SS-Flag-Rv2029\*-TB10.4-ESAT6-Rv0111\*-Myc-His tag"

<400> 39

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

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asp Tyr Lys Asp  
20 25 30

Asp Asp Asp Lys Thr Glu Pro Ala Ala Trp Asp Glu Gly Lys Pro Arg  
35 40 45

Ile Ile Thr Leu Thr Met Asn Pro Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Val  
50 55 60

Asp Val Val Arg Pro Thr Glu Lys Met Arg Cys Gly Ala Pro Arg Tyr  
65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Gly Ile Asn Val Ala Arg Ile Val His Val Leu  
85 90 95

Gly Gly Cys Ser Thr Ala Leu Phe Pro Ala Gly Gly Ser Thr Gly Ser  
100 105 110

Leu Leu Met Ala Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Pro Phe Arg Val Ile  
115 120 125

Pro Ile Ala Ala Ser Thr Arg Glu Ser Phe Thr Val Asn Glu Ser Arg  
130 135 140

Thr Ala Lys Gln Tyr Arg Phe Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Thr Val  
145 150 155 160

Ala Glu Gln Glu Gln Cys Leu Asp Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ser  
165 170 175

Ala Ala Phe Val Val Ala Ser Gly Ser Leu Pro Pro Gly Val Ala Ala  
180 185 190

Asp Tyr Tyr Gln Arg Val Ala Asp Ile Cys Arg Arg Ser Ser Thr Pro  
195 200 205

Leu Ile Leu Asp Thr Ser Gly Gly Gly Leu Gln His Ile Ser Ser Gly  
210 215 220

Val Phe Leu Leu Lys Ala Ser Val Arg Glu Leu Arg Glu Cys Val Gly  
225 230 235 240

Ser Glu Leu Leu Thr Glu Pro Glu Gln Leu Ala Ala His Glu Leu  
245 250 255

Ile Asp Arg Gly Arg Ala Glu Val Val Val Val Ser Leu Gly Ser Gln  
260 265 270

Gly Ala Leu Leu Ala Thr Arg His Ala Ser His Arg Phe Ser Ser Ile  
275 280 285

Pro Met Thr Ala Val Ser Gly Val Gly Ala Gly Asn Ala Met Val Ala  
290 295 300

Ala Ile Thr Val Gly Leu Ser Arg Gly Trp Ser Leu Ile Lys Ser Val  
305 310 315 320

Arg Leu Gly Asn Ala Ala Gly Ala Ala Met Leu Leu Thr Pro Gly Thr  
325 330 335

Ala Ala Cys Asn Arg Asp Asp Val Glu Arg Phe Phe Glu Ser Gln Ile  
340 345 350

Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly  
355 360 365

Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln  
370 375 380

Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln  
385 390 395 400

Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala  
405 410 415

Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met  
420 425 430

Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly Thr Glu Gln Gln  
435 440 445

Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn  
450 455 460

Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr  
465 470 475 480

Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly  
485 490 495

Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu  
500 505 510

Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser  
515 520 525

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

835 840 845

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 1770

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; штучна послідовність

&lt;220&gt;

<223> нуклеотидна послідовність, що кодує злиття n°2  
"SS-Flag-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-Мyc-TM-His tag" (pTG18266)

&lt;400&gt; 40

```

atgggtcctc aggcctcctc gttgtaccc ctctgggtt ttccattgtg tttgggaaa    60

ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggcctct ctagacctgg cctgccctg    120

gaatacctgc aggtcccaag ccccgacatg ggccgggata tcaaggtgca gttcagagc    180

ggcggcaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagccca ggacgactac    240

aacggctggg acatcaacac ccctgccttc gagtgttact accagagcgg cctgtccatc    300

gtgatgcctg tgggcgccca gagcagcttc tacagcgact ggtacagccc cgcctgtggc    360

aaagccggct gccagacctc caagtgggag acattcctga cctccgagct gcccagtg    420

ctgagcgcca atagagccgt gaagcctaca ggctctgccg ccatcggact gagcatggcc    480

ggaagctctg ccatgatcct ggccgcctat caccctcagc agttcatcta cgccggcagc    540

ctgtctgccc tgctggaccc ttctcagggc atgggccctt ctctgatcgg actggctatg    600

ggcgacgctg gcgatacaaa ggccgccgat atgtggggcc ctagcagcga tctgcctgg    660

gagagaaaacg accccaccca gcagatcccc aagctggtgg ccaacaacac ccggtgtgg    720

gtgtactgcg gcaacggcac ccctaataaa ctgggaggag ccaatatccc cgccgagttc    780

ctggaaaact tcgtgcggag cagcaacctg aagttccagg atgcctacaa cgccgctggc    840

ggccacaacg ccgtgttcaa ctccctccc aatggcaccg acagctggga gtactgggga    900

gccagctga acgcatgaa gggcgatctg cagtctctc tgggagccgg cagccagatc    960

atgtacaact accccgcat gctgggccac gccggcgata tggctggata tgccggcaca   1020

ctgcagagcc tgggtgccga gattgccgtg gaacaggctg ccctccagtc tgctggcag   1080

ggcgataccg gcatcacata ccaggcttgg caggcccagt ggaaccaggc catggaagat   1140

ctcgtgcggg cctaccacgc catgagcagc acacacgagg ccaacaccat ggccatgatg   1200

gcccgggata cagccgaggc cgctaagtgg ggaggaaccg agcagcagtg gaacttcgcc   1260

ggaattgagg ccgctgccag cgccatccag ggcaacgtga catccatcca cagcctgctg   1320

gacgagggca agcagagcct gacaaaactg gctgctgcct ggggcggtc tggtctgaa   1380

gcttatcagg gcgtgcagca gaagtgggac gccaccgcca ccgagctgaa caacgccctg   1440

```

cagaacctgg cccggacaat ctctgaagcc ggacaggcca tggccagcac cgagggaat 1500  
 gtgaccggca tgtttgccga acaaaaactc atctcagaag aggatctgag ctatgtatta 1560  
 ctgagtgcag gggccctgac tgcctgatg ttgataattt tctgatgac atgtgtaga 1620  
 agagtcaatc gatcagaacc tacgcaacac aatctcagag ggacaggag ggaggtgtca 1680  
 gtcactcccc aaagcgggaa gatcatatct tcatgggaat cacacaagag tgggggtgag 1740  
 accagactgc atcatcatca tcatcattga 1770

<210> 41

<211> 1503

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття n°10

"Flag-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-Myc-His tag" (pTG18296)

<400> 41

atggattaca aggatgacga cgataaggcc ttctctagac ctggcctgcc cgtggaatac 60  
 ctgcaggtcc caagccccag catgggccgg gatatcaagg tgcagttca gagcggcggc 120  
 aacaacagcc ctgccgtgta tctgctggat ggctgagag cccaggacga ctacaacggc 180  
 tgggacatca acaccctgc cttcagtggt tactaccaga gcggcctgtc catcgtgatg 240  
 cctgtgggcg gccagagcag cttctacagc gactgtgata gccccgctg tggcaaagcc 300  
 ggctgccaga cctacaagtg ggagacattc ctgacctcg agctgcccc gtggctgagc 360  
 gccaatagag ccgtgaagcc tacaggctct gccgcatcg gactgagcat ggccggaagc 420  
 tctgcatga tcttgccgc ctatcacct cagcagttca tctacgccg cagcctgtct 480  
 gccctgtgg acccttctca gggcatggg cttctctga tcggactggc tatgggcgac 540  
 gctggcggat acaaggccgc cgatatgtgg ggccctagca gcgatcctgc ctgggagaga 600  
 aacgacccca cccagcagat cccaagctg gtggccaaca acaccggct gtgggtgtac 660  
 tgcggcaacg gcaccctaa tgaactggc ggagccaata tccccgcca gtctctggaa 720  
 aactcgtgc ggagcagcaa cctgaagttc caggatgcct acaacgccgc tggcggccac 780  
 aacgccgtgt tcaactccc tccaatggc acccacagct gggagtactg gggagcccag 840  
 ctgaacgcca tgaaggcga tctgcagtc tctctgggag ccggcagcca gatcatgtac 900  
 aactaccccg ccatgctggg ccacgccggc gatatggctg gatatgccg cacactgcag 960  
 agcctgggtg ccgagattgc cgtggaacag gctgccctcc agtctgctg gcagggcgat 1020  
 accggcatca cataccaggc ttggcaggcc cagtggaacc aggccatgga agatctcgtg 1080

cgggcctacc acgcatgag cagcacacac gaggccaaca ccatggccat gatggcccgg 1140  
 gatacagccg aggccgctaa gtggggagga accgagcagc agtgaactt cgccggaatt 1200  
 gaggccgctg ccagcgccat ccagggaac gtgacatcca tccacagcct gctggacgag 1260  
 ggcaagcaga gcctgacaaa actggctgct gcctggggcg gctctggctc tgaagcttat 1320  
 cagggcgtgc agcagaagtg ggacgccacc gccaccgagc tgaacaacgc cctgcagaac 1380  
 ctggcccggg caatctctga agccggacag gccatggcca gcaccgaggg caatgtgacc 1440  
 ggcatgtttg ccgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgcacatca tcatcatcat 1500  
 tga 1503

<210> 42

<211> 1392

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття н°3 "SS-Flag-RPFB-Dhyb-Myc-TM-His tag" (pTG18267)

<400> 42

atggtaccac aagcgctgtt actgtccca ctgcttggtt tctctttatg ttttgaaaa 60  
 ttccaatag attacaagga tgacgacgat aagaccgtgg acggcaccgc catgagagtg 120  
 accaccatga agtccagagt gatcgacatc gtggaagaga acggcttcag cgtggacgac 180  
 cgggacgacc tgtatcctgc tgctggagtg caggccaacg acgccgatac aatcgtgctg 240  
 cggagaagca gaccctgca gatcagcctg gatggccacg acgccaagca ggtctggacc 300  
 acagccagca cagtggatga agccctggcc cagctggcca tgaccgatac agctccagcc 360  
 gccgctagca gagctagcag agtgccctg tctggcatgg cctgcctgt ggtgtctgcc 420  
 aagaccgtgc agctgaacga tggcggcctc gtgcggacag tgcacatgcc tgctcctaatt 480  
 gtggccggcc tgctgtctgc agcaggcgtg ccactgctgc agagcgatca tgtggtgcct 540  
 gccgccacag cccctatcgt ggaaggcatg cagatccagg tcacacggaa ccgatcaag 600  
 aaagtgaccg agcggctgcc cctgcctccc aacgctagaa gagtgaaga tcccgagatg 660  
 aacatgagca gagagggtgt cgaggaccct ggctgcccag gcacacagga tgtgacattc 720  
 gccgtggccg aagtgaacgg cgtggaaacc ggcagactgc ccgtggccaa tgtggtggtc 780  
 acaccagccc atgaggccgt cgtcagagtg ggcacaaagc ctggcacaga ggtgccaccc 840  
 gtgatcgacg gcagcatctg gcatgccatt gccagtgca agagcggcgg aaactgggccc 900  
 gccaataccg gcaatggcct ctatggcggc ctgcagatct ctacggccgc ctgggattct 960



aatggcggcg tgggatctcc tgccgctgcc tctccacagc agcagatcga ggtggccgac 1020  
aacaatcatga agacagccgg acctggcgcc tggcccaagt gtagcagttg ttctcagggc 1080  
gacgcccctc tgggcagcct gacacacatc ctgacatttc tggccgccga gacaggcgga 1140  
gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg agctatgttc ttctctctgc tggaacttta 1200  
atagctttaa tgtaataat attctaata acgtgctgta aaagggtaga ccgtccagag 1260  
tcaactcagc gcagccttag gggactctgg agaaatgttt ccgtgacatc acagagtggg 1320  
aaatttatct cgtcttggga atctcataag agtggaggcg aaacacgtct tcatcatcat 1380

catcatcatt ga 1392

<210> 43

<211> 1125

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття н°12 "Flag-RPFB-Dhyb-Myc-His tag" (pTG18307)

<400> 43

atggattaca aggatgacga cgataagacc gtggacggca ccgccatgag agtgaccacc 60  
atgaagtcca gagtgatcga catcgtgga gagaacggct tcagcgtgga cgaccgggac 120  
gacctgtatc ctgctgctgg agtgcaggtc cacgacgccg atacaatcgt gctgcggaga 180  
agcagacccc tgcagatcag cctggatggc cacgacgccg agcaggctctg gaccacagcc 240  
agcacagtgg atgaagccct ggcccagctg gccatgaccg atacagctcc agccgccgct 300  
agcagagcta gcagagtgcc tctgtctggc atggccctgc ctgtggtgtc tgccaagacc 360  
gtgcagctga acgatggcgg cctcgtgcgg acagtgcac tcctgtctcc taatgtggcc 420  
ggcctgctgt ctgcagcagg cgtgccactg ctgcagagcg atcatgtggt gcctgccgcc 480  
acagccccta tcgtggaagg catgcagatc caggtcacac ggaaccggat caagaaagtg 540  
accgagcggc tgcccctgcc tccaacgct agaagagtgg aagatccga gatgaacatg 600  
agcagagagg tggctgagga ccctggcgtg ccaggcacac aggatgtgac attcgccgtg 660  
gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga ctgcccgagg ccaatgtggt ggtcacacca 720  
gcccatgagg ccgtcgtcag agtgggcaca aagcctggca cagaggtgcc acccgtgatc 780  
gacggcagca tctgggatgc cattgcccag tgcaagagcg gcggaaactg ggccgccaat 840  
accggcaatg gcctctatgg cggcctgcag atctctcagg ccgcctggga ttctaattggc 900  
ggcgtgggat ctctgccgc tgcctctcca cagcagcaga tcgaggtggc cgacaacatc 960  
atgaagacag ccggacctgg cgctggccc aagtgtagca gttgttctca gggcgacgcc 1020

cctctgggca gcctgacaca catcctgaca ttcttgccg ccgagacagg cggagaacaa 1080  
aaactcatct cagaagagga tctgcatcat catcatcatc attga 1125

<210> 44  
<211> 2817  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> nt послідовність, що кодує злиття п°4  
"SS-Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-Myc-TM-His tag" (pTG18268)

<400> 44  
atggtaccac aagcgcgtgt actgtccca ctgcttggtt tctcttatg ttgtgaaaa 60  
ttccaatag attacaagga tgacgacgat aagaccgtgg acggcaccgc catgagagtg 120  
accaccatga agtccagagt gatcgacatc gtggaagaga acggcttcag cgtggacgac 180  
cgggacgacc tgtatcctgc tgctggagtg caggtccacg acgccgatac aatcgtgctg 240  
cggagaagca gaccctgca gatcagcctg gatggccacg acgccaagca ggtctggacc 300  
acagccagca cagtggatga agccctggcc cagctggcca tgaccgatac agctccagcc 360  
gccgctagca gagctagcag agtgcctctg tctggcatgg ccctgcctgt ggtgtctgcc 420  
aagaccgtgc agctgaacga tggcgccctc gtgcggacag tgcattctgc tgctcctaat 480  
gtggccggcc tgctgtctgc agcaggcgtg cactgtctgc agagcgatca tgtggtgcct 540  
gccgccacag cccctatcgt ggaaggcatg cagatccagg tcacacggaa ccgatcaag 600  
aaagtgaccg agcggctgcc cctgcctccc aacgctagaa gagtgggaaga tcccagatg 660  
aacatgagca gagaggtggt cgaggaccct ggcgtgccag gcacacagga tgtgacattc 720  
gccgtggccg aagtgaacgg cgtggaaacc ggcagactgc ccgtggccaa tgtggtggtc 780  
acaccagccc atgaggccgt cgtcagagtg ggcacaaagc ctggcacaga ggtgccaccc 840  
gtgatcgacg gcagcatctg ggatgccatt gccagtgca agagcggcgg aaactgggccc 900  
gccaataccg gcaatggcct ctatggcggc ctgcagatct ctaggccgc ctgggattct 960  
aatggcggcg tgggatctcc tgccgtgcc tctccacagc agcagatcga ggtggccgac 1020  
aacatcatga agacagccgg acctggcgcc tggccaagt gtagcagttg ttctcagggc 1080  
gacgcccctc tgggcagcct gacacacatc ctgacatttc tggccgccga gacaggcgga 1140  
gccttctcta gacctggcct gcccgaggaa tacctgcagg tccaagccc cagcatgggc 1200  
cgggatatca aggtgcagtt tcagagcggc ggcaacaaca gccctgccgt gtatctgctg 1260  
gatggcctga gagcccagga cgactacaac ggctgggaca tcaacacccc tgccttcgag 1320

tggactacc agagcggcct gtccatctgtg atgcctgtgg gcggccagag cagcttctac 1380  
 agcgactggg acagccccgc ctgtggcaaa gccggctgcc agacctacaa gtgggagaca 1440  
 ttctgacct ccgagctgcc ccagtggctg agcgccaata gagccgtgaa gcctacaggc 1500  
 tctgccgcca tcggactgag catggccgga agctctgcca tgatcctggc cgcctatcac 1560  
 cctcagcagt tcattacgc cggcagcctg tctgccctgc tggacccttc tcagggcattg 1620  
 ggcccttctc tgatcggact ggctatgggc gacgctggcg gatacaaggc cgccgatatg 1680  
 tggggcccta gcagcgatcc tgcctgggag agaaacgacc ccaccagca gatccccaag 1740  
 ctggtggcca acaacacccg gctgtgggtg tactgcggca acggcacccc taatgaactg 1800  
 ggccggagcca atatccccgc cgagttcctg gaaaacttcg tgcggagcag caacctgaag 1860  
 ttccaggatg cctacaacgc cgctggcggc cacaacgccg tgttcaactt cctcccaat 1920  
 ggcaccaca gctgggagta ctggggagcc cagctgaacg ccatgaaggc cgatctgcag 1980  
 tcctctctgg gagccggcag ccagatcatg tacaactacc ccgcatgct gggccacgcc 2040  
 ggcgatatgg ctggatatgc cggcacactg cagagcctgg gtgccgagat tgccgtggaa 2100  
 caggctgccc tccagtctgc ctggcagggc gataccggca tcacatacca ggcttggcag 2160  
 gccagtgga accaggccat ggaagatctc gtgcgggcct accacgccat gagcagcaca 2220  
 cacgaggcca acaccatggc catgatggcc cgggatacag ccgaggccgc taagtgggga 2280  
 ggaaccgagc agcagtggaa ctgcgccga attgaggccg ctgccagcg catccagggc 2340  
 aacgtgacat ccatccacag cctgctggac gagggcaagc agagcctgac aaaactggct 2400  
 gctgcctggg gcggctctgg ctctgaagct tatcaggcg tgcagcagaa gtgggacgcc 2460  
 accgccaccg agctgaacaa cgccctgcag aacctggccc ggacaatctc tgaagccgga 2520  
 caggccatgg ccagcaccga gggcaatgtg accggcatgt ttgccgaaca aaaactcatc 2580  
 tcagaagagg atctgagcta tgttctctc tctgctggaa cttaatagc tttaatgta 2640  
 ataatttct taataacgtg ctgtaaaagg gtagaccgtc cagagtcaac tcagcgagc 2700  
 ctaggggta ctgggagaaa tgttccgtg acatcacaga gtggaaaatt tatctgtct 2760  
 tgggaatctc ataagagtgg aggcgaaaca cgtcttcac atcatcatca tcattga 2817

<210> 45

<211> 2550

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття n°11

"Flag-RPFB-Dhyb-Ag85B\*-TB10.4-ESAT6-Myc-His tag" (pTG18297)

<400> 45  
 atggattaca aggatgacga cgataagacc gtggacggca ccgcatgag agtgaccacc 60  
 atgaagtcca gagtgatcga catcgtggaa gagaacggct tcagcgtgga cgaccgggac 120  
 gacctgtatc ctgctgtgag agtgcaggtc cagcagccg atacaatcgt gctgcggaga 180  
 agcagacccc tgcagatcag cctggatggc cagcagcca agcaggtctg gaccacagcc 240  
 agcacagtgg atgaagccct ggcccagctg gccatgaccg atacagctcc agccgccgct 300  
 agcagagcta gcagagtgc tctgtctggc atggccctgc ctgtggtgtc tgccaagacc 360  
 gtgcagctga acgatggcgg cctcgtcggg acagtgcac tcctgtctcc taatgtggcc 420  
 ggctgtctgt ctgcagcagg cgtgccactg ctgcagagcg atcatgtgtt gcctgccgcc 480  
 acagccccta tcgtggaagg catgcagatc caggtcacac ggaaccggat caagaaagtg 540  
 accgagcggc tgcccctgcc tccaacgct agaagagtgg aagatcccga gatgaacatg 600  
 agcagagagg tggtcgagga ccctggcgtg ccaggcacac aggatgtgac attcgcctg 660  
 gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga ctgccctgg ccaatgtgtt ggtcacacca 720  
 gcccatgagg ccgtcgtcag agtgggcaca aagcctggca cagaggtgcc acccgtgatc 780  
 gacggcagca tctgggatgc cattgcccag tgcaagagcg gcggaaactg ggccgccaat 840  
 accggcaatg gcctctatgg cggcctgcag atctctcagg ccgcttggga ttctaattggc 900  
 ggctgtggat ctctgccgc tgcctctcca cagcagcaga tcgaggtggc cgacaacatc 960  
 atgaagacag ccggacctgg cgcctggccc aagtgtagca gttgttctca gggcgacgcc 1020  
 cctctgggca gcctgacaca catcctgaca ttctggccg ccgagacagg cggagccttc 1080  
 tctagacctg gcctgcccgt ggaatacctg caggtcccaa gcccagcat gggccgggat 1140  
 atcaaggtgc agtttcagag cggcggcaac aacagccctg ccgtgtatct gctggatggc 1200  
 ctgagagccc aggacgacta caacggctgg gacatcaaca cccctgcctt cgagtgttac 1260  
 taccagagcg gcctgtccat cgtgatgcct gtgggcggcc agagcagctt ctacagcgac 1320  
 tggtagagcc ccgctgtgg caaagccggc tgccagacct acaagtggga gacattcctg 1380  
 acctccgagc tgccccagtg gctgagcgcc aatagagccg tgaagcctac aggctctgcc 1440  
 gccatcggac tgagcatggc cggaaactct gccatgatcc tggccgccta tcacctcag 1500  
 cagttcatct acgccggcag cctgtctgcc ctgctggacc ctctcaggg catgggacct 1560  
 tctctgatcg gactggctat gggcgacgct ggcgataca aggccgccga tatgtggggc 1620  
 cctagcagcg atcctgcctg ggagagaaac gacccaccc agcagatccc caagctggtg 1680  
 gccacaaca cccggctgtg ggtgtactgc ggcaacggca cccctaata actgggcgga 1740

gccaatatcc ccgccgagtt cctggaaaac ttcgtgcgga gcagcaacct gaagttccag 1800  
 gatgcctaca acgccgctgg cgccacaaac gccgtgttca acttccctcc caatggcacc 1860  
 cacagctggg agtactgggg agcccagctg aacgccatga agggcgatct gcagtcctct 1920  
 ctgggagccg gcagccagat catgtacaac taccocgcca tgctgggcca cgccggcgat 1980  
 atggctggat atgccggcac actgcagagc ctgggtgccg agattgccgt ggaacaggct 2040  
 gccctccagt ctgcctggca gggcgatacc ggcatcacat accaggcttg gcaggcccag 2100  
 tgaaccagg ccatggaaga tctcgtgcgg gcctaccacg ccatgagcag cacacacgag 2160  
 gccaacacca tggccatgat ggcccgggat acagccgagg ccgctaagtg gggaggaacc 2220  
 gagcagcagt ggaacttcgc cggaattgag gccgctgcca gcgccatcca gggcaacgtg 2280  
 acatccatcc acagcctgct ggacgagggc aagcagagcc tgacaaaact ggctgctgcc 2340  
 tggggcggct ctggctctga agcttatcag ggcgtgcagc agaagtggga cgccaccgcc 2400  
 accgagctga acaacgccct gcagaacctg gcccgacaa tctctgaagc cggacaggcc 2460  
 atggccagca ccgagggcaa tgtgaccggc atgttgccg aacaaaaact catctcagaa 2520  
 gaggatctgc atcatcatca tcatcattga 2550

<210> 46

<211> 3597

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття n°5

"SS-Flag-Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-TM-His tag"  
(pTG18269)

<400> 46

atggtaccgc aagccctgct attcgtacct ttattggtct ttccctctg ttccgtaag 60  
 ttcttatag attacaagga tgacgacgat aagaaggcca aagtcggcga ctggctggtc 120  
 atcaagggcg ccaccatga ccagcccgat cacagaggcc tgatcatcga agtcgggagc 180  
 agcgacggca gccctccta cgtcgtcaga tggctggaaa ccgaccacgt ggccaccgtg 240  
 atccctggac ctgatgccgt ggtggtcacc gccgaggaac agaatgccgc cgatgagaga 300  
 gccagcaca gattcggagc cgtgcagagc gccatcctgc acgccagagg aacagccaac 360  
 ggcagcatga gcgaagtgat gatgagcgag atcgccggcc tgccatccc tccatcatc 420  
 cactatggcg ccattgccta cgcccctagc ggcgcctctg gaaaagcctg gcaccagaga 480  
 acaccgcga gagccgaaca ggtggccctg gaaaagtgcg gcgacaagac ctgcaagggt 540  
 gtgtcccgt tcaccagatg tggcgccgtg gcctacaacg gctccaagta tcaggcgggc 600

accggcctga caagaagggc cgctgaggac gacgccgtga acagactgga aggcggcaga 660  
 atcgtgaact gggcctgcaa cagagccacc gtgggactgg tggaagccat cggcatcaga 720  
 gagctgagac agcacgccag cagatacctg gccagagtgg aagccggcga ggaactgggc 780  
 gtgaccaaca agggcagact ggtggccaga ctgatccctg tgcaggccgc cgagagaagc 840  
 agagaggccc tgattgagag cggcgtgctg atccctgcca gacggcctca gaacctgctg 900  
 gatgtgacag ccgagcccgc cagaggccgg aagagaacct tgagcgacgt gctgaacgag 960  
 atgcgggatg aacaggtgga ctccggcgcc ctgcctcccg agattaatag cgccaggatg 1020  
 tacgccggcc ctggcagcgc ttctctggtg gccgctgcca agatgtggga tagcgtggcc 1080  
 agcgacctgt ttctgcccgc cagcgcatth cagagcgtcg tgtggggact cactgtgggc 1140  
 ttctggatcg gatctctgc cggctctgat gccgctgctg cctctccta tgtggcctgg 1200  
 atgagcgtga ccgccggaca ggcacagctg acagctgcac aggtccgagt ggctgccgcc 1260  
 gcttacgaga cagcctacag actgacagtg cctccaccg tgatgccga gaatcggacc 1320  
 gagctcatga cctgaccgc caccaatctg ctggccaga acaccctgc catcgaggcc 1380  
 aatcaggccg cctactctca aatgtggggc caagatgccg aggtatgta cggctatgca 1440  
 gccacagccg ccactgtac agaagccctg ctgccctcg aagatgccc tctgatcaca 1500  
 aacctggcg gcctgtgga acaggccgtg gctgtggaag aggccatga taccgtgcc 1560  
 gccaaccaac tcatgaaca cgtgccacag gccctccagc agctggctca gcctgtcag 1620  
 ggctgtgtgc ctttagcaa gctcggcgga ctgtggaccg ccgtgtctcc tcatctgagc 1680  
 cctctgagca acgtgtctc tatcgccaac aaccacatga gcatgatggg caccggcgtg 1740  
 tccatgacca acaccctga cagcatgctg aagggactgg cccctgctgc tgcccaggct 1800  
 gtggaaacag ccgccgaaaa tggcgtgtgg gccatgagca gcctgggctc tcagctggga 1860  
 agctccctcg gttctctgg actgggagct ggcgtggccg ccaatctggg aagagctgct 1920  
 tctgtcggca gcctgtctgt gcctcctgt tggccgctg ctaaccaggc tgtgacacca 1980  
 gctgctagag ccctgcctct gaccagcctg acatctgccg ctgagacagc ccctggccac 2040  
 atgctgggag gactgcctct gggccactct gtgaatgccg gcagcgcat caacaacgcc 2100  
 ctgagagtgc ctgccagagc ctacgccatc ccagaactc cagccgctgg cgattttgcc 2160  
 accctccac ctgagatcaa ttccgctaga atgtatagcg gagccgggtc tgctcctatg 2220  
 ctggctgctg cttctgcctg gcacggactg tctgccgaac tgagagccag cgccctgagc 2280  
 tacagcagcg tgctgagtac cctgaccggc gaagagtggc acggacctgc cagcgctct 2340  
 atgacagcag ccgtgcccc atatgtcga ttgatgtcag tcaactgcagt gcgggcccga 2400

caggcaggcg ctcaggctga agctgcagca gcagcttatg aagccgcctt tgccgctaca 2460  
 gtcccacctc ctgtcattga ggccaaccgg gccagctga tggctctgat tgccacaaac 2520  
 gtgctgggac agaatgcccc agccattgcc gctacagaag cccagtatgc cgagatgtgg 2580  
 tcccaggacg ctatggcaat gtatgggtat gctggcgctt ccgccgctgc cacacagctg 2640  
 acacctttca ccgagcccgt gcagaccacc aatgcctctg gactggccgc ccagtctgcc 2700  
 gccattgctc atgctacagg cgcctctgct ggggctcagc agacaacact gtcccagctg 2760  
 atcgccgcca tccctagcgt gctgcaggga ctgagcagct ctaccgccgc cacatttgcc 2820  
 tctggcccta gcggactgct gggcatctg ggcagtggaa gctcctggct ggataagctg 2880  
 tgggccctgc tggaccccaa cagcaacttc tggaaacaaa tcgccagctc cggcctgttt 2940  
 ctgccagca acaccattgc cccatttctg ggctgctg ggcgagtggc tgctgcagat 3000  
 gctgctgggg atgtgctggg cgaagccaca agcggaggac tgggaggcgc tctggtggca 3060  
 cctctgggat ctgcaggcgg actcggagga acagtggctg caggactggg caatgctgcc 3120  
 acagtgggca cactgagcgt gccaccatct tggacagctg ccgcccctct ggcttctct 3180  
 ctcgatctg ctctgggcgg caccctatg gtggctccac ctctgctgt ggctgccgga 3240  
 atgcctggca tgcctttcgg cacaatgggc ggacagggct tcggcagagc cgtgcctcag 3300  
 tacggcttcc ggcctaactt cgtggccaga cctcctgcag ctggcgaaca aaaactcatc 3360  
 tcagaagagg atctgagcta cgtactgcta tcggcaggca cgttgatcgc actaatgctt 3420  
 atcatcttcc taataacctg ctgcaagcgg gttgataggc ccgaaagtac ccaaaggctc 3480  
 ttgagaggta ccggacgcaa cgtatcggtg acgtcgcaaa gcggcaagtt cattagcagt 3540  
 tgggagtgcg acaaatcagg tggagagacc cgctgcac atcatcatca tcattga 3597

<210> 47

<211> 3330

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття n°9

"Flag-Rv0569-Rv1813\*-Rv3407-Rv3478-Rv1807-Myc-His tag" (pTG18295)

<400> 47

atggattaca aggatgacga cgataagaag gccaaagtgc gcgactggct ggtcatcaag 60

ggcgccacca tcgaccagcc cgatcacaga ggctgatca tcgaagtgcg gagcagcgac 120

ggcagccctc ctacgtcgt cagatggctg gaaaccgacc acgtggccac cgtgatccct 180

ggacctgatg ccgtggtggt caccgccgag gaacagaatg ccgccgatga gagagcccag 240



cacagattcg gagccgtgca gagcgccatc ctgcacgcca gaggaacagc caacggcagc 300  
 atgagcgaag tgatgatgag cgagatcgcc ggctgcca tccctcccat catccactat 360  
 ggcgccattg cctacgcccc tagcggcgcc tctgaaaag cctggcacca gagaacaccc 420  
 gccagagccg aacagggtggc cctgaaaag tgcggcgaca agacctgcaa ggtggtgtcc 480  
 cggttcacca gatgtggcg cgtggcctac aacggctcca agtatcaggg cggcaccggc 540  
 ctgacaagaa gggccgctga ggacgacgcc gtgaacagac tggaaggcgg cagaatcgtg 600  
 aactgggcct gcaacagagc caccgtggga ctggtggaag ccatcggcag cagagagctg 660  
 agacagcacg ccagcagata cctggccaga gtggaagccg gcgaggaact ggcggtgacc 720  
 aacaagggca gactggtggc cagactgatc cctgtgcagg ccgccgagag aagcagagag 780  
 gccctgattg agagcggcgt gctgatccct gccagacggc ctgagaacct gctggatgtg 840  
 acagccgagc ccgccagagg ccggaagaga accctgagcg acgtgctgaa cgagatgcgg 900  
 gatgaacagg tggacttcgg cgccctgcct cccgagatta atagcgccag gatgtacgcc 960  
 ggccctggca gcgttctct ggtggccgct gccaagatgt gggatagcgt ggccagcgac 1020  
 ctgttctctg ccgccagcgc atttcagagc gtctgtggg gactactgt gggctcttg 1080  
 atcggtatct ctgccgtct gatggcgtc gtgcctctc ctatgtggc ctggatgagc 1140  
 gtgaccgccc gacaggcaca gctgacagct gcacaggctc gagggtgc cgccgcttac 1200  
 gagacagcct acagactgac agtgctcca cccgtgatcg ccgagaatcg gaccgagctc 1260  
 atgacctga ccgccaccaa tctgctggc cagaacaccc ctgccatga ggccaatcag 1320  
 gccgcctact ctcaaatgtg gggccaagat gccgaggcta tgtacggcta tgcagccaca 1380  
 gccgccactg ctacagaagc cctgctgccc ttgaagatg ccctctgat cacaaccct 1440  
 ggcggcctgc tggaacaggc cgtggctgtg gaagaggcca tcgataccgc tgccgccaac 1500  
 caactcatga acaacgtgcc acaggccctc cagcagctgg ctacgctgc tcagggcgtg 1560  
 gtgccttcta gcaagctcgg cggactgtgg accgccgtgt ctctcatct gagccctctg 1620  
 agcaacgtgt cctctatgc caacaaccac atgagcatga tgggcaccgg cgtgtcatg 1680  
 accaacaccc tgcacagcat gctgaaggga ctggcccctg ctgctgcca ggtgtggaa 1740  
 acagccgccg aaaatggcgt gtgggccatg agcagcctgg gctctcagct gggaagctcc 1800  
 ctcggttctt ctggactggg agctggcgtg gccgccaatc tgggaagagc tgcttctgtc 1860  
 ggcagcctgt ctgtgcctcc tcttgggccc gctgctaacc aggctgtgac accagctgct 1920  
 agagccctgc ctctgaccag cctgacatct gccgtcaga cagcccctgg ccacatgctg 1980  
 ggaggactgc ctctgggcca ctctgtaat gccggcagcg gcatcaacaa cgccctgaga 2040



gtgcctgcc gagcctacgc catccccaga actccagccg ctggcgattt tgccaccctc 2100  
 ccacctgaga tcaattccgc tagaatgtat agcggagccg ggtctgctcc tatgctggct 2160  
 gctgcttctg cctggcacgg actgtctgcc gaactgagag ccagcgcctt gagctacagc 2220  
 agcgtgctga gtaccctgac cggcgaagag tggcacggac ctgccagcgc ctctatgaca 2280  
 gcagccgctg ccccatatgt cgcatggatg tcagtcactg cagtgcgggc cgaacaggca 2340  
 ggcgctcagg ctgaagctgc agcagcagct tatgaagccg cctttgccgc tacagtccca 2400  
 cctctgtca ttgaggccaa ccgggccag ctgatggctc tgattgccac aaacgtgctg 2460  
 ggacagaatg cccagccat tgccgtaca gaagcccagt atgccgagat gtgtgccag 2520  
 gacgtatgg caatgtatgg gtatgtggc gcctccgccg ctgccacaca gctgacacct 2580  
 ttcaccgagc ccgtgcagac caccaatgcc tctggactgg ccgccagtc tgccgccatt 2640  
 gctcatgcta caggcgctc tgctggggct cagcagacaa cactgtccca gctgatcgcc 2700  
 gccatcccta gcgtgtgca gggactgagc agctctaccg ccgccacatt tgcctctggc 2760  
 cctagcggac tgctgggcat cgtgggcagt ggaagctcct ggctggataa gctgtgggcc 2820  
 ctgctggacc ccaacagcaa cttctggaac acaatcgcca gctccggcct gtttctgccc 2880  
 agcaacacca ttgcccatt tctgggcctg ctgggcggag tggctgctgc agatgctgct 2940  
 ggggatgtgc tgggcgaagc cacaagcgga ggactgggag gcgctctggt ggcacctctg 3000  
 ggatctgcag gcggactcgg aggaacagtg gctgcaggac tggcaatgc tgccacagtg 3060  
 ggcacactga gcgtgccacc atcttgaca gctgccgcc ctctggcttc tcctctcgga 3120  
 tctgctctgg gcggcaccct tatggtggct ccacctctg ctgtggctgc cggaatgcct 3180  
 ggcatgcctt tcggcacaat gggcggacag ggcttcggca gagccgtgcc tcagtacggc 3240  
 ttccggccta acttctggc cagacctct gcagctggcg aacaaaaact catctcagaa 3300  
 gaggatctgc atcatcatca tcatcattga 3330  
 <210> 48  
 <211> 2922  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> nt послідовність, що кодує злиття n° 6  
 "SS-Flag-Ag85B\*-Rv2626-RPFB-Dhyb-Rv1733\*-Myc-His tag" (pTG18270)  
 <400> 48  
 atggttctc aggtctcct gttgtaccc cttctggtt ttccattgtg ttttgggaaa 60  
 ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggcctct ctagacctgg cctgcccgtg 120

gaatacctgc aggtccaag cccagcatg ggccgggata tcaaggtgca gttcagagc 180  
 ggcggaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagcca ggacgactac 240  
 aacggctggg acatcaacac ccctgccttc gagtgttact accagagcgg cctgtccatc 300  
 gtgatgcctg tgggcgcca gagcagcttc tacagcgact ggtacagccc cgctgtggc 360  
 aaagccggct gccagaccta caagtgggag acattcctga cctccgagct gcccagtg 420  
 ctgagcgcca atagagccgt gaagcctaca ggctctgccg ccatcgagct gagcatggcc 480  
 ggaagctctg ccatgatcct ggccgcctat caccctcagc agttcatcta cgccggcagc 540  
 ctgtctgccc tgctggaccc ttctcagggc atgggccctt ctctgatcgg actggctatg 600  
 ggcgacgctg gcgatacaa ggccgccgat atgtggggcc ctacgagcga tctgcctgg 660  
 gagagaaacg accccacca gcagatcccc aagctgttg ccaacaacac ccggtgtgg 720  
 gtgtactgcg gcaacggcac ccctaataa ctgggaggag ccaatatccc cgccgagttc 780  
 ctggaaaact tcgtgcggag cagcaacctg aagttccagg atgcctaca cgccgctggc 840  
 ggccacaacg ccgtgttcaa ctccctccc aatggcacc acagctggga gtactgggga 900  
 gccagctga acgcatgaa gggcgatctg cagtccttc tgggagccg cacaaccgcc 960  
 agagacatca tgaacgccg cgtgacctgt gtggcgagc acgagacact gacagccgcc 1020  
 gctcagtaca tgagagagca cgacatcggc gccctgcca tctcggcgca cgatgataga 1080  
 ctgcacggca tgctgaccga ccgggacatc gtgatcaagg gcctggctgc tggcctggac 1140  
 cccaatactg ctacagctgg cgagctggca agagacagca tctactacgt ggacgccaac 1200  
 gccagcatcc aggaaatgct gaacgtgatg gaagaacacc aggtccgacg ggtgccctg 1260  
 atcagcgaac acagactcgt gggcatcgtg accgaggccg atatcgccag acatctgccc 1320  
 gagcagcca tcgtgcagtt cgtgaaggcc atctcagcc ccatggccct ggctctacc 1380  
 gtggacggca ccgcatgag agtgaccacc atgaagtcca gagtgatcga catcgtggaa 1440  
 gagaacggct tcagcgtgga cgaccgggac gacctgtatc ctgctgctgg agtcaggctc 1500  
 cacgacggc atacaatcgt gctcgggaga agcagacccc tgcatcag cctggatggc 1560  
 cacgacgcca agcaggctg gaccacagcc agcacagtgg atgaagccct ggcccagctg 1620  
 gccatgaccg atacagctcc agccggcgt agcagagcta gcagagtgc tctgtctggc 1680  
 atggccctgc ctgtggtgtc tgccaagacc gtgcagctga acgatggcg cctcgtcgg 1740  
 acagtgcac tgctgtctcc taatgtggcc ggctgtgtgt ctgcagcagg cgtgccactg 1800  
 ctgcagagcg atcatgtgtt gcctgccgc acagccccta tcgtggaagg catgcagatc 1860  
 caggtcacac ggaaccggat caagaaagt accgagcggc tgcccctgcc tccaacgct 1920

agaagagtgg aagatcccga gatgaacatg agcagagagg tggctgagga ccctggcgtg 1980  
ccaggcacac aggatgtgac attcgccgtg gccgaagtga acggcgtgga aaccggcaga 2040  
ctgcccgtgg ccaatgtggt ggtcacacca gcccatgagg ccgtcgtcag agtgggcaca 2100  
aagcctggca cagaggtgcc acccgtgatc gacggcagca tctgggatgc cattgccag 2160  
tgcaagagcg gcggaactg ggccgccaat accggcaatg gcctctatgg cggcctgcag 2220  
atctctcagg ccgctggga ttctaattgg ggcgtgggat ctctgcccgc tgctctcca 2280  
cagcagcaga tcgaggtggc cgacaacatc atgaagacag ccggacctgg cgcctggccc 2340  
aagtgtagca gttgttctca gggcgacgcc cctctgggca gcctgacaca catcctgaca 2400  
tttctggccg ccgagacagg cggagctgga acagccgtgc aggatagccg gtcccacgtg 2460  
tacgctcacc aggccagac aagacaccct gccacagcca ccgtgatcga ccacgagggc 2520  
gtgatcgaca gcaacaccac cgccacatct gccccacccc ggaccaagat cacagtgcct 2580  
gctagatggg tggtaacgg catcgagcgg agcggcgaag tgaatgcaa gcccggcacc 2640  
aagagcggcg acagagtggg aatctgggtg gactctgccg gccagctggt ggatgaacct 2700  
gccccctctg ccagagccat tgccgatgct gctctggctg cactgggcct gtggctgtct 2760  
gtggcagctg tggctggcg actgctggct ctgacaagag ccatcctgat cagagtgcgg 2820  
aacgccagtt ggcagcacga tatcgacagc ctgttctgca cccagcggga acaaaaactc 2880  
atctcagaag aggatctgag ccatcatcat catcatcatt ga 2922

<210> 49

<211> 1875

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття п°8

"SS-Flag-Ag85B\*-Rv2626-Rv1733\*-Myc-His tag" (pTG18272)

<400> 49

atggttcctc aggtctctct gttgtaccc ctctggttt ttccattgtg ttttgggaaa 60

ttccctattg attacaagga tgacgacgat aaggccttct ctagacctgg cctgcccgtg 120

gaatacctgc aggtcccaag cccagcatg ggccgggata tcaaggtgca gttcagagc 180

ggcggcaaca acagccctgc cgtgtatctg ctggatggcc tgagagccca ggacgactac 240

aacggctggg acatcaacac cctgccttc gagtgttact accagagcgg cctgtccatc 300

gtgatgcctg tggggggcca gagcagcttc tacagcgact ggtacagccc cgctgtggc 360

aaagccggct gccagacctc caagtgggag acattctga cctccgagct gccccagtgg 420

ctgagcgcca atagagccgt gaagcctaca ggctctgccg ccatcggaact gagcatggcc 480  
 ggaagctctg ccatgatcct ggccgcctat caccctcagc agttcatcta cgccggcagc 540  
 ctgtctgccc tgctggaccc ttctcagggc atgggccctt ctctgatcgg actggctatg 600  
 ggcgacgctg gcgatacaa ggccgccgat atgtggggcc ctagcagcga tcctgcctgg 660  
 gagagaaacg accccaccca gcagatcccc aagctggtgg ccaacaacac ccggctgtgg 720  
 gtgtactgcg gcaacggcac ccctaataaa ctgggcggag ccaatatccc cgccgagttc 780  
 ctggaaaact tcgtgcggag cagcaacctg aagttccagg atgcctaaa cgccgctggc 840  
 ggccacaacg ccgtgttcaa ctccctccc aatggcacc acagctggga gtactgggga 900  
 gccagctga acgcatgaa gggcgatctg cagtcctctc tgggagccgg cacaaccgcc 960  
 agagacatca tgaacgccg cgtgacctgt gtgggcgagc acgagacact gacagccgcc 1020  
 gctcagtaca tgagagagca cgacatggc gccctgccc tctgcggcga cgatgataga 1080  
 ctgcacggca tgctgaccga ccgggacatc gtgatcaagg gcctggctgc tggcctggac 1140  
 cccaatactg ctacagctgg cgagctggca agagacagca tctactacgt ggacgccaac 1200  
 gccagcatcc aggaaatgct gaacgtgatg gaagaacacc aggtccgacg ggtgcccgtg 1260  
 atcagcgaac acagactcgt gggcatcgtg accgaggccg atatcgccag acatctgccc 1320  
 gagcacgcca tcgtgcagtt cgtgaaggcc atctgcagcc ccatggccct ggctctgct 1380  
 ggaacagccg tgcaggatag ccggtccac gtgtacgctc accaggccca gacaagacac 1440  
 cctgccacag ccaccgtgat cgaccacgag ggcgtgatcg acagcaacac caccgccaca 1500  
 tctgccccac ccggaccaa gatcacagt cctgctagat ggggtgtcaa cggcatcgag 1560  
 cggagcggcg aagtgaatgc caagcccgc accaagagcg gcgacagagt gggaatctgg 1620  
 gtggactctg ccggccagct ggtggatgaa cctgcccctc ctgccagagc cattgccgat 1680  
 gctgctctgg ctgcactgg cctgtggctg tctgtggcag ctgtggctgg cgactgctg 1740  
 gctctgaaa gagccatcct gatcagagt cggaacgcca gttggcagca cgatatcgac 1800  
 agcctgttct gcaccagcg ggaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gagccatcat 1860  
 catcatcatc attga 1875

<210> 50

<211> 2845

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття N°13

"SS-Flag-Rv2029\*-Rv2626-Rv1733\*-Rv0111\*-Myc-His tag" (pTG18323)

<400> 50  
atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcattggcag tactgttaac tctccaaaca 60  
cccaccggtc aaatccattg gggcgattac aaggatgacg acgataagac cgagcctgcc 120  
gcctgggatg agggcaagcc cagaatcatc accctgacca tgaaccccg cctggacatc 180  
accaccagcg tggacgtcgt gcggcccacc gagaagatga gatgtggcg ccttagatac 240  
gacctggcg gcggaggaat caacgtggcc agaactgtgc acgtgctggg cggctgtagc 300  
accgccctgt ttccagctgg cggctctaca ggctctctgc tgatggccct gctgggagat 360  
gccggcgtgc ccttcagagt gatccctatc gccgccagca cccgcgagag cttcaccgtg 420  
aatgagagcc ggaccgcaa gcagtacaga ttctgtctgc ctggccccag cctgacagtg 480  
gccgaacagg aacagtgcct ggacgagctg agaggcgccg ctgcctctgc tgctttgtg 540  
gtggcctctg gctctctgcc tctggcgtg gccgccgact actatcagag agtggccgac 600  
atctgccggc ggagcagcac acctctgatc ctggatacaa gcggcggagg cctgcagcat 660  
atcagcagcg gagtgttct gctgaaggcc agcgtcccg agctgaggga atgtgtggga 720  
agcagctgc tgaccgagcc cgaacagctg gccgctgccc acgagctgat cgatagaggc 780  
agagccgagg tgggtgtgt gtctctggga tctcaggcg ctctgctggc cacaagacac 840  
gccagccacc gggtcagcag catccctatg acagccgtgt ctggcgtggg agccggcaat 900  
gctatggtgg ccgccatcac agtgggcctg tctagaggct ggtccctgat caagtctgtg 960  
cggctgggca atgccgctg cgctgctatg ctgtgacac ctggaaccgc cgctgcaac 1020  
agggacgacg tggaacggtt ctcgagaca accgccagag acatcatgaa cgccggcgtg 1080  
acctgtgtgg gcgagcacga gacactgaca gccgccgctc agtacatgag agagcacgac 1140  
atcggcgccc tgccatctg cggcgacgat gatagactgc acggcatgct gaccgaccgg 1200  
gacatcgtga tcaagggcct ggctgctggc ctggacccca atactgtac agctggcgag 1260  
ctggcaagag acagcatcta ctacgtggac gccaacgcca gcatccagga aatgtgaac 1320  
gtgatggaag aacaccaggt ccgacgggtg cccgtgatca gcgaacacag actcgtgggc 1380  
atcgtgaccg aggccgatat cgccagacat ctgcccgagc acgccatcgt gcagttcgtg 1440  
aaggccatct gcagcccat ggccctggcc tctgtggaa cagccgtgca ggatagccgg 1500  
tcccacgtgt acgctacca ggcccagaca agacaccctg ccacagccac cgtgatcgac 1560  
cacgagggcg tgatcgacag caacaccacc gccacatctg cccaccccg gaccaagatc 1620  
acagtgcctg ctatgtgggt ggtcaacggc atcgagcgga gcggcgaagt gaatgccaag 1680  
cccgccacca agagcggcga cagagtggga atctgggtg actctgccg ccagctggtg 1740

gatgaacctg cccctcctgc cagagccatt gccgatgctg ctctggctgc actgggcctg 1800  
 tggctgtctg tggcagctgt ggctggcgca ctgctggctc tgacaagagc catcctgac 1860  
 agagtgcgga acgccagttg gcagcacgat atcgacagcc tgttctgcac ccagcgggag 1920  
 cagcccatca gaagatggcg gcctgccaga gtgccactgc tgccactggc tgctgtaca 1980  
 gtggcttctg ccgccgctgt gaccatgctg gtggtgcctg tgggagctgg acctggcctg 2040  
 agagagatcg gactgccacc aggcgtgtca gccgtggctg ctgtgtctcc tagccctct 2100  
 gaagcctctc agcctgcccc tggcccaaga gatcccaaca gacccttcac cgtgtccgtg 2160  
 ttccggcgaca gcatcggctg gaccctgatg cactacctgc ctcccacccc tggcttccgg 2220  
 ttcatcgacc acacagtgat cggctgcagt ctctgctggg gcacccctta cagatatatc 2280  
 ggccagaccc tggaaacagcg ggccgagtgat gatggatggc ctgctaggtg gtccgcccag 2340  
 gtcaacagag atcagcccgga cgtggcactg ctgatcgtgg gcagatggga gacagtggac 2400  
 agagtgaacg agggccggtg gaccacatc gccgacccta ccttgacgc ctacctaac 2460  
 gccgagctgc agcggggcct gtctatcgtg ggaagcacag gcgtcagagt gatggtcacc 2520  
 acctgcccct acagcagagg cggcgagaag cctgacggca gactgtacc tgaggaccag 2580  
 cccgagcgcg tgaacaagtg gaacgccatg ctgcacaacg ccatcagcca gcacagcaac 2640  
 gtgggcatga tcgacctgaa caagaagctg tgccccgacg gcgtgtacac cgccaaggtg 2700  
 gacggaatca aagtgcggag cgacggcgtg cacctgacct aggaaggcgt gaagtggctg 2760  
 atccccctggc tggaaagatag cgtgcgggtg gcctctgaac aaaaactcat ctcaagaag 2820  
 gatctgagcc atcatcatca tcac 2845

<210> 51

<211> 2547

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> nt послідовність, що кодує злиття n°14

"SS-Flag-Rv2029\*-TB10.4-ESAT6-Rv0111\*-Myc-His tag" (pTG18324)

<400> 51

atgggtctca aggtgaacgt ctctgccata ttcatggcag tactgttaac tctccaaaca 60

cccaccggtc aaatccattg gggcgattac aaggatgacg acgataagac cgagcctgcc 120

gcctgggatg agggcaagcc cagaatcatc accctgacca tgaaccccg cctggacatc 180

accaccagcg tggacgtcgt gcggcccacc gagaagatga gatgtggcgc ccctagatac 240

gacctggcg gcggaggaat caacgtggcc agaactgtgc acgtgctggg cggtgtagc 300

accgcctgt ttccagctgg cggctctaca ggctctctgc tgatggccct gctgggagat 360

gccggcgtgc ccttcagagt gatccctatc gccgccagca cccgcgagag cttcaccgtg 420  
 aatgagagcc ggaccgcca gacgtacaga ttcgtgctgc ctggccccag cctgacagtg 480  
 gccgaacagg aacagtgcct ggacgagctg agaggcgccg ctgcctctgc tgcttttg 540  
 gtggcctctg gctctctgcc tcctggcgtg gccgccgact actatcagag agtggccgac 600  
 atctgccggc ggagcagcac acctctgac ctggatacaa gcggcgagg cctgcagcat 660  
 atcagcagcg gagtgttct gctgaaggcc agcgtccgcg agctgaggga atgtgtggga 720  
 agcgagctgc tgaccgagcc cgaacagctg gccgctgccc acgagctgat cgatagaggc 780  
 agagccgagg tgggtgtgt gtctctggga tctcagggcg ctctgctggc cacaagacac 840  
 gccagccacc gggtcagcag catccctatg acagccgtgt ctggcgtggg agccggcaat 900  
 gctatggtgg ccgccatcac agtgggcctg tctagaggct ggtccctgat caagtctgtg 960  
 cggctgggca atgccgctgg cgctgctatg ctgctgacac ctggaaccgc cgctgcaac 1020  
 agggacgacg tggaaagggt ctcgagagc cagatcatgt acaactacc cgccatgctg 1080  
 ggccacgccg gcgatatggc tggatatgcc ggcacactgc agagcctggg tgccgagatt 1140  
 gccgtggaac aggctgccct ccagtctgcc tggcagggcg ataccggcat cacataccag 1200  
 gcttggcagg ccagtgga caggccatg gaagatctcg tgcgggccta ccacgccatg 1260  
 agcagcacac acgaggccaa caccatggcc atgatggccc gggatacagc cgaggccgct 1320  
 aagtggggag gaaccgagca gcagtggaac ttcgccgga ttagggccgc tgccagcgcc 1380  
 atccagggca acgtgacatc catccacagc ctgctggacg agggcaagca gagcctgaca 1440  
 aaactggctg ctgcctgggg cggtctggc tctgaagct atcagggcgt gcagcagaag 1500  
 tgggacgcca ccgccaccga gctgaacaac gccctgcaga acctggccc gacaatctct 1560  
 gaagccggac aggccatggc cagcaccgag ggcaatgtga ccggcatgtt tgccgagcag 1620  
 cccatcagaa gatggcggcc tgccagagtg cactgtctgc cactggctgc tgctacagt 1680  
 gcttctgcc cgctgtgac catgtggtg gtgcctgtg gagctggacc tggcctgaga 1740  
 gagatcggac tgccaccagg cgtgtcagcc gtggctgctg tgtctcctag cctcctgaa 1800  
 gcctctcagc ctgccctgg cccaagagat cccaacagac cctcaccgt gtccgtgttc 1860  
 ggcgacagca tcggctggac cctgatgcac tacctgcctc ccaccctgg cttccggttc 1920  
 atcgaccaca cagtgatcgg ctgcagtctc gtgcggggca ccccttacag atatatcggc 1980  
 cagaccctgg aacagcgggc cgagtgtgat ggatggcctg ctaggtggtc cgcccaggtc 2040  
 aacagagatc agcccagct ggcactgctg atcgtgggca gatgggagac agtggacaga 2100

gtgaacgagg gccggtggac ccacatcggc gaccctacct ttgacgccta cctgaacgcc 2160  
gagctgcagc gggccctgtc tatcgtggga agcacaggcg tcagagtgat ggccaccacc 2220  
gtgccctaca gcagaggcgg cgagaagcct gacggcagac tgtaccctga ggaccagccc 2280  
gagcgcgtga acaagtggaa cgccatgctg cacaacgcca tcagccagca cagcaacgtg 2340  
ggcatgatcg acctgaacaa gaagctgtgc cccgacggcg tgtacaccgc caaggtggac 2400  
ggaatcaaag tgcggagcga cggcgtgcac ctgaccagg aaggcgtgaa gtggctgatc 2460  
ccctggctgg aagatagcgt gcgggtggcc tctgaacaaa aactcatctc agaagaggat 2520  
ctgagccatc atcatcatca tcattga 2547

<210> 52  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 52  
cgcggccgca ccatggatta caaggatgac gacg 34

<210> 53  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 53  
cgtcgtcatc cttgtaatcc atggtgcggc cgcg 34

<210> 54  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 54  
catctcaga gaggatctgc atcatcatca tcattcattg 39

<210> 55  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер



<400> 55  
caatgatgat gatgatgatg cagatcctct tctgagatg 39

<210> 56  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 56  
gatgacgacg ataaggctag cagagccacc gtgggactgg 40

<210> 57  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 57  
gatgagtttt tggtcgctag cctgttcac cgcacatctcg t 41

<210> 58  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 58  
gatgacgacg ataaggctag caaggccaaa gtcggcg 37

<210> 59  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 59  
gatgagtttt tggtcgctag ctgttcctct ggcgtgc 37

<210> 60  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> праймер

<400> 60  
gatgacgacg ataaggctag cgattttgcc accctccac c 41

<210> 61  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 61  
 gagatgagtt ttgttcgct agcgccagct gcaggaggtc tgg 43  
  
 <210> 62  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 62  
 gatgacgacg ataaggctag cgccaacggc agcatgagcg 40  
  
 <210> 63  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 63  
 gagatgagtt ttgttcgct agcgttcgag gccagttca cga 43  
  
 <210> 64  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 64  
 gatgacgacg ataaggctag cgtggacttc ggcgccctgc 40  
  
 <210> 65  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 65  
 gagatgagtt ttgttcgct agcgccagcg gctggagttc tgg 43  
  
 <210> 66  
 <211> 42

<212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 66  
 gatgacgacg ataaggctag cacaaccgcc agagacatca tg 42  
  
 <210> 67  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 67  
 gatgagtttt tggtcgctag cagaggccag ggccatgggg 40  
  
 <210> 68  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 68  
 gttttgaaa attcccaata accgtggacg gcacc 35  
  
 <210> 69  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 69  
 ggtgccgtcc acggtattg ggaatttcc aaaac 35  
  
 <210> 70  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 70  
 gaccggcatg ttgccagct atgttctct ctctg 35  
  
 <210> 71  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 71  
 sagagagaag aacatagctg gcaaacatgc cggtc 35  
  
 <210> 72  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 72  
 gtttcggtaa gtttcctata aaggccaaag tcggcgcac 38  
  
 <210> 73  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 73  
 gtcgccgact ttggccttta taggaactt accgaaac 38  
  
 <210> 74  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 74  
 cctcctgcag ctggcagcta cgactgcta tc 32  
  
 <210> 75  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 75  
 gatagcagta cgtagctgcc agctgcagga gg 32  
  
 <210> 76  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер

<400> 76  
 gtttgggaa attccctatt gccttctcta gacctg 36  
  
 <210> 77  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 77  
 caggtctaga gaaggcaata gggaatttcc caaaac 36  
  
 <210> 78  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 78  
 gatcagatat cgcggccgcc gtacgacct ggtaccacaa gcgc 44  
  
 <210> 79  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 79  
 ggcggcaggc tcggtgcccc aatggatttg ac 32  
  
 <210> 80  
 <211> 124  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> промотор p7.5K  
  
 <400> 80  
 ccaccactt ttatagtaa gttttcacc cataaataat aaatacaata attaatttct 60  
  
 cgtaaaagta gaaaatatat tctaatttat tgcacggtaa ggaagtagaa tcataaagaa 120  
  
 cagt 124  
  
 <210> 81  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 81

gctggtagat ctcccaccca cttttatag 30

<210> 82  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> праймер

<400> 82  
 ccttgagacc catggtggac tgttcttat gattctactt cc 42

<210> 83  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> праймер

<400> 83  
 gtagaatcat aaagaacagt ccaccatggg tctcaagggtg aac 43

<210> 84  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> праймер

<400> 84  
 gagtcatctc cgacttgcgg ccgcacaaaa atcaagaggc caccgcacg ctatc 55

<210> 85  
 <211> 114  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> промотор pH5R

<400> 85  
 ttattctat acttaaaaaa tgaataaaa tacaagggtt ctgaggggtt gtgttaaatt 60

gaaagcgaga aataatcata aattatttca ttatcgcat atccgttaag ttg 114

<210> 86  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> праймер

<400> 86  
 cctcttgatt ttgtgcggc cgctttattc tataactaaa aaatgaaat aaatac 56

<210> 87  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 87  
 ggacattaat taacaactt aacggatatc gcgataatg 39  
  
 <210> 88  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 88  
 ggcaactaat taaccaccat ggtaccaca ggcgtg 36  
  
 <210> 89  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 89  
 gttaacgcta gcctcgagac aaaaatcaaa gacgtgttgc gcctccac 48  
  
 <210> 90  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 90  
 ggcaactaat taaccaccat gaccgtggac ggcaccgcca tg 42  
  
 <210> 91  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 91  
 gttaacgcta gcctcgagac aaaaatcagg caaacatgcc ggtcacattg c 51  
  
 <210> 92  
 <211> 100

<212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> промотор B2R  
  
 <400> 92  
 tatattatta agtgtggtgt ttggtcgtg taaaatttt gtcgataaaa attaaaaaat 60  
  
 aacttaattt attattgatc tcgtgtgtac aaccgaaatc 100  
  
 <210> 93  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 93  
 ggatcctcga gtatattatt aagtgtggtg ttgg 35  
  
 <210> 94  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
 <400> 94  
 cttgcggtac catggtgggc tagcgatttc ggtgtacac acgagatc 48  
  
 <210> 95  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 95  
 gtgtgtacaa ccgaaatcgc tagcccacca tggtagcgca agccc 45  
  
 <210> 96  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> праймер  
  
 <400> 96  
 ctttccggat ccacaaaaat cacaggcggg tctc 34  
  
 <210> 97  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> штучна послідовність  
  
 <220>



<223> праймер

<400> 97

gtgtgtacaа ccgaaatcgс tagccсacca tgaaggccaa agtcggcgac tg 52

<210> 98

<211> 33

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 98

gagtcggatc сасааааатс агссagctgc agg 33

<210> 99

<211> 49

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 99

gagtcattct сgacttgсgg ccgcасаааа atcaagaggc сaccсgcac 49

<210> 100

<211> 40

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 100

gctggtgat сссaccсact тттatagta agтттtcac 40

<210> 101

<211> 37

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 101

ggcacttaat таaccaccat ggтсctcag gctctcc 37

<210> 102

<211> 44

<212> DNA

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

<400> 102

gttaacgcta gcctcgagac ааааатсacc gctgggtgca gaac 44

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи, який містить одну або більше ніж одну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодують щонайменше 5 мікобактеріальних антигенів, які незалежно отримані з видів роду мікобактерій, де молекула(и) нуклеїнової кислоти:
  - кодує щонайменше ESAT-6 (Rv3875), Ag85B (Rv1886) та TB10.4 (Rv0288) активної фази;
  - кодує щонайменше один антиген з фази латентної інфекції, вибраний з групи, що складається з Rv0111, Rv0569, Rv1733c, Rv1807, Rv1813, Rv2029c, Rv2626 і Rv3407; та
  - кодує щонайменше RpfB і RpfD з фази поживлення інфекції.
2. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи за п. 1, який містить одну або більше ніж одну молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує 8-14 мікобактеріальних антигенів, які незалежно отримані з видів роду мікобактерій.
3. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-2, де зазначений антиген(и) латентної фази вибрано з групи, що складається з Rv0111, Rv1733c, Rv2029c і Rv2626.
4. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-3, де мікобактеріальні антигени, отримані з видів роду мікобактерій туберкульозного комплексу, вибрані з групи, що складається з *M. tuberculosis* (*Mtb*), *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae* і *M. microti*, переважно мікобактеріальні антигени отримані з *M. tuberculosis* (*Mtb*), *M. bovis*, *M. bovis* BCG або *M. caprae*, більш переважно мікобактеріальні антигени отримані з *M. tuberculosis* (*Mtb*).
5. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-4, де молекула(и) нуклеїнової кислоти кодує додатковий мікобактеріальний антиген(и).
6. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-5, де зазначена(и) молекула(и) нуклеїнової кислоти кодує мікобактеріальні антигени у формі окремих поліпептидів або у формі одного або більше ніж одного злитого поліпептиду або у формі і окремого(мих) антигена(нів), і гібрида(ів).
7. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-6, який містить одну або більше ніж одну молекулу нуклеїнової кислоти, вибрану з групи нуклеотидних послідовностей, показаних в будь-якій з SEQ ID NO: 40-51.
8. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-7, де зазначеним вектором на основі вірусу віспи є вектор, вибраний з групи, що складається з вектора на основі вірусу віспи курей, вірусу канарипокс і вірусу вісповакцини.
9. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-8, де зазначений вектор на основі вірусу віспи є вектором на основі вірусу вісповакцини, переважно зазначений вектор на основі вірусу вісповакцини оснований на штаммах Copenhagen, Wyeth, NYVAC і модифікованому штамі Анкара (MVA).
10. Вектор на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-9, який вибраний з групи, що складається з наступних:
  - i) вектор на основі вірусу віспи, що кодує злитий поліпептид, що містить Rv2029c, Rv2626, Rv1733c і Rv0111, і злитий поліпептид, що містить RpfB, RpfD, Ag85B, TB10.4 і ESAT-6;
  - ii) вектор на основі вірусу віспи, що кодує злитий поліпептид, що містить Rv2029c, Rv2626, Rv1733c і Rv0111, злитий поліпептид, що містить RpfB, RpfD, Ag85B, TB10.4 і ESAT-6, і злитий поліпептид, що містить Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807;
  - iii) вектор на основі вірусу віспи, що кодує злитий поліпептид, що містить Ag85B, Rv2626, RpfB, RpfD і Rv1733, і злитий поліпептид, що містить Rv2029c, TB10.4, ESAT-6 і Rv0111;
  - iv) вектор на основі вірусу віспи, що кодує злитий поліпептид, що містить Ag85B, Rv2626, RpfB, RpfD і Rv1733, злитий поліпептид, що містить Rv2029c, TB10.4, ESAT-6 і Rv0111, і злитий поліпептид, що містить Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807; і
  - v) вектор, що кодує злитий поліпептид, що містить RpfB, RpfD, Ag85B, TB10.4 і ESAT-6, і злитий поліпептид, що містить Rv0569, Rv1813, Rv3407, Rv3478 і Rv1807.
11. Композиція, що містить вектор на основі вірусу віспи або комбінацію двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-10, де зазначена композиція переважно, крім того, містить фармацевтично прийнятний носій.
12. Вектор на основі вірусу віспи або комбінацію двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-10 або композиція за п. 11 для застосування для попередження або

лікування інфекції мікобактерією або будь-якого захворювання і патологічного стану, викликаного або асоційованого з такою інфекцією мікобактерією.

5 13. Вектор на основі вірусу віспи або комбінацію двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-10 або композиція за п. 11 для застосування для попередження інфекції або відкладання ризику інфекції мікобактерією у суб'єкта, що потребує цього, особливо суб'єкта, який знаходився в тісному контакті з інфікованим індивідом, що має розвинуте активне захворювання.

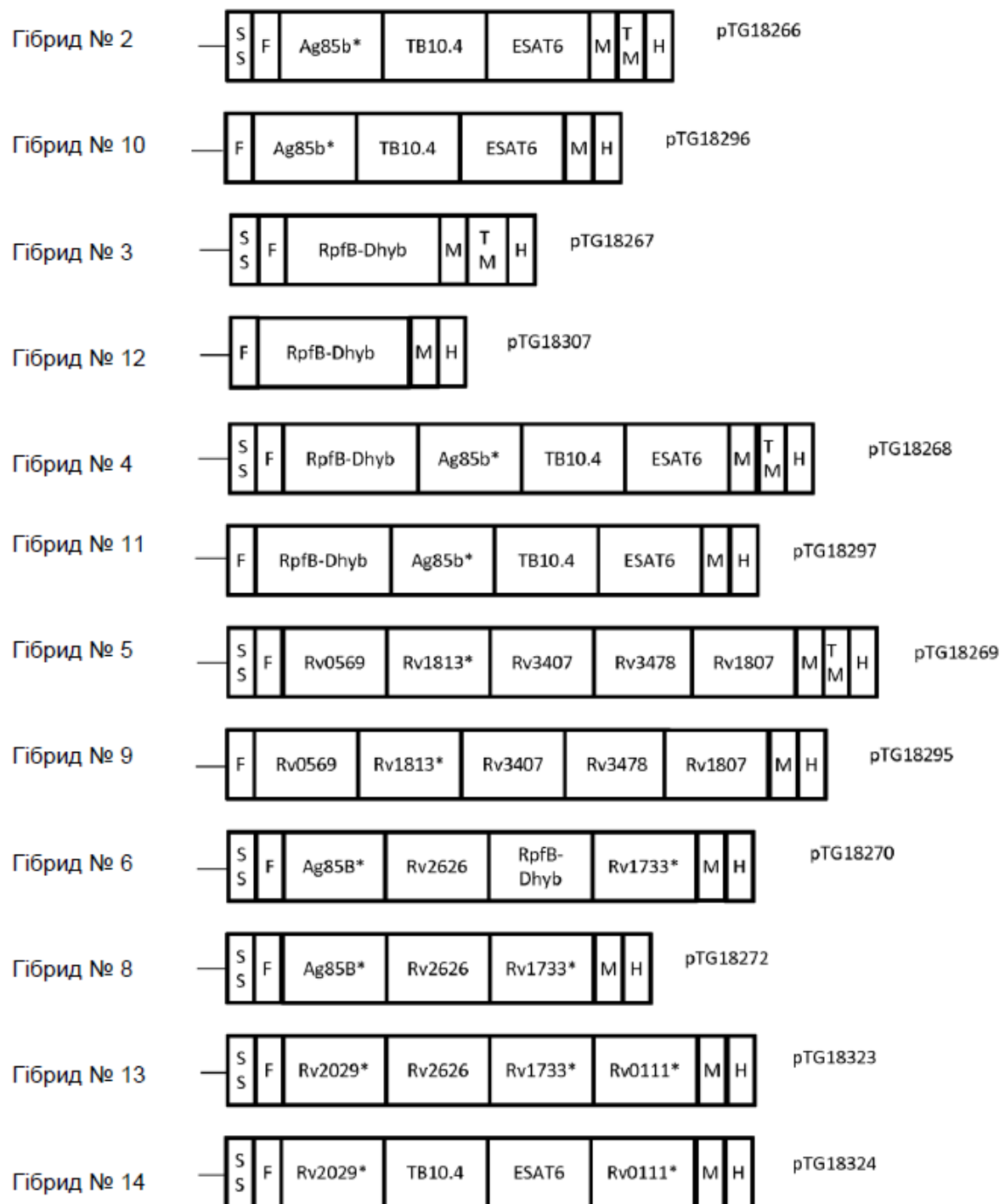
10 14. Вектор на основі вірусу віспи або комбінацію двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-10 або композиція за п. 11 для застосування для лікування інфекції мікобактеріями.

15 15. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи або композиція для застосування за п. 14 у суб'єкта, латентно інфікованого видом мікобактерії і особливо *M. tuberculosis*, причому зазначений суб'єкт вже був заражений вірулентним видом мікобактерії але не демонстрував виявлених симптомів захворювання або клінічних ознак.

15 16. Вектор на основі вірусу віспи або комбінацію двох або більше векторів на основі вірусу віспи за будь-яким з пп. 1-10 або композиція за п. 11 для застосування як бустер BCG.

20 17. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи або композиція для застосування за будь-яким з пп. 12-14 для застосування у асоціації з одним або більше ніж одним хіміотерапевтичним лікарським засобом, ефективним проти інфекції мікобактерією.

18. Вектор на основі вірусу віспи або комбінація двох або більше векторів на основі вірусу віспи або композиція для застосування за п. 17, для застосування у асоціації з однією або більше ніж однією хіміотерапією антибіотиками.



Фіг. 1

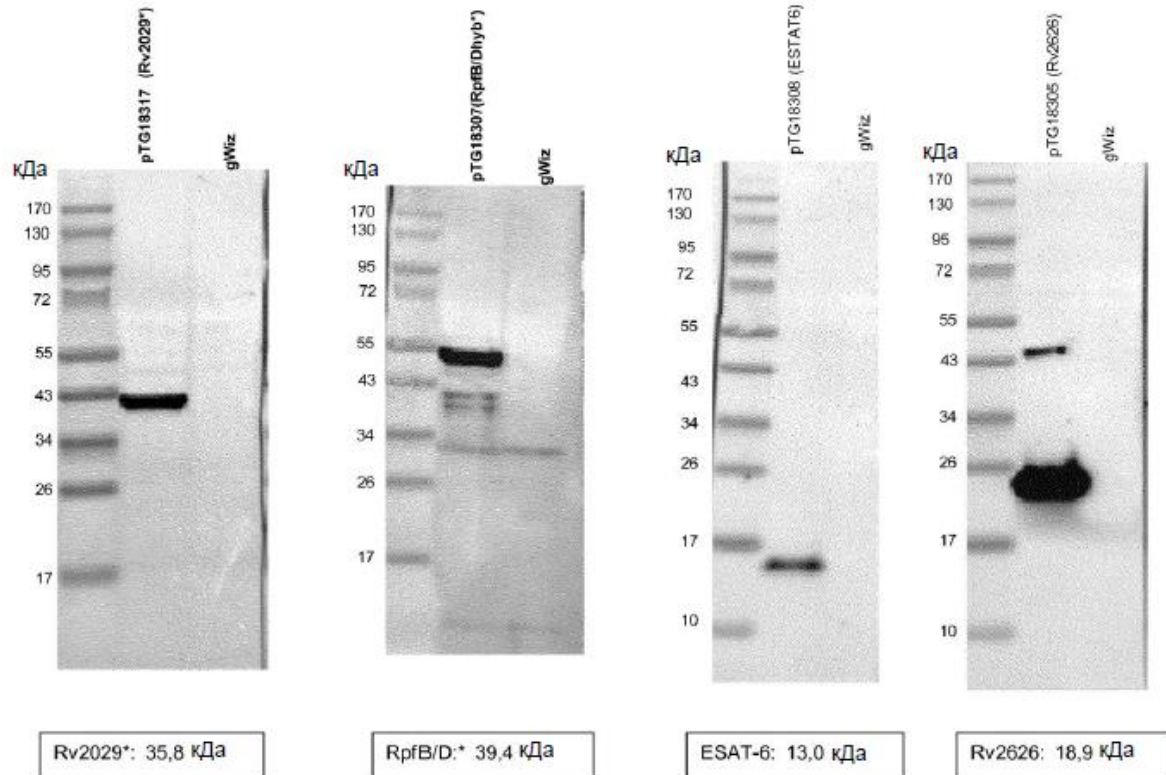
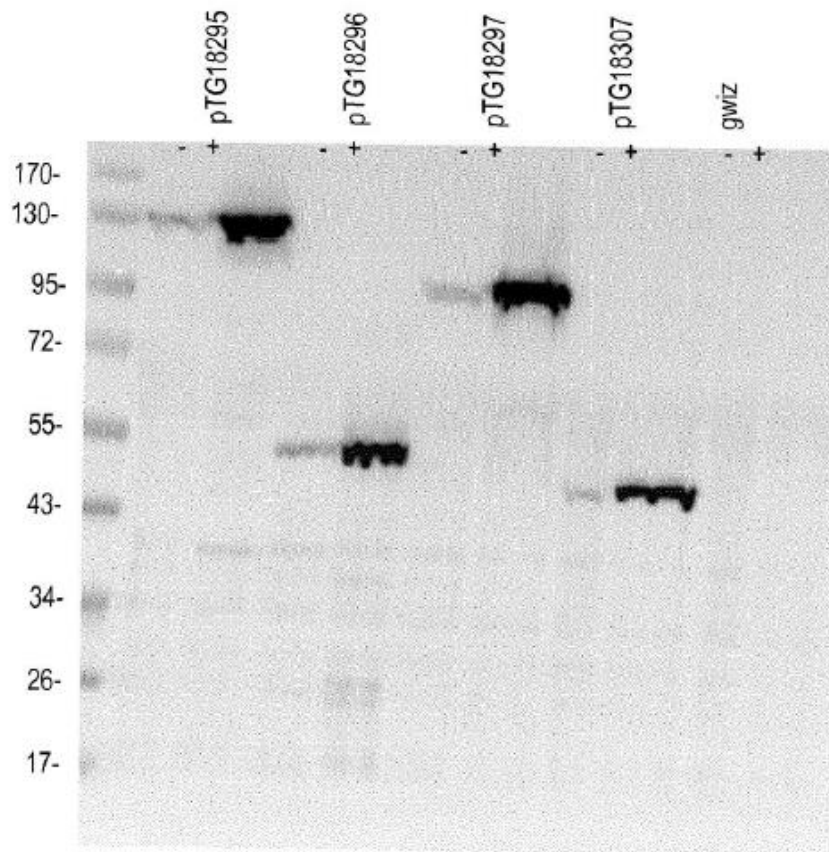


Fig. 2A

Fig. 2B

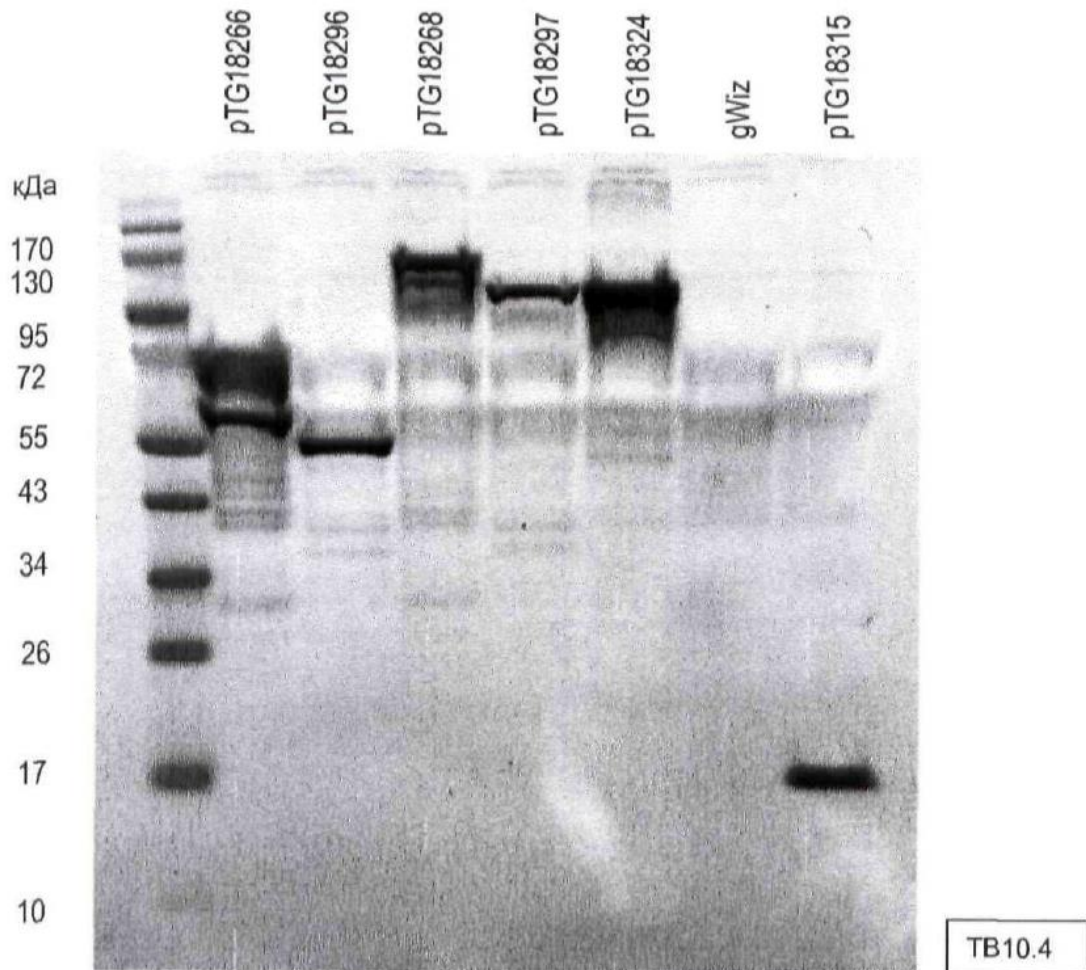
Fig. 2C

Fig. 2D



pTG18295: Flag-Rv0569-Rv1813-Rv3407-Rv3478-Rv1807-cMyc-His (цитоплазматична версія pTG18269): 112,9 кДа  
 pTG18296: Flag-Ag85B-TB10.4-ESAT6-cMyc-His (цитоплазматична версія pTG18266): 53,8 кДа  
 pTG18297: Flag-RpfB-Dhyb-Ag85B-TB10.4-ESAT6-cMyc-His (цитоплазматична версія pTG18268): 90 кДа  
 pTG18307: Flag-RpfB-Dhyb-cMyc-His (цитоплазматична версія pTG18267): 39,3 кДа

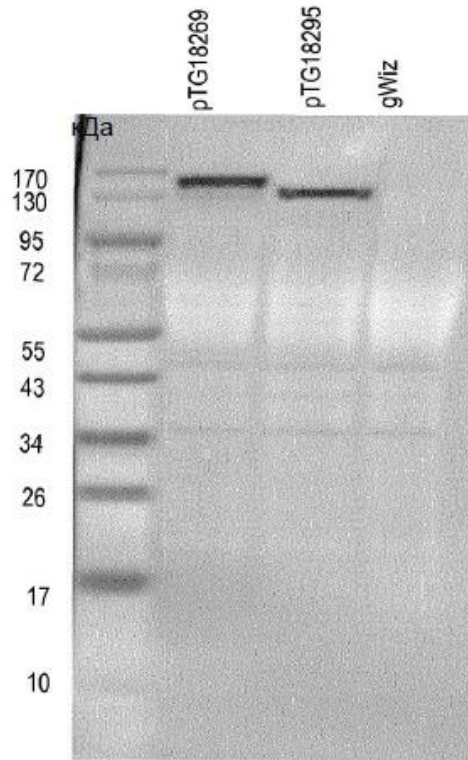
Фіг. 3



pTG18268: SR-Flag-Rpfb-Dhyb-Ag85B-TB10,4-ESAT6-cMyc-TMRv1-His/ **MW: 99,7** кДа  
 pTG18266: SR-Flag-Ag85B-TB10,4-ESAT6-cMyc-TMR-His **MW: 63,6** кДа  
 pTG18296: Flag-Ag85B-TB10,4-ESAT6-cMyc-His (касета 2 з видаленням SR-TMR) MW: 53,8 кДа  
 pTG18297: Flag-Rpfb-Dhyb-Ag85B-TB10,4-ESAT6-cMyc-His (касета 4 з видаленням SR-TMR) MW: 90 кДа  
 pTG18324: SF-Flag- Rv2029-TB10.4-ESAT6-Rv0111del1TM-cMyc-His/ **MW: 90,6** кДа  
 pTG18315: TB10,4 **MW: 13,5** кДа

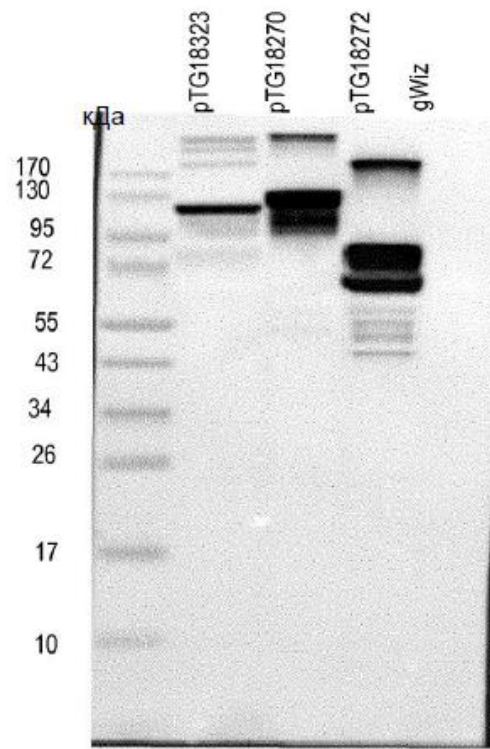
Фіг. 4А





Rv0569

Фиг. 4B

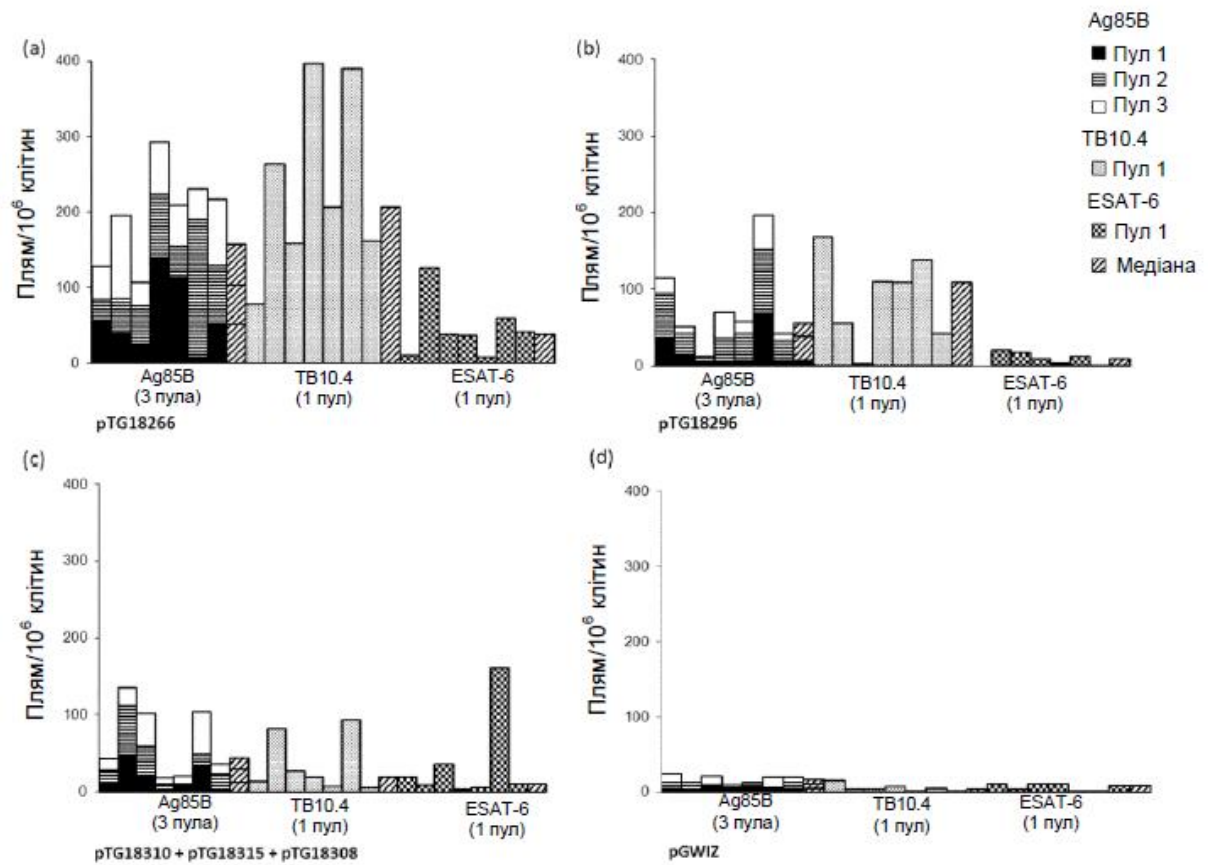


Rv2626

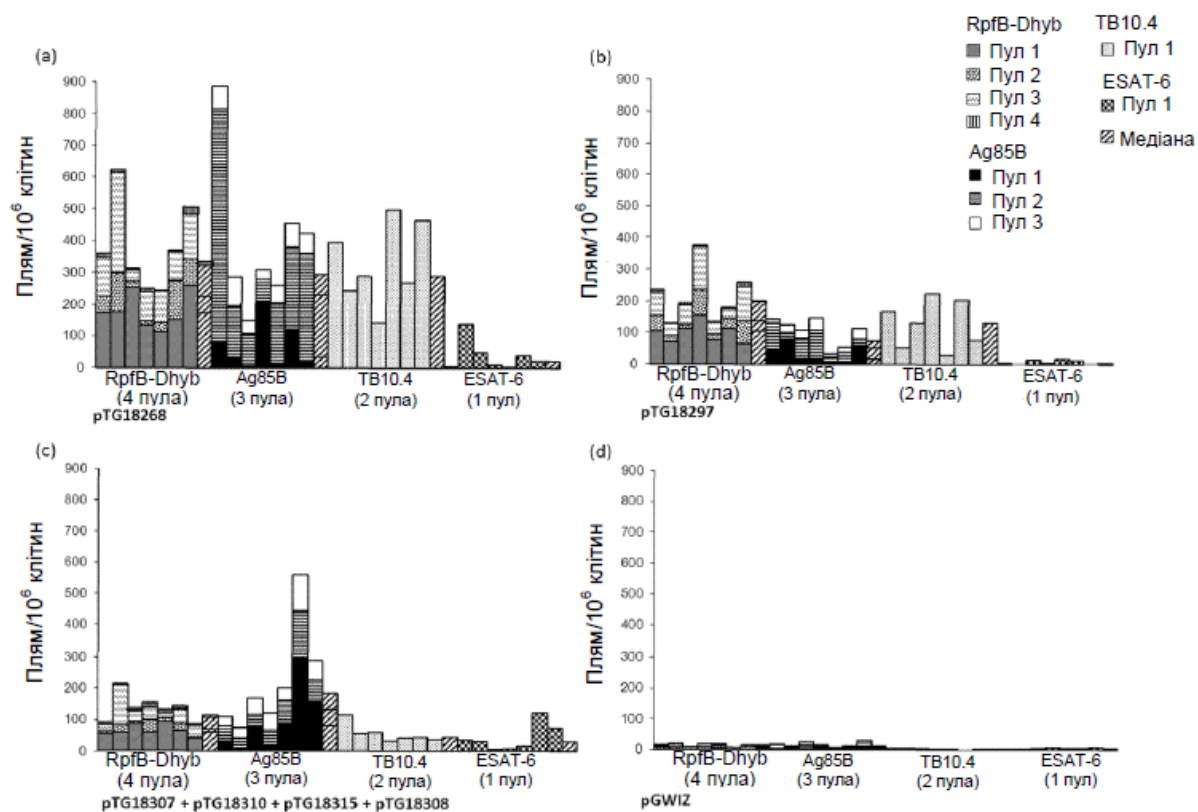
Фиг. 4C

pTG18269: SR-Flag-Rv0569-Rv1813-Rv3407-RV3478-Rv1807-cMyc-TMRv2-His/ **MW: 122** кДа  
 pTG18295: Flag-Rv0569-Rv1813-RV3407-Rv3478-Rv1807-cMyc-His (касета 5 з видаленням SR-TMR) MW: 112,9 кДа  
 pTG18323: SF-Flag-Rv2029-Rv2626-Rv1733-Rv0111del1TM-cMyc-His/ **MW:101,5** кДа  
 pTG18270: SR-Flag-Ag85B-RV2626-RpfB-Dhyb-RV1733-cMyc-His/ **MW:103,5** кДа  
 pTG18272: SR-Flag-Ag85B-Rv2626-Rv1733-cMyc-His/ **MW:67,3** кДа  
 pTG18324: SF-Flag- Rv2029-TB10.4-ESAT6-Rv0111del1TM-cMyc-His/ **MW:90,6** кДа

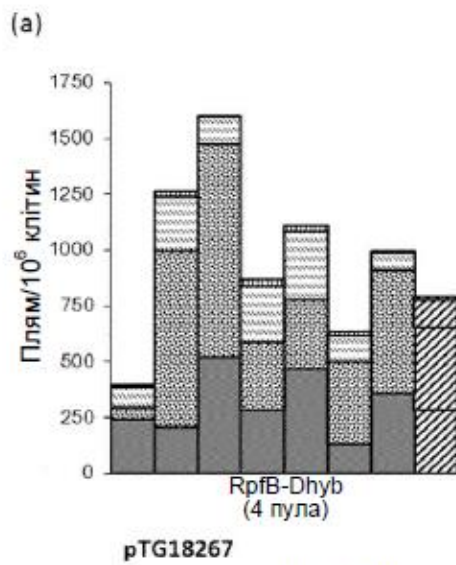




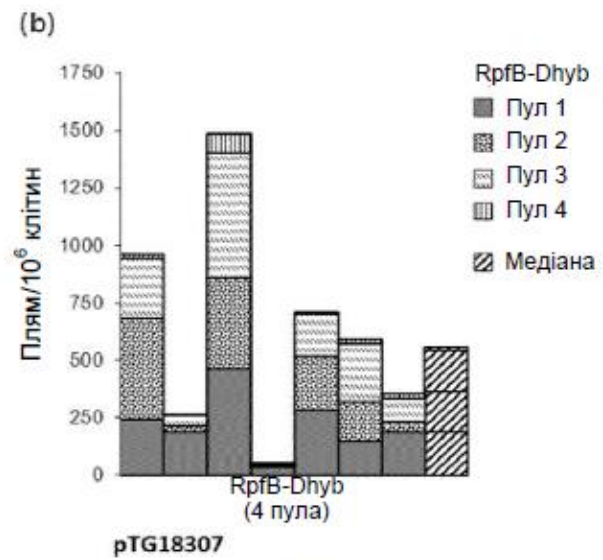
Фіг. 5



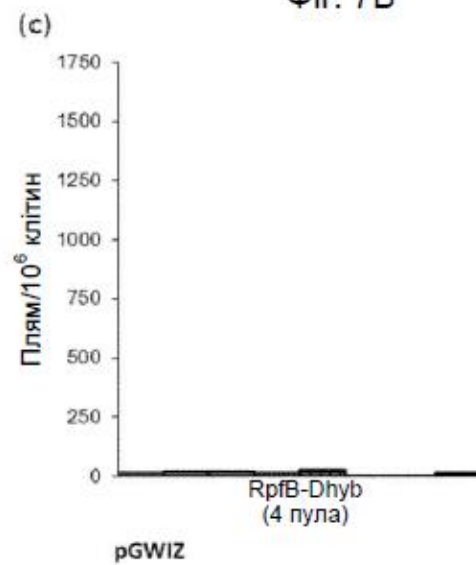
Фіг. 6



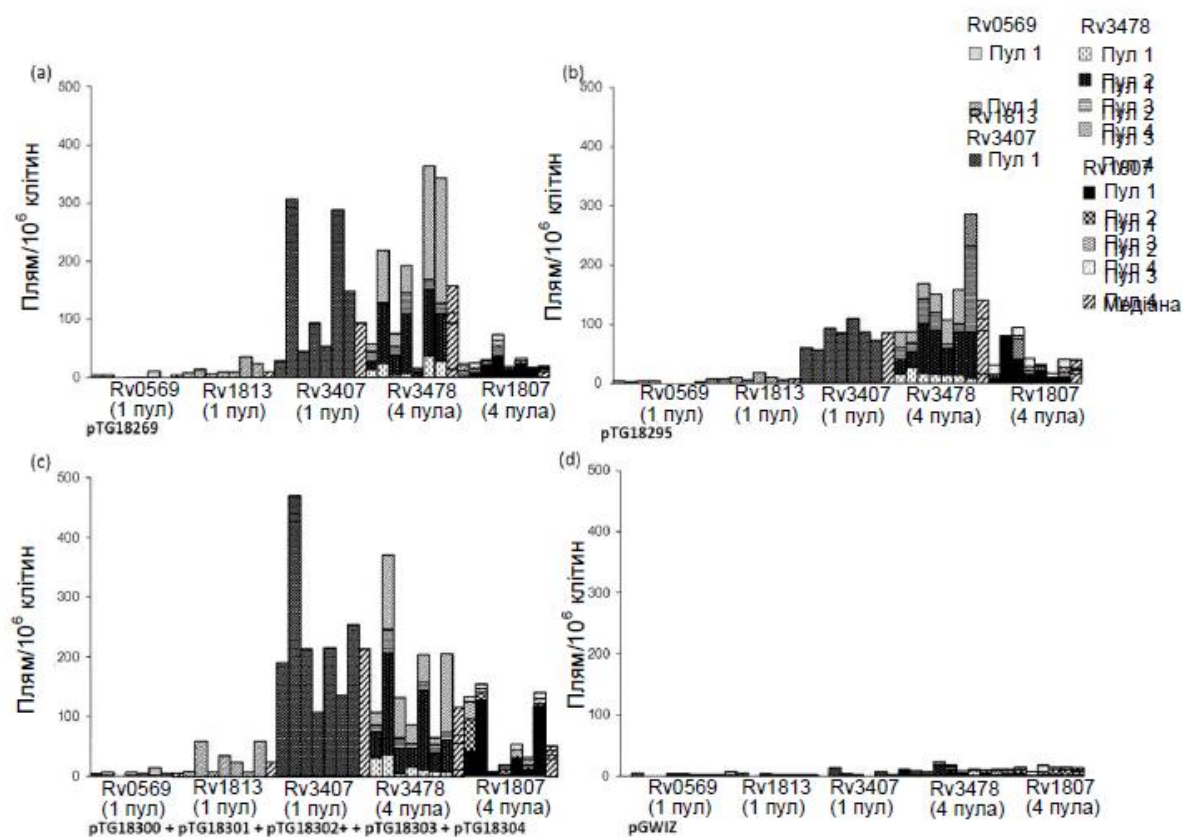
Фіг. 7А



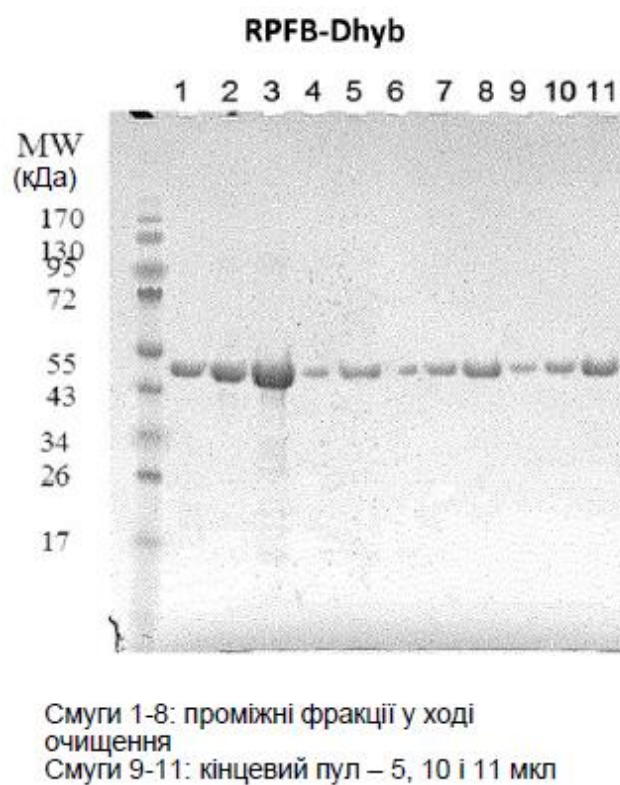
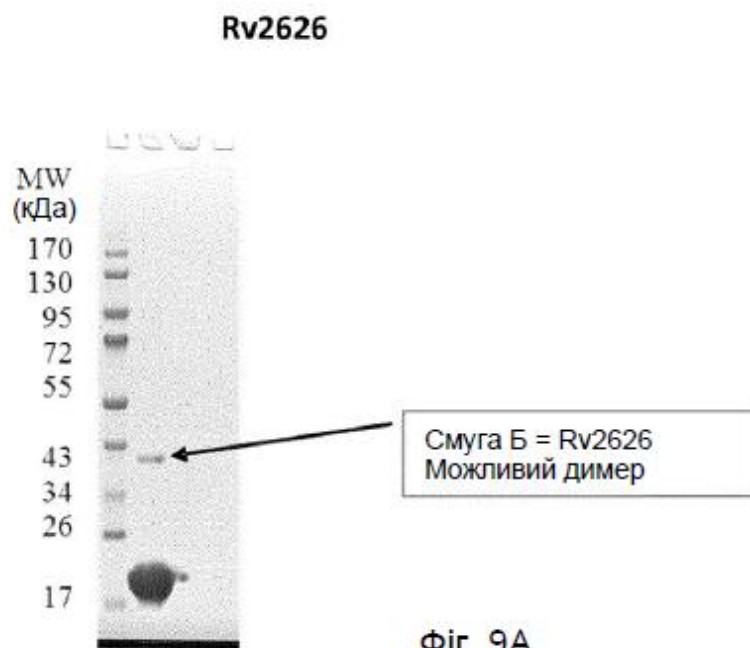
Фіг. 7В



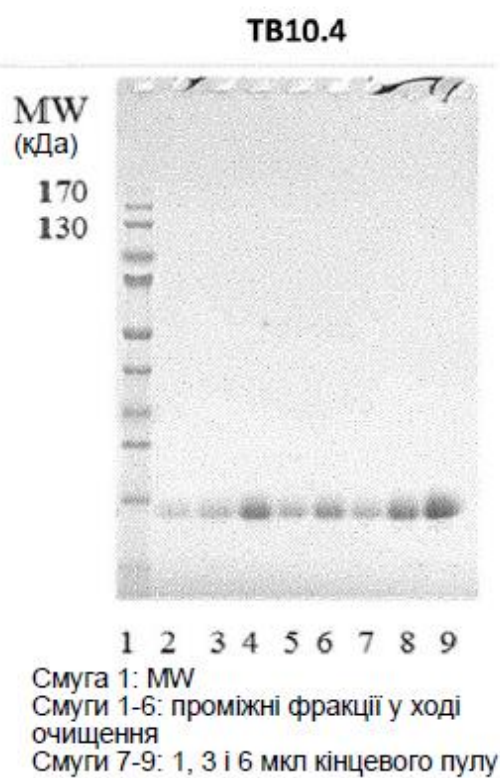
Фіг. 7С



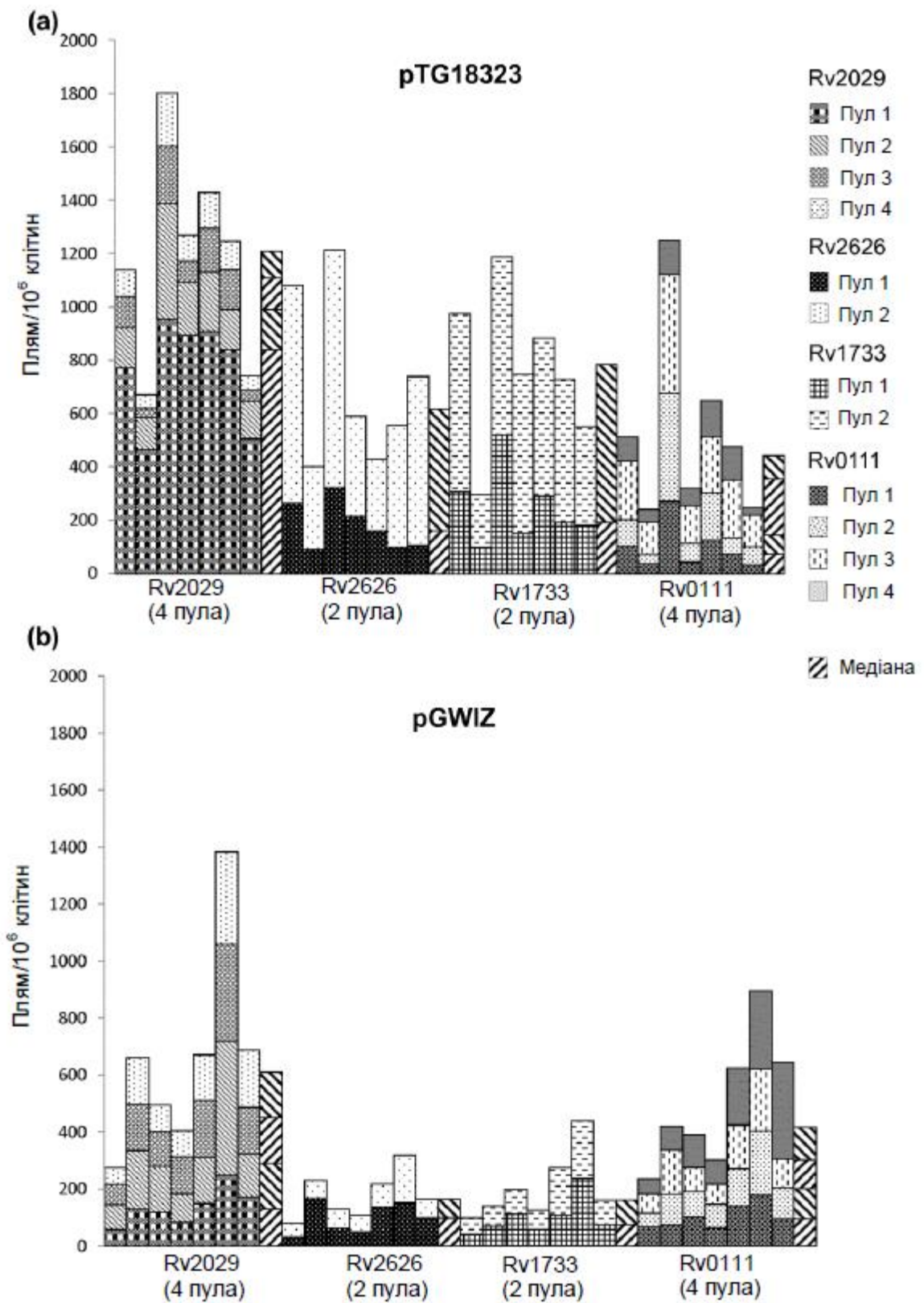
Фіг. 8



Фіг. 9В

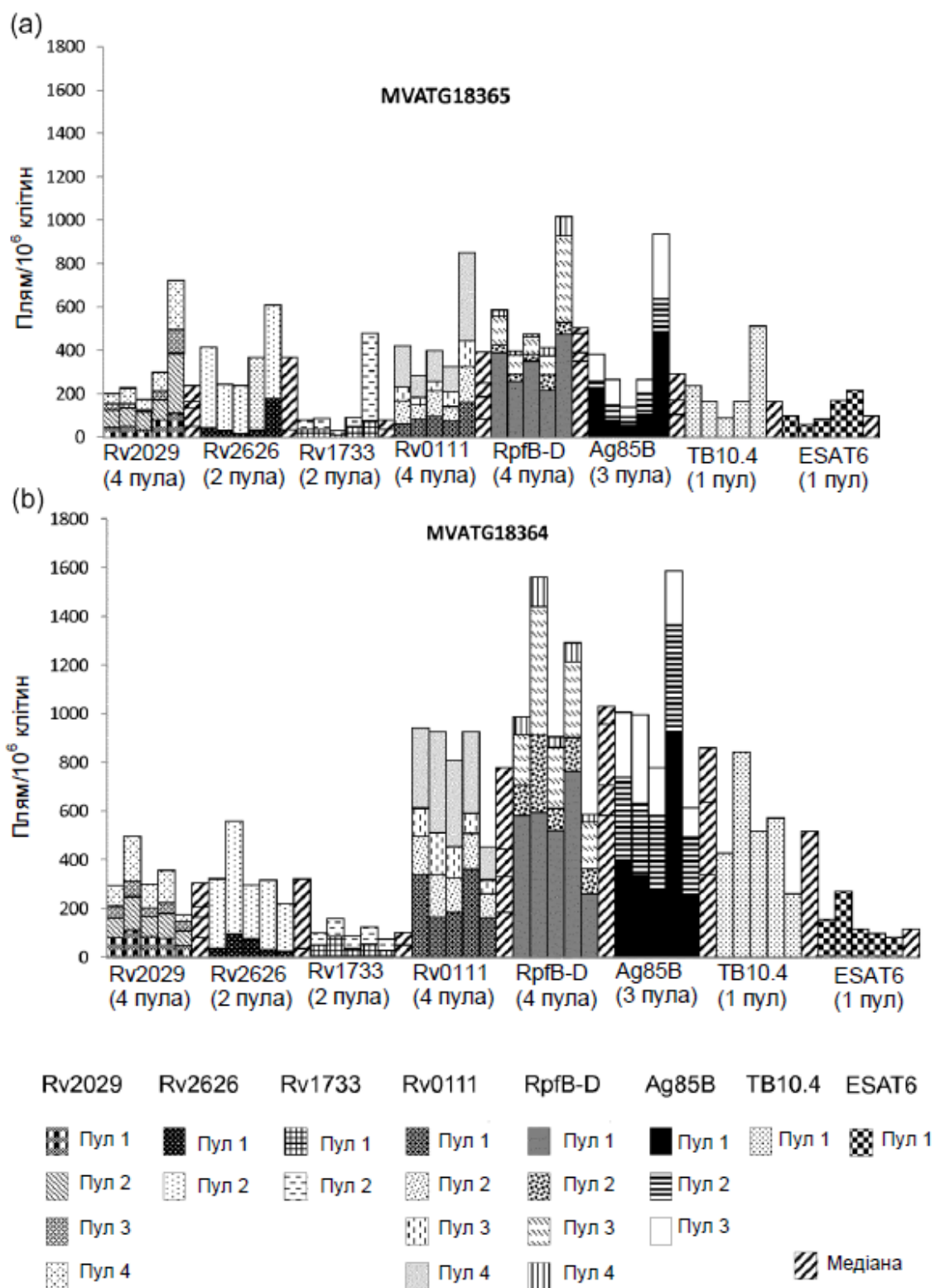


Фіг. 9С



Фіг. 10





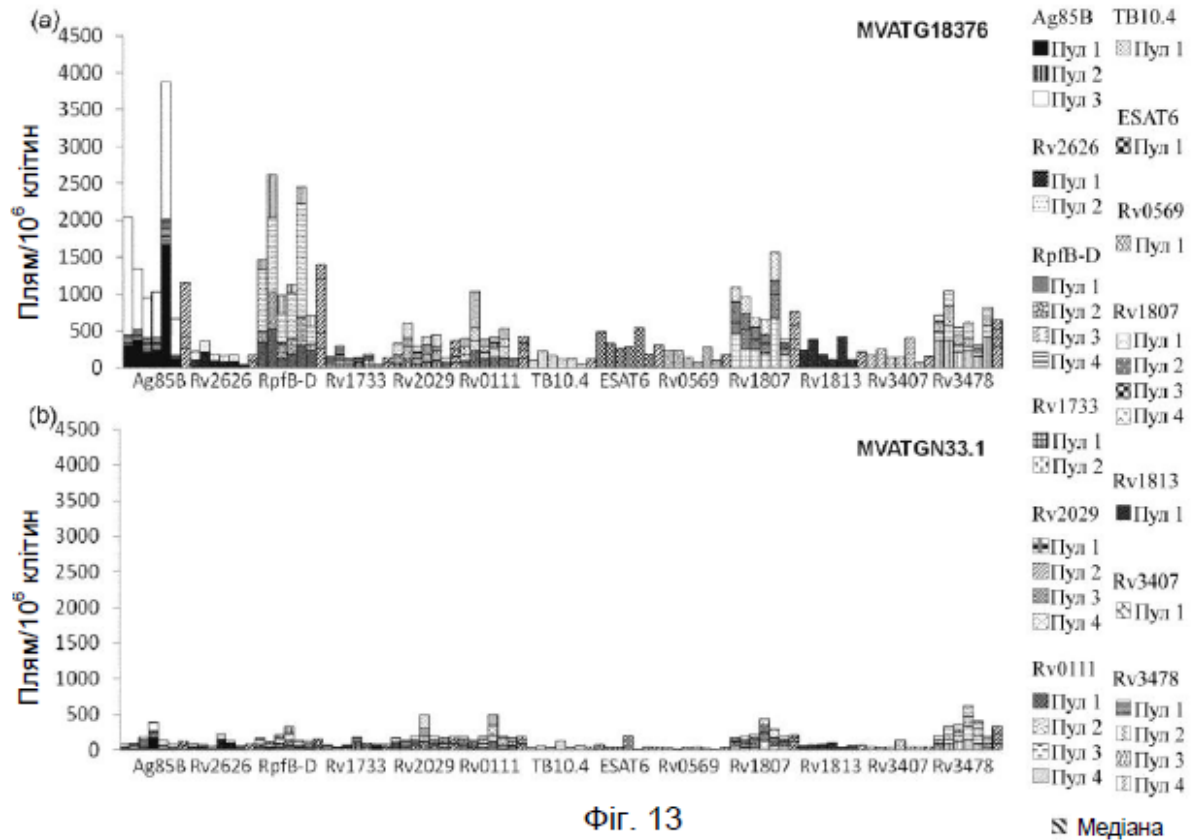
Фіг. 11

-	Медіана < поріг відсікання
+	$x_1 < \text{медіана} < x_2$ поріг відсікання
++	$x_2 < \text{медіана} < x_3$ поріг відсікання
+++	медіана > $x_3$ поріг відсікання

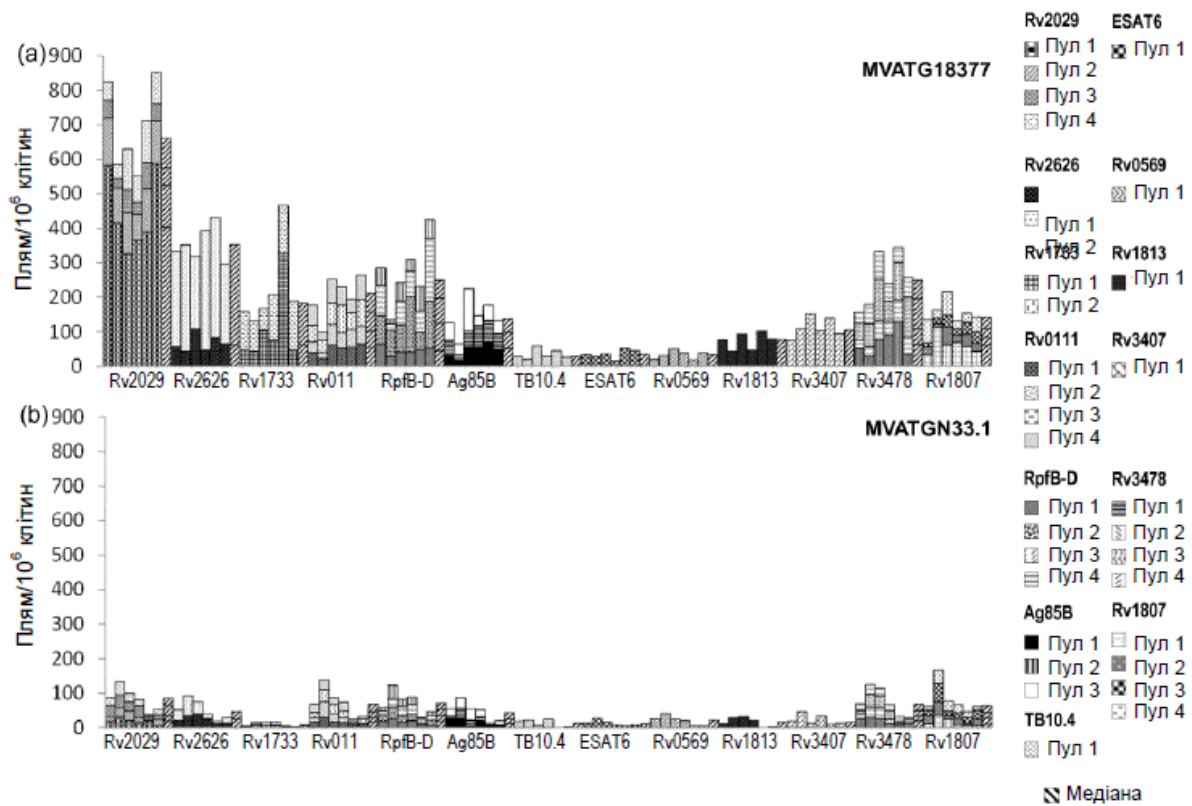
		Латентна								Пов'язування	Активна			
Вакцина		Rv1733	Rv2029	Rv2626	Rv0111	Rv0569	Rv1807	Rv1813	Rv3407	RpfB-D hyb	Rv3478	Ag85B	ESAT6	TB10.4
за фазою ТВ	MVATG18355	-	-	++	-									
	MVATG18364	-	-	++	+++					+++		+++	-	+++
	MVATG18365	-	-	+++	-					+++		-	-	+
	MVATG18377	-	+	++	++	-	+	+	++	+++	+++	++	+	++
	MVATG18379	-	-	++	++	-	-	-	-	+++	+	+	+	++
	MVATG18376	-	-	+	+	-	+	-	+	+++	++	++	+	+++
На основі біохімічних міркувань	MVATG18378	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	+	++	-	+++
	MVATG18404	-	+	+++	++							+++	++	++
	MVATG18417	-	-	+++	+	-	+	-	++	+++	+++	+++	+	+++
	MVATG18418	-	-	+++	+++	-	+	-	+	+++	+	+++	+	+++

Фіг. 12





Фіг. 13



Фіг. 14

-	Медіана < поріг відсікання
+	x1 < медіана < x2 поріг відсікання
++	x2 < медіана < x3 поріг відсікання
+++	медіана > x3 поріг відсікання

		Латентна								Показавлення	Активна			
Вакцина		Rv1733	Rv2029	Rv2626	Rv0111	Rv0569	Rv1807	Rv1813	Rv3407	RpfB-D hyb	Rv3478	Ag85B	ESAT6	TB10.4
HLA-A2	MVATG18376	-	-	-	-	+	+	+	+	+++	+	+++	+	-
	MVATG18378	-	-	-	+	+	+	++	-	+++	+	+++	+++	+
C57BL/6	MVATG18377	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	++	+++	+	-
	MVATG18379	-	-	-	-	+	++	-	-	++	+	+++	++	+
C3H/HeN	MVATG18376	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MVATG18378	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MVATG18377	+	+++	+++	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	MVATG18379	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Фіг. 15

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601