



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **110103**

(13) **C2**

(51) МПК

**A61K 39/04** (2006.01)

**A61P 31/06** (2006.01)

**C07K 14/35** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

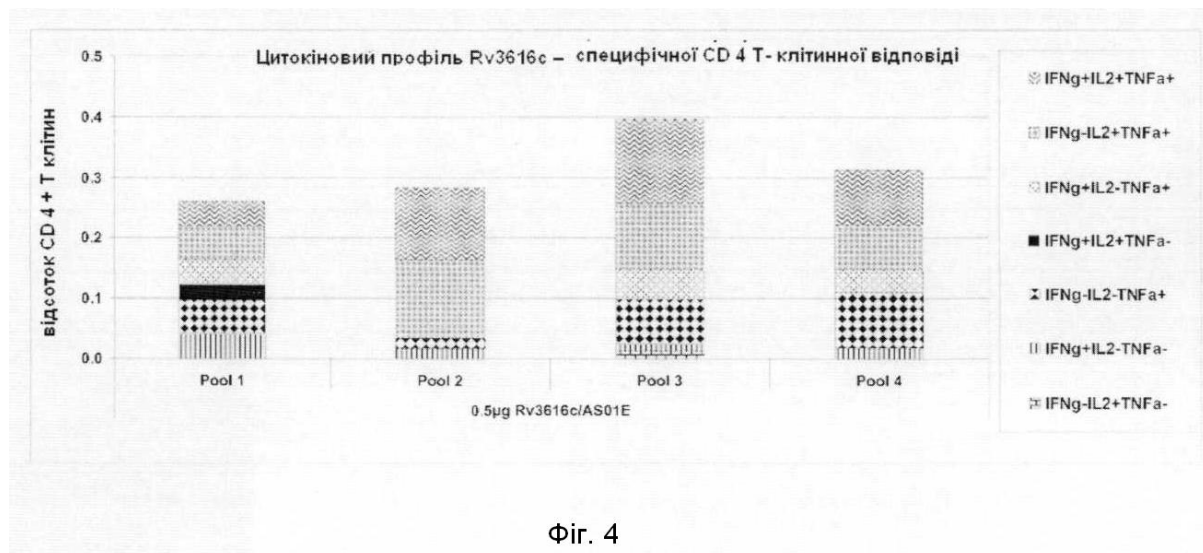
<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2012 09252</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Блейс Норманд (CA), Браун Джеймс (US), Гелінас Анн-Марі (CA), Меттенс Паскаль (BE), Мюрфі Денніс (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>27.01.2011</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium (BE), ГЛАКСО ГРУП ЛІМІТЕД, Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN, United Kingdom (GB)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.11.2015</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	<b>61/298,710</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2010/010177 A1, 28.01.2010 &amp; UA 201100363, пріоритет 25.07.2008 WO 2008/007942 A1, 17.01.2008 US 2004/197896 A1, 07.10.2004</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	<b>27.01.2010</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>26.11.2012, Бюл.№ 22</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.11.2015, Бюл.№ 22</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>РСТ/EP2011/051158, 27.01.2011</b>		

**(54) МОДИФІКОВАНИЙ ТУБЕРКУЛЬОЗНИЙ АНТИГЕН**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується модифікованих білків Rv3616с та їх застосування як лікарських засобів, особливо для запобігання та лікування туберкульозу.

UA 110103 C2



Заявлений винахід стосується модифікованих білків *Mycobacterium tuberculosis* Rv3616c, асоційованих полінуклеотидів та застосування таких білків та полінуклеотидів у лікуванні або у попередженні туберкульозу, зокрема застосування у лікуванні або у попередженні латентного туберкульозу та у попередженні або для затримки реактивування туберкульозу. Туберкульоз (ТВ) є хронічним інфекційним захворюванням, спричиненим інфекцією з *Mycobacterium tuberculosis* та іншими видами *Mycobacterium*. Туберкульоз є основним захворюванням у країнах, що розвиваються та являє собою зростаючу проблему у розвинених регіонах світу. Вважається, що більш ніж 2 млрд. людей у світі інфіковано бацилами туберкульозу, щороку виникають біля 9.2 млн. нових випадків цієї хвороби та 1.7 млн. випадків смерті через туберкульоз. Активна форма туберкульозу розвивається у 10 % інфікованих бацилами ТВ людей та кожна особа з активною формою ТВ інфікує в середньому 10-15 інших осіб протягом року. У той час, як щорічна захворюваність досягла свого піку в глобальному масштабі, число смертей та випадків хвороби, як і раніше, зростає через зростання населення (World Health Organisation Tuberculosis Facts 2008). Інфекція *Mycobacterium tuberculosis* передається дихальним шляхом. Альвеолярні макрофаги поглинають бактерію, але вона здатна вижити та розмножитися інгібуванням злиття фагосоми з кислими лізосомами. Комплексна імунна відповідь, що виникає за участю CD4+ та CD8+T клітин, в кінцевому рахунку, веде до утворення гранульоми. Головним фактором успіху *Mycobacterium tuberculosis* як патогена, є те, що ізольована, але не знищена бактерія може зберігатися протягом тривалого періоду, що робить пацієнтів уразливими для подальшого розвитку активного туберкульозу.

У перші декілька років після інфікування, активний туберкульоз розвивається у менш, ніж 5 % інфікованих осіб. Гранульоми можуть зберігатися протягом десятиліть, та, як вважають, містять живі *Mycobacterium tuberculosis* у стані спокою, позбавленому кисню, поживних речовин тощо. Однак, нещодавно було висловлено припущення, що більшість бактерій у стані спокою локалізовано у немакрофагових типах клітин, що поширюються по всьому тілу (Locht et al, Expert Opin. Biol. Ther. 2007 7(11):1665-1677). Розвиток активного ТВ виникає, коли змінюється баланс між природним імунітетом хазяя та патогеном, наприклад, у результаті імуносупресивної події (Anderson P Trends in Microbiology 2007 15(1):7-13; Ehlers S Infection 2009 37(2):87-95).

Також запропоновано динамічну гіпотезу, що описує баланс між латентним та активним ТВ (Cardana P-J Inflammation & Allergy – Drug Targets 2006 6:27-39; Cardana P-J Infection 2009 37(2):80-86).

Хоча, протягом значного періоду часу реакція може бути безсимптомною, активне захворювання найбільш часто проявляється у вигляді гострого запалення легенів, що веде до втоми, втрати ваги, лихоманці та постійного кашлю. При відсутності лікування, це звичайно веде до серйозних ускладнень та смерті.

Звичайно, туберкульоз можна контролювати з застосуванням тривалої антибіотичної терапії, хоча такого лікування буде недостатньо для запобігання поширення захворювання. Активно інфіковані особи можуть деякий час не мати симптомів, але бути заразними. Додатково, хоча дотримання режиму лікування є критичним, поведінку пацієнта дуже важко контролювати. Деякі пацієнти не проходять до кінця курс лікування, що може привести до безуспішності лікування та розвитку стійкості до ліків. Стійкій до багатьох ліків туберкульоз (MDR-TB) є формою, на яку не в змозі дати відповідь препарати першої лінії. MDR-TB складає 5 % всіх випадків на туберкульоз та, за оцінками, щороку трапляється 490,000 нових випадків на MDR-TB. Туберкульоз з широкою лікарською стійкістю (XDR-TB) виникає на піці MDR-TB при розвитку стійкості до препаратів другої лінії. За оцінками, щороку трапляється 40,000 нових випадків на XDR-TB, що практично не піддаються лікуванню (World Health Organisation Tuberculosis Facts 2008). Навіть при закінченні повного антибіотичного курсу лікування у інфікованого пацієнта, інфекція *M. tuberculosis* може бути до кінця не винищеною та може зберігатися у якості латентної інфекції, що може бути реактивованою.

Для контролю поширення туберкульозу, величезне значення мають ефективна програма вакцинації та точна рання діагностика захворювання. На даний час, найбільш широко застосованим способом отримання захисного імунітету є вакцинація живою бактерією. Найбільш поширеною бактерією роду *Mycobacterium*, що застосовують з цією метою, є *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), авірулентний штам *M. Bovis*, що був вперше розроблений ще понад 60 років тому. Однак, безпечність та ефективність BCG є джерелом суперечок - в той час, як він захищає проти тяжких проявів захворювання у дітей, він не запобігає утворенню латентного ТВ або реактивуванню хвороби легень у дорослих. Крім того, деякі країни, як то Сполучені Штати, не вакцинують населення цим агентом. Майже все нові покоління туберкульозних вакцин, що на даний час знаходяться в стадії клінічної розробки, створюють у вигляді вакцин попереднього впливу. Вони охоплюють субодиничні вакцини, що особливо ефективні для індукування

підвищеного імунітету перед вакцинацією BCG та розвинуті живі мікобактеріальні вакцини, що спрямовані замінити BCG більш ефективними та /або безпечними штамми. Хоча метою цих вакцин є підвищення стійкості до інфекції, вони, ймовірно, будуть менш ефективними у якості вакцин попереднього впливу або терапевтичних вакцин у випадках латентного TB (Lin MY et al

Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets 2008 8:15-29).  
 Приклад 2 у US20080269151 стосується клонування, отримання та експресії деяких модифікованих білків Rv3616с, в тому числі: ΔTM-1, поліпептиду Rv3616с, з делецією залишків 150-160 (SEQ ID No: 22 у US20080269151); ΔTM-2, поліпептиду Rv3616с, з делецією залишків 101-203 (SEQ ID No: 24 у US20080269151); та послідовності, де залишки Rv3616с 150-160

заміщені антигеном TbH9 (SEQ ID No: 60 у US20080269151).  
 Заявлений винахід головним чином стосується застосування модифікованих поліпептидів Rv3616с або полінуклеотиду, що їх кодує, у галузі дослідження латентних мікобактеріальних інфекцій. Крім того, заявлений винахід стосується окремих модифікованих білків Rv3616с. Винахідники несподівано відкрили, що порушення гідрофобності окремого регіону послідовності Rv3616с може привести до підвищеної експресії без негативного впливу на імунігенні властивості. Модифіковані білки Rv3616с застосовують у якості TB антигенів, зокрема, антигенів латентного TB.

У самому широкому аспекті, заявлений винахід стосується модифікованого білка Rv3616с, де порушена гідрофобність амінокислотних залишків, що відповідають залишкам 134-183 послідовності H37Rv, відповідно, модифікованого білка Rv3616с, де порушена гідрофобність амінокислотних залишків, що відповідають залишкам 135-154 послідовності H37Rv.

У одному аспекті винаходу, передбачено модифікований білок Rv3616с, де вищезгаданий модифікований білок Rv3616с містить перший поліпептид та другий поліпептид, де перший поліпептид розміщений по напрямку до С-кінця модифікованого білку Rv3616с відносно другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо або безпосередньо зв'язаними.

У другому аспекті винаходу передбачено модифікований білок Rv3616с, де вищезгаданий модифікований білок Rv3616с містить перший та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до С-кінця модифікованого білку Rv3616с відносно до другого поліпептиду та де:

(i) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 155 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо або безпосередньо зв'язаними.

У третьому аспекті винаходу передбачено модифікований білок Rv3616с, вищезгаданий білок, що містить, або, альтернативно, головним чином складається або складається з послідовності Rv3616с, у якій принаймні одна амінокислота (наприклад, принаймні дві) видалена з регіону, що відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1.

Четвертий аспект винаходу передбачає модифікований білок Rv3616с, вищезгаданий білок, що містить перший поліпептид та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 155 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид та вказаний третій поліпептид відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1, де видалена принаймні одна амінокислота (наприклад, принаймні дві).

П'ятий аспект винаходу передбачає модифіковані білки Rv3616с, що містять перший та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-134 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 175 амінокислот у межах залишків 155-392 SEQ ID No:1;



де перший та другий поліпептиди є або безпосередньо зв'язаними між собою або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, де вказаний третій поліпептид відповідає залишкам 135-154 у SEQ ID No:1, де видалена принаймні одна амінокислота (наприклад, принаймні дві).

5 Шостий аспект винаходу передбачає модифікований білок Rv3616с, де вказаний білок містить перший та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та де:

(i) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

10 (ii) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо зв'язаними між собою або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, де вказаний третій поліпептид має принаймні 90 % тотожності до послідовності, відповідній залишкам 134-183 у SEQ ID No:1, де видалена суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти).

Сьомий аспект винаходу передбачає модифіковані білки Rv3616с, що містять перший та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

20 (i) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-134 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 155-392 SEQ ID No:1;

25 де перший та другий поліпептиди або безпосередньо зв'язаними між собою або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид та вказаний третій поліпептид має принаймні 80 % тотожності до послідовності, відповідній залишкам 135-154 у SEQ ID No:1, де видалена суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти).

30 Восьмим аспектом винаходу передбачено модифікований білок Rv3616с, де вказаний білок містить послідовність Rv3616с, де суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти) з регіону, відповідному залишкам 134-183 у SEQ ID No:1 заміщена гідрофільними залишками.

35 Модифіковані білки Rv3616с можуть бути на основі послідовності білку дикого типу Rv3616с будь-якого штаму *M. Tuberculosis*, наприклад, будь-яку з послідовностей SEQ ID Nos: 3-7, зокрема, будь-яку з послідовностей SEQ ID Nos: 3-6, можна застосувати замість SEQ ID No:1 у попередніх втіленнях. Зразковими модифікованими білками Rv3616с, відповідно до заявленого винаходу є такі білки, що містять амінокислотні послідовності, наведені, як SEQ ID Nos: 161-169, 179 та 180 (наприклад, що складаються з амінокислотних послідовностей, вказаних, як SEQ ID Nos: 161-169, 179 та 180). Особливий інтерес викликають білки, що містять амінокислотні послідовності, вказані, як SEQ ID Nos: 161, 163-169, 179 та 180 (наприклад, що складаються з амінокислотних послідовностей, вказаних, як SEQ ID Nos: 161, 163-169, 179 та 180). Також передбачено модифіковані білки Rv3616с для застосування в якості лікарських засобів.

40 Подальший аспект винаходу стосується способу індукування імунної відповіді у суб'єкті, що полягає у введенні модифікованого білку Rv3616с.

45 Подальший аспект винаходу стосується способу лікування, поліпшення стану або запобігання ТБ, що полягає у введенні суб'єкту у разі потреби ефективної кількості модифікованого білку Rv3616с, де вищезгаданий поліпептид викликає імунну відповідь. У іншому аспекті, спосіб додатково полягає у викликанні імунної відповіді проти *Mycobacterium tuberculosis*.

50 Застосування модифікованого білку Rv3616с у виробництві лікарського засобу для лікування, поліпшення стану або запобігання ТБ, являє собою інший аспект винаходу.

55 Заявлений винахід стосується полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с. Зразковими полінуклеотидами, що містять послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с є ті, що містять нуклеотидні послідовності, що відповідають SEQ ID Nos: 170-178, як то ті, що складаються з нуклеотидних послідовностей, що відповідають SEQ ID Nos: 170-178. Іншими типовими полінуклеотидами, що містять послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують модифіковані білки Rv3616с є ті, що містять (наприклад, складаються з) нуклеотидні послідовності, що кодують амінокислотні послідовності, що надані у SEQ ID Nos: 161-169, 179 або 180, як то SEQ ID Nos: 161, 163-169, 179 або 180.

Також передбачено полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с для застосування у якості лікарського засобу.

5 Подальший аспект винаходу стосується способу, що викликає у суб'єкта імунну відповідь та полягає у введенні полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с.

10 Подальший аспект винаходу стосується способу лікування, поліпшення стану, затримування або попередження реактивування туберкульозу, що полягає у введенні суб'єкту у разі потреби ефективною кількістю полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с, де вищезгаданий поліпептид викликає імунну відповідь. У іншому аспекті, спосіб додатково полягає у викликанні імунної відповіді проти *Mycobacterium tuberculosis*.

Застосування полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, що містить модифікований білок Rv3616с у виробництві лікарського засобу для лікування, поліпшення стану або запобігання ТВ, являє собою інший аспект винаходу.

15 Крім того, передбачено фармацевтичну композицію, що містить:

(a) модифікований білок Rv3616с; або

(b) полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с; та

(c) фармацевтично прийнятний носій або наповнювач.

20 Передбачено імуногенну композицію, що містить:

(a) модифікований білок Rv3616с; або

(b) полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с; та

(c) підсилювач неспецифічної імунної відповіді.

25 Також, передбачено вектор експресії, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с.

Наступним аспектом винаходу є клітина-хазяїн, трансформована вищезгаданим вектором експресії. Крім того, передбачено клітину - хазяїна, що рекомбінантно експресує модифікований білок Rv3616с. Далі, передбачено спосіб отримання модифікованого білку Rv3616с, де вищезгаданий спосіб полягає у застосуванні стадії рекомбінантної експресії вказаного поліпептиду у клітині - хазяїні.

Також передбачено діагностичні набори, що містять:

(a) модифікований білок Rv3616с;

35 (b) обладнання, необхідне для контакту вказаного модифікованого білку Rv3616с зі зразком (наприклад, цільної крові або більш прийнятних МКПК (мононуклеарних клітин периферичної крові)) суб'єкта; та

(c) засоби для кількісного аналізу Т - клітинної відповіді зразка.

Інший аспект винаходу стосується діагностичного набору, що містить:

(a) модифікований білок Rv3616с; та

40 (b) обладнання, необхідне для контакту вказаного модифікованого білку Rv3616с з клітинами шкіри пацієнта.

Подальший аспект винаходу стосується способу визначення інфекції *Mycobacterium tuberculosis* у суб'єкті, що полягає у:

(a) контакті зразка з вищезгаданим суб'єктом з модифікованим білком Rv3616с; та

45 (b) визначення у біологічному зразку присутності антитіл, що зв'язуються з модифікованим білком Rv3616с.

Винаходом також передбачено діагностичний набір, що містить:

(a) модифікований білок Rv3616с, що вибірково іммобілізований на твердій поверхні; та (b) реагент для виявлення.

50 У одному втіленні, суб'єкт отримання модифікованого білку Rv3616с, полінуклеотиду або композиції відповідно до винаходу може мати активну форму туберкульозу (наприклад, активну інфекцію *M. tuberculosis*). У другому втіленні, суб'єкт може мати латентний туберкульоз (наприклад, дрімаючу інфекцію *M. tuberculosis*). У третьому втіленні, суб'єкт може бути вільним від туберкульозу (наприклад, не мати інфекцію *M. tuberculosis*). Суб'єкт отримання модифікованого білку Rv3616с, полінуклеотиду або композиції відповідно до винаходу може попередньо бути вакцинованим проти туберкульозу (наприклад, вакцинованим проти інфекції *M. tuberculosis*), наприклад, може бути вакцинованим *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). Альтернативно, суб'єкт отримання поліпептиду, полінуклеотиду або композиції винаходу може не бути попередньо вакцинованим проти туберкульозу (наприклад, може не бути вакцинованим проти інфекції *M. tuberculosis*), як то, може не бути вакцинованим *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG).

Модифікований білок Rv3616с, полінуклеотид або композиція відповідно до винаходу можуть бути надані з метою:

- лікування активного туберкульозу;
- запобігання активного туберкульозу (як то введенням неінфікованому суб'єкту або, альтернативно, суб'єкту, що має латентну інфекцію);
- лікування латентного туберкульозу;
- запобігання латентного туберкульозу; або запобігання або затримування реактивування туберкульозу (особливо, затримування реактивування туберкульозу, наприклад, на кілька місяців, років або навіть на невизначений строк).

Також передбачено спосіб лікування латентного туберкульозу, що полягає у застосуванні етапів:

- (i) ідентифікування суб'єкта на наявність латентної туберкульозної інфекції (наприклад, за допомогою PPD або аналізів з Т - клітинами); та
- (ii) введення вищезгаданому суб'єкту безпечної та ефективної кількості модифікованого білку Rv3616с або полінуклеотиду, що кодує модифікований білок Rv3616с (як то, у вигляді фармацевтичної або імуногенної композиції).

Також запропоновано застосування поліпептиду заявленого винаходу у виробництві діагностичного набору для ідентифікації туберкульозу (наприклад, латентного туберкульозу) у піддослідного суб'єкта.

Опис фігур

Фіг. 1: Вирівнювання пептиду Rv3616с штаму повнорозмірною послідовністю.

Фіг. 2: МКПК, відповідні пептидам Rv3616с.

Фіг. 3: Відсоток CD4 та CD8 клітин від імунізованих мишей CB6F1, що експресують гамма - інтерферон та/або інтерлейкін - 2 (IL-2) та/або TNF - альфа цитокіни на 21 день (тобто, через 7 днів після другої імунізації).

Фіг. 4: Цитокіновий профіль на 21 день (тобто, через 7 днів після другої імунізації) відповіді антиген - специфічних клітин CD4 у імунізованих мишей CB6F1.

Фіг. 5: Цитокіновий профіль на 21 день (тобто, через 7 днів після другої імунізації) відповіді антиген - специфічних клітин CD8 у імунізованих мишей CB6F1.

Фіг. 6: Відсоток клітин CD4 та CD8 від імунізованих мишей CB6F1, що експресують гамма-інтерферон та/або IL-2 та/або TNF- альфа цитокіни на 35 день (тобто, через 7 днів після третьої імунізації).

Фіг. 7: Цитокіновий профіль на 35 день (тобто, через 7 днів після третьої імунізації) відповіді антиген - специфічних клітин CD4 у імунізованих мишей CB6F1.

Фіг. 8 Цитокіновий профіль на 35 день (тобто, через 7 днів після третьої імунізації) відповіді антиген - специфічних клітин CD8 у імунізованих мишей CB6F1.

Фіг. 9: Відсоток клітин CD4 та CD8 від імунізованих мишей C57BL/6, що експресують гамма-інтерферон та/або IL-2 та/або TNF- альфа цитокіни на 21 день (тобто, через 7 днів після другої імунізації).

Фіг. 10: Цитокіновий профіль на 21 день (тобто, через 7 днів після другої імунізації) відповіді антиген - специфічних клітин CD4 у імунізованих мишей C57BL/6.

Фіг. 11: Відсоток клітин CD4 та CD8 від імунізованих мишей C57BL/6, що експресують гамма-інтерферон та/або IL-2 та/або TNF- альфа цитокіни на 35 день (тобто, через 7 днів після третьої імунізації).

Фіг. 12: Цитокіновий профіль на 35 день (тобто, через 7 днів після третьої імунізації) відповіді антиген - специфічних клітин CD4 у імунізованих мишей C57BL/6.

Фіг. 13: Цитокіновий профіль на 35 день (тобто, через 7 днів після третьої імунізації) відповіді антиген - специфічних клітин CD8 у імунізованих мишей C57BL/6.

Фіг. 14: Т- клітинні відповіді антиген - специфічних клітин CD4 у інтактних (без імуносупресивного лікування) та латентно інфікованих людей.

Фіг. 15: Вирівнювання послідовностей білку дикого типу Rv3616с.

Фіг. 16A та 16B: Вирівнювання типових послідовностей модифікованого білку Rv3616с.

Фіг. 17: Результати перших експериментів по експресії антигену, отримані за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE).

Фіг. 18: Результати подальших експериментів по експресії антигену, отримані за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE).

Фіг. 19: Результати додаткових експериментів по експресії антигену, отримані за

допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE).

Фіг. 20: Відсоток CD4 клітин від імунізованих мишей, що експресують гамма-інтерферон та/або IL-2 та/або TNF- альфа цитокіни через 7 днів після

5 другої та через 7 днів після третьої імунізації з Rv3616Δ138-145.

Фіг. 21: Цитокиновий профіль Rv3616 специфічної CD4 T - клітинної відповіді через 7 днів після другої імунізації з Rv3616Δ138-145.

Фіг. 22: Цитокиновий профіль Rv3616 специфічної CD4 T - клітинної відповіді через 7 днів після третьої імунізації з Rv3616Δ138-145.

10 Фіг. 23: Відсоток клітин CD8 від імунізованих мишей, що експресують гамма-інтерферон та/або IL-2 та/або TNF- альфа цитокіни через 7 днів після другої та через 7 днів після третьої імунізації з Rv3616Δ138-145.

Фіг. 24: Цитокиновий профіль Rv3616 специфічної CD8 T - клітинної відповіді через 7 днів після другої імунізації з Rv3616Δ138-145.

15 Фіг. 25: Цитокиновий профіль Rv3616 специфічної CD8 T - клітинної відповіді через 7 днів після третьої імунізації з Rv3616Δ138-145.

Опис перелічених послідовностей.

SEQ ID No:1: поліпептидна послідовність Rv3616с штаму H37Rv *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 2: поліпептидна послідовність Rv3616с штаму H37Rv *M. tuberculosis*. SEQ ID

20 No: 3: поліпептидна послідовність Rv3616с штаму CDC1551 *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 4: поліпептидна послідовність Rv3616с штаму F11 *M. tuberculosis*.

SEQ ID No:5: поліпептидна послідовність Rv3616с штаму Haarlem A *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 6: поліпептидна послідовність Rv3616с штаму C *M. tuberculosis*.

SEQ ID No: 7: поліпептидна послідовність Rv3616с BCG.

25 SEQ ID No: 8: поліпептидна послідовність Mtb8.4.

SEQ ID No: 9: поліпептидна послідовність Mtb9.8.

SEQ ID No:10: поліпептидна послідовність Mtb9.9.

SEQ ID No:11: поліпептидна послідовність Ra12.

SEQ ID No:12: поліпептидна послідовність Ra35.

30 SEQ ID No:13: поліпептидна послідовність TbH9.

SEQ ID No:14: поліпептидна послідовність Mtb41.

SEQ ID No:15: поліпептидна послідовність ESAT-6.

SEQ ID No:16: поліпептидна послідовність Ag85A.

SEQ ID No:17: поліпептидна послідовність Ag85B.

35 SEQ ID No:18: поліпептидна послідовність альфа - кристаліну.

SEQ ID No:19: поліпептидна послідовність MPT64.

SEQ ID No: 20: поліпептидна послідовність Mtb32A.

SEQ ID No: 21: поліпептидна послідовність Ser/Ala мутованих зрілих Mtb32A.

SEQ ID No: 22: поліпептидна послідовність TB10.4.

40 SEQ ID No: 23: поліпептидна послідовність Mtb72f.

SEQ ID No: 24: поліпептидна послідовність M72.

SEQ ID No: 25: поліпептидна послідовність Mtb71f.

SEQ ID No: 26: поліпептидна послідовність гібриду (злиття) M92.

SEQ ID No: 27: поліпептидна послідовність гібриду M103.

45 SEQ ID No: 28: поліпептидна послідовність гібриду M114.

SEQ ID No: 29: передбачуваний епітоп 1 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 30: передбачуваний епітоп 2 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 31: передбачуваний епітоп 3 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 32: передбачуваний епітоп 4 клітин людини CD4.

50 SEQ ID No: 33: передбачуваний епітоп 5 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 34: передбачуваний епітоп 6 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 35: передбачуваний епітоп 7 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 36: передбачуваний епітоп 8 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 37: передбачуваний епітоп 9 клітин людини CD4.

55 SEQ ID No: 38: передбачуваний епітоп 10 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 39: передбачуваний епітоп 11 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 40: передбачуваний епітоп 12 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 41: передбачуваний епітоп 13 клітин людини CD4.

SEQ ID No: 42: передбачуваний епітоп 14 клітин людини CD4.

60 SEQ ID No: 43: передбачуваний епітоп 15 клітин людини CD4.

[illegible]

	SEQ ID No:104: передбачуваний епітоп 57 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:105: передбачуваний епітоп 58 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:106: передбачуваний епітоп 59 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:107: передбачуваний епітоп 60 клітин людини CD8.
5	SEQ ID No:108: передбачуваний епітоп 61 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:109: передбачуваний епітоп 62 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:110: передбачуваний епітоп 63 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:111: передбачуваний епітоп 64 клітин людини CD8.
10	SEQ ID No:112: передбачуваний епітоп 65 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:113: передбачуваний епітоп 66 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:114: передбачуваний епітоп 67 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:115: передбачуваний епітоп 68 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:116: передбачуваний епітоп 69 клітин людини CD8.
15	SEQ ID No:117: передбачуваний епітоп 70 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:118: передбачуваний епітоп 71 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:119: передбачуваний епітоп 72 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:120: передбачуваний епітоп 73 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:121: передбачуваний епітоп 74 клітин людини CD8.
20	SEQ ID No:122: передбачуваний епітоп 75 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:123: передбачуваний епітоп 76 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:124: передбачуваний епітоп 77 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:125: передбачуваний епітоп 78 клітин людини CD8.
	SEQ ID No:126: передбачуваний епітоп 79 клітин людини CD8.
25	SEQ ID No:127: пептид 1.
	SEQ ID No:128: пептид 2.
	SEQ ID No:129: пептид 3.
	SEQ ID No:130: пептид 4.
	SEQ ID No:131: пептид 5.
30	SEQ ID No:132: пептид 6.
	SEQ ID No:133: пептид 7.
	SEQ ID No:134: пептид 8.
	SEQ ID No:135: пептид 9.
	SEQ ID No:136: пептид 10.
	SEQ ID No:137: пептид 11.
35	SEQ ID No:138: пептид 12.
	SEQ ID No:139: пептид 13.
	SEQ ID No:140: пептид 14.
	SEQ ID No:141: пептид 15.
40	SEQ ID No:142: пептид 16.
	SEQ ID No:143: пептид 17.
	SEQ ID No:144: пептид 18.
	SEQ ID No:145: пептид 19.
	SEQ ID No:146: пептид 20.
45	SEQ ID No:147: пептид 21.
	SEQ ID No:148: пептид 22.
	SEQ ID No:149: пептид 23.
	SEQ ID No:150: пептид 24.
	SEQ ID No:151: пептид 25.
50	SEQ ID No:152: пептид 26.
	SEQ ID No:153: пептид 27.
	SEQ ID No:154: пептид 28.
	SEQ ID No:155: пептид 29.
	SEQ ID No:156: пептид 30.
55	SEQ ID No:157: поліпептидна послідовність Rv1753с штаму H37Rv M.tuberculosis
	SEQ ID No:158: поліпептидна послідовність Rv2386с штаму H37Rv M. tuberculosis
	SEQ ID No:159: поліпептидна послідовність Rv2707с штаму H37Rv M. tuberculosis
	SEQ ID No:160: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність для Rv3616с штаму H37Rv M. tuberculosis
60	SEQ ID No:161: поліпептидна послідовність Rv3616сΔ136-183, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:162: поліпептидна послідовність Rv3616cΔ150-160, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:163: поліпептидна послідовність Rv3616cΔ136-154, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

5 SEQ ID No:164: поліпептидна послідовність Rv3616cΔ166-182, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:165: поліпептидна послідовність Rv3616cΔ135-139, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

10 SEQ ID No:166: поліпептидна послідовність Rv3616cΔ142-145, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:167: поліпептидна послідовність Rv3616cΔ138-145, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:168: поліпептидна послідовність Rv3616cΔ145-152, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

15 SEQ ID No:169: поліпептидна послідовність Rv3616cΔ149-154, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:170: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ136-183, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

20 SEQ ID No:171: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ150-160, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:172: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ136-154, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:173: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ166-182, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

25 SEQ ID No:174: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ135-139, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:175: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ142-145, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

30 SEQ ID No:176: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ138-145, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:177: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ145-152, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

SEQ ID No:178: E. coli кодон - оптимізована полінуклеотидна послідовність, що кодує Rv3616cΔ149-154, що походить від штаму H37Rv M. tuberculosis

35 SEQ ID No:179: поліпептидна послідовність модифікованого білку Rv3616c на основі розділення та перебудування навколо залишків 137-139 штаму H37Rv M. tuberculosis, в тому числі делеції Cys138.

SEQ ID No:180: поліпептидна послідовність модифікованого білку Rv3616c на основі розділення та перебудування навколо залишків 152-153 штаму H37Rv M. tuberculosis.

40 Заявлений винахід звичайно стосується застосування модифікованих поліпептидів Rv3616c або полінуклеотидів, що їх кодують, у сфері латентних інфекцій, спричинених мікобактеріями. Крім того, заявлений винахід стосується окремих модифікованих білків Rv3616c. Винахідники несподівано відкрили, що порушення гідрофобності окремого регіону послідовності білка Rv3616c може привести до підвищення експресії без істотного негативного впливу на імунітетні властивості. Модифіковані білки Rv3616c застосовують в якості ТВ антигенів, зокрема в якості антигенів латентного ТВ.

45 Було показано, що деякі з білків, що проявляють сильну експресію протягом ранніх стадій мікобактеріальної інфекції забезпечують сильну захисну ефективність у тваринних моделях вакцинації. Однак, вакцинація з антигенами, що сильно експресуються протягом ранніх стадій може не забезпечити оптимальну імунну відповідь на більш пізніх стадіях інфекції. Адекватний контроль протягом латентної інфекції може потребувати Т - клітин, що експресуються на цих стадіях та специфічні для окремих антигенів. Вакцини попереднього впливу, що безпосередньо спрямовані до стійких у сплячому стані бактерій можуть допомогти у захисті проти реактивування ТВ та тим самим посилити контроль за ТВ або навіть усунути інфекцію. Тому

50 вакцина, що орієнтована до латентного ТВ може суттєво та економічно скоротити глобальні розміри ТВ інфекцій.

55 Субодиночні вакцини на основі антигенів пізньої стадії також можуть бути застосовані у комбінації з антигенами ранньої стадії для отримання мультифазної вакцини. Альтернативно, антигени пізньої стадії можуть бути застосовані для доповнення та поліпшення вакцинації BCG (або за рахунок підвищення відповіді BCG або через розвиток розвинених рекомбінантних

штамів BCG).

В той час, як було показано, що макрофаги діють у якості головних ефektorів імунітету *Mycobacterium*, Т клітини є головними індукторами такого імунітету. Суттєва роль Т - клітин у захисті проти туберкульозу ілюструється підвищеними відсотками реактивування ТВ у осіб, інфікованих на ВІЛ через пов'язане з ним скорочення кількості CD4+Т клітин. Крім того, було показано, що адаптивне перенесення CD4+Т клітин, що здійснюється на максимумі первинної імунної відповіді до *M. Tuberculosis*, забезпечує захист проти *M. tuberculosis* у мишей з дефіцитом Т - клітин (Orme et al J. Exp. Med. 1983 158:74-83). Було показано, що *Mycobacterium*-реактивні CD4+Т - клітини є потужними виробниками  $\gamma$ - інтерферону (IFN- $\gamma$ ), що, як в свою чергу було показано, викликає анти-мікобактеріальні дії макрофагів у мишей (Flynn et al. J. Exp. Med. 1993 178:2249-2254). В той час, як роль IFN- $\gamma$  у людей є менш ясною, дослідження показали, що 1,25-дигідрокси-вітамін D3, взятий окремо або у комбінації з IFN- $\gamma$  або альфа-фактором некрозу пухлин, активує макрофаги людини для інгібування інфекції *M. tuberculosis*. Більш того, відомо, що IFN- $\gamma$  стимулює макрофаги людини виробляти 1,25-дигідрокси-вітамін D3. Аналогічно було показано, що інтерлейкін -12 (IL-12) відіграє важливу роль у стимулюванні стійкості до інфекції *M. tuberculosis*. Для огляду імунології інфекції *M. tuberculosis*, див. Chan & Kaufmann, *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control* (Bloom ed., 1994), *Tuberculosis* (2nd ed., Rom and Garay, eds., 2003), and *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005).

Діагностику інфекції латентного туберкульозу звичайно здійснюють з застосуванням туберкулінового шкірного тесту (реакція Манту), що полягає у внутрішньошкірній реакції на очищену похідну туберкулінового білку (PPD). Антиген - специфічні Т - клітинні відповіді приводять до виникнення через 48-72 годин після ін'єкції затвердіння у місці ін'єкції, що можна виміряти та що свідчить про реакцію до мікобактеріальних антигенів. Проблемою цього тесту, однак, є чутливість та вибірковість та осіб, вакцинованих BCG не завжди можна легко розрізнити від інфікованих (що особливо важливо у світлі того факту, що BCG не в змозі захистити від латентної інфекції). Головним чином, особи, що отримали BCG, але не інфіковані *M. tuberculosis* мають реакцію PPD, що нижче 10 мм у діаметрі, у той час, як вважається, що особи, що мають реакцію PPD вищу, ніж 10 мм у діаметрі, є інфікованими *M. tuberculosis*. Проте, це правило не застосовується для осіб з імуносупресією через інфекцію ВІЛ, що можуть показати реакцію PPD нижче 10 мм у діаметрі); або, у ендемічних країнах, де люди інфіковані не туберкульозними мікобактеріями, вони можуть показувати реакцію PPD вищу, ніж 10 мм у діаметрі.

Досягнутий за останні роки прогрес спостерігається у розвитку *in vitro* Т - клітинних аналізів на основі вивільнення гамма-інтерферону та з застосуванням більш специфічних до *M. Tuberculosis*, ніж PPD антигенів ESAT-6 та CFP-10. Ці високоспецифічні тести здаються, принаймні, такими ж чутливими, як туберкуліновий шкірний тест та також демонструють меншу перехресну реактивність через вакцинацію BCG. Стосовно сучасного огляду діагностики латентного туберкульозу див. Pai M et al *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006 6(3):413-422. Однак, оскільки ESAT-6/CFP-10 є антигенами ранньої стадії, аналізи на основі ESAT-6/CFP-10 можуть оптимально бути проведені тільки у нещодавно інфікованих осіб. Тому ідентифікація специфічно асоційованих з латентним туберкульозом антигенів може допомогти у розвитку більш чутливих аналізів, що можуть забезпечити виявлення довгострокових латентних інфекцій.

Залишається потреба у ефективних стратегіях лікування та профілактики туберкульозу, зокрема лікування та запобігання латентного туберкульозу та запобігання реактивування ТВ. Останнім часом запропоновано ряд вакцин - кандидатів *M. tuberculosis* на основі біоінформаційного аналізу повного генома *M. tuberculosis* (Zvi et al. *BMC Medical Genetics* 2008 1:18) та тестування білків, що по-різному експресуються у активно та латентно інфікованих осіб (Schuck SD et al. *PLoS ONE* 2009 4(5):e5590).

Rv3616с, також відомий, як Mtb40, HTCC1 та EspA, бере участь у системі секреції *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 (Woodsworth et al. *Infection and Immunity* 2008 76(9):4199-4205). Rv3616с раніше був залучений до імунних відповідей, пов'язаних з туберкульозом (див., наприклад, WO98/53075). Al-Attayah et al. *Clin. Exp. Immunol.* 2004 138:139-144 показали, що Rv3616с можна добре розпізнати (через PMBC проліферацію та продукування IFN- гамма) у пацієнтів з легенеvim туберкульозом. Mustafa et al. *Infect. Immun.* 2006 74(8):4566-4572 винайшли спосіб розпізнавання Rv3616с з застосуванням великої рогатої худоби, що була інфікована *M. bovis* та вакцинована BCG.

Міжнародна патентна заявка PCT/EP2009/059580, опублікована, як WO2010/010177, описує ідентифікацію Rv3616с у якості антигену, пов'язаного з латентною стадією ТВ інфекції.

Міжнародна патентна заявка WO2010/121618 пропонує застосування білків, що постійно



експресуються та генів, що їх кодують, для імунологічних композицій, як то вакцин, в тому числі EspA (тобто Rv3616с).

Бажаним є отримання вакцинних антигенів, що мають їх послідовності дикого типу, таким чином гарантуючи, що потрібні від вакцини імунологічні відповіді будуть точно відповідати тим, що необхідні для протидії інфекції патогена. Тим не менше, ефективне отримання антигенів є важливим фактором у скороченні коштів, що пов'язано з виробництвом вакцин. Тому можуть мати істотну користь модифіковані антигени, що постійно експресуються на високому рівні але без будь-якого шкідливого впливу на їх імуногенність. Заявлений винахід прагне запропонувати модифіковані антигени Rv3616с, що спрямовані до вирішення цих та інших питань.

Без теоретичного обмеження вважається, що амінокислотні залишки 134-183 штаму H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* Rv3616с відповідають за потенційний трансмембранний регіон, регіон низької складності та суперспираль. Порушення одного, двох або трьох цих структурних елементів дозволяє отриманій модифікованій послідовності білка Rv3616с експресуватися на підвищеному рівні.

Тому, у поширеному аспекті, заявлений винахід стосується модифікованого білка Rv3616с, де порушена гідрофобність амінокислотних залишків, що відповідають залишкам 134-183 послідовності H37Rv, відповідно, модифікованого білка Rv3616с, де порушена гідрофобність амінокислотних залишків, що відповідають залишкам 135-154 послідовності H37Rv.

Під терміном ' порушення гідрофобності ' мається на увазі модифікація послідовності, що веде до суттєвого зменшення гідрофобності таким чином, що модифікована послідовність білка Rv3616с може більш ефективно експресуватися.

Бажано, щоб ступінь змінень в порівнянні з послідовністю дикого типу повинна була зведена до мінімуму, щоб зменшити ймовірність будь-якого небажаного впливу на імуногенність. Як тут застосовано, ' прямий пептидний зв'язок ' є пептидним зв'язком, де два пептиди з'єднані пептидними зв'язками безпосередньо один до іншого та без проміжних амінокислотних послідовностей. ' Непрямим пептидним зв'язком ' є пептидний зв'язок, де два пептиди приєднані пептидними зв'язками до третього, проміжного пептиду.

У контексті заявленого винаходу, існують чотири головних підходу до порушення гідрофобності, а саме: відокремлення гідрофобних залишків, видалення гідрофобних залишків, заміщення гідрофобних залишків гідрофільними залишками та додавання гідрофільних залишків. Досвідченому фахівцю зрозуміло, що також може бути застосована комбінація таких підходів. Однак, як вже згадувалося раніше, ступень модифікацій послідовності в ідеалі повинна бути мінімізованою для уникнення небажаного шкідливого впливу на імуногенність.

Відокремлення гідрофобних залишків може бути досягнуто шляхом розщеплення послідовності білка Rv3616с у позиції між амінокислотами, що відповідні залишкам 133-184 SEQ ID No:1 у N-термінальному та C-термінальному фрагменті, після чого слідує перебудова цих ділянок таким чином, що N-термінальний фрагмент розміщують у C-термінальному регіоні модифікованого білка Rv3616с та C-термінальний фрагмент розміщують у N-термінальному регіоні модифікованого білка Rv3616с.

У одному аспекті винаходу, передбачено модифікований білок Rv3616с, де вищезгаданий модифікований білок Rv3616с містить перший та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до C-кінця модифікованого білку Rv3616с відносно другого поліпептиду та де:

(i) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо або небезпосередньо зв'язаними.

У деяких втіленнях, модифікований білок Rv3616с головним чином або альтернативно складається з першого поліпептиду та другого поліпептиду, де перший поліпептид розміщений по напрямку до C-кінця модифікованого білку Rv3616с відносно другого поліпептиду та де:

(i) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо або небезпосередньо зв'язаними.

Перший поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 95 % тотожності до залишків 1-133 SEQ ID No:1, як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності.

Другий поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 95 % тотожності до залишків

184-392 SEQ ID No:1, як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності.

Відповідно, перший поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-134 SEQ ID No:1, зокрема принаймні 95 % тотожності, як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності.

Відповідно, другий поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 155-392 SEQ ID No:1, зокрема принаймні 95 % тотожності, як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності.

Відповідно, модифікований білок Rv3616с першого аспекту не містить послідовність, що має принаймні 90 % тотожності до повнорозмірної SEQ ID No:1. Відповідно, модифікований білок Rv3616с першого аспекту є меншим, ніж 500 амінокислот у довжину, як то меншим, ніж 450 амінокислот у довжину, зокрема, меншим, ніж 400 амінокислот у довжину.

Пептидний зв'язок може бути прямим або, альтернативно, бути непрямым.

У другому аспекті винаходу передбачено модифікований білок Rv3616с, де вищезгаданий модифікований білок Rv3616с містить перший та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до С-кінця модифікованого білку Rv3616с відносно до другого поліпептиду; де:

(iii) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(iv) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 155 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1;

перший та другий поліпептиди є безпосередньо або безпосередньо зв'язаними.

У деяких втіленнях, модифікований білок Rv3616с головним чином містить або альтернативно складається з першого поліпептиду та другого поліпептиду, де перший поліпептид розміщений по напрямку до С-кінця модифікованого білку Rv3616с відносно до другого поліпептиду, де:

(i) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 155 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо або безпосередньо зв'язаними.

Перший поліпептид може бути суміжною послідовністю у принаймні 110 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1, як то у принаймні 120 амінокислот або у принаймні 130 амінокислот, наприклад, залишки 1-133.

Другий поліпептид може бути суміжною послідовністю у принаймні 180 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1, як то у принаймні 190 амінокислот або у принаймні 200 амінокислот, наприклад, залишки 184-392.

Відповідно, перший поліпептид може бути суміжною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-134 SEQ ID No:1, зокрема, у принаймні 110 амінокислот, як то у принаймні 120 амінокислот або у принаймні 130 амінокислот, наприклад, залишки 1-134.

Відповідно, другий поліпептид може бути суміжною послідовністю у принаймні 175 амінокислот у межах залишків 155-392 SEQ ID No:1, зокрема, у принаймні 200 амінокислот, як то у принаймні 210 амінокислот або у принаймні 220 амінокислот, наприклад, залишки 155-392. Також викликають інтерес втілення, де другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 235 амінокислот у межах залишків 155-392 SEQ ID No:1.

Відповідно, модифікований білок Rv3616с другого аспекту не містить суміжної послідовності у більш, ніж 259 амінокислот з SEQ ID No:1. Альтернативно, модифікований білок Rv3616с другого аспекту не містить суміжної послідовності у більш, ніж 257 амінокислот, суміжної послідовності у більш, ніж 255 амінокислот або суміжної послідовності у більш, ніж 253 амінокислот. Відповідно, модифікований білок Rv3616с другого аспекту має менший розмір, ніж 500 амінокислот у довжину, як то менше, ніж 450 амінокислот у довжину, зокрема, менше, ніж 400 амінокислот у довжину. Пептидний зв'язок може бути прямим або, альтернативно, бути непрямым.

Приклади першого та другого аспектів охоплюють модифіковані білки Rv3616с, де перший та другий поліпептиди, що відповідають N-термінальному та С-термінальному фрагментам, походять від розщеплення послідовності Rv3616с у позиції між амінокислотами, що відповідають залишкам 135-154 у SEQ ID No:1, наприклад, залишкам 138-139 або 152-153, наприклад, залишкам 138-139 або 152-153, де пептидний зв'язок є прямим. Відповідно, при перебудуванні першого та другого поліпептидів, початковий (стартовий) метіонін залишається на N- кінці модифікованого білку Rv3616с. Див, наприклад, SEQ ID No:179, 180, що ілюструє цей

тип розташування. Видалення гідрофобних залишків може бути досягнуто шляхом видалення принаймні однієї амінокислоти, відповідній залишкам 134-183 SEQ ID No:1. Видалені залишки можуть бути несуміжними та/або суміжними. Відповідно, видалення гідрофобних залишків може бути досягнуто шляхом видалення принаймні двох амінокислот, відповідних залишкам 134-183 SEQ ID No:1. Видалення гідрофобних залишків також може бути досягнуто шляхом видалення принаймні трьох амінокислот, відповідних залишкам 134-183 SEQ ID No:1. Видалені залишки можуть бути суміжними та/або несуміжними. Слід зазначити, що послідовності Rv3616с дикого типу містять цистеїновий залишок у позиції 138. Відповідно, цей цистеїновий залишок є видаленим або переміщеним (наприклад, C138Q). У третьому аспекті винаходу передбачено модифікований білок Rv3616с, вищезгаданий білок, що містить, або, альтернативно, головним чином складається або складається з послідовності Rv3616с, у якій принаймні одна амінокислота

(наприклад, принаймні 2) є видаленою з регіону, що відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1.

Модифікований білок Rv3616с може містити, або, альтернативно, головним чином складатися або складатися з послідовності Rv3616с, де суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти) видалена з регіону, що відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1.

Окремий інтерес викликають модифіковані білки Rv3616с, що містять послідовність Rv3616с, де принаймні одна амінокислота (наприклад, принаймні дві) видалена з регіону, відповідному залишкам 135-154 у SEQ ID No:1. Інші інтересуючі послідовності є модифікованими білками Rv3616с, що містять послідовність Rv3616с, де суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти) видалена з регіону, що відповідає залишкам 135-154 у SEQ ID No:1.

Видалена суміжна частина може складатися принаймні з 5 амінокислот (наприклад, 5-30, 5-20 або 5-15), головним чином, принаймні з 6 амінокислот (наприклад, 6-30, 6-20 або 6-15), зокрема, принаймні з 7 амінокислот (наприклад, 7-30, 7-20 або 7-15), принаймні з 8 амінокислот (наприклад, 8-30, 8-20 або 8-15) або принаймні з 10 амінокислот (наприклад, 10-30, 10-20 або 10-15). У певних втіленнях, видалена суміжна частина може складатися з:

- 4 амінокислот, що відповідають залишкам 142-145 у SEQ ID No:1;
- 5 амінокислот, що відповідають залишкам 135-139 у SEQ ID No:1;
- 6 амінокислот, що відповідають залишкам 149-154 у SEQ ID No:1;
- 8 амінокислот, що відповідають залишкам 138-145 у SEQ ID No:1 або залишкам 145-152 у SEQ ID No:1;

- 11 амінокислот, що відповідають залишкам 150-160 у SEQ ID No:1;
- 17 амінокислот, що відповідають залишкам 166-182 у SEQ ID No:1;
- 19 амінокислот, що відповідають залишкам 136-154 у SEQ ID No:1;
- 31 амінокислот, що відповідають залишкам 136-166 у SEQ ID No:1; або
- 48 амінокислот, що відповідають залишкам 136-183 у SEQ ID No:1.

У інших втіленнях, видалена суміжна частина може складатися з 3-10 амінокислотних залишків, як то з 4-10, наприклад, з 4-8. Певна кількість видалених амінокислот може дорівнювати 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, головним чином, 4, 5, 6 або 8.

У інших втіленнях, видалена частина може відповідати залишкам 135-138 у SEQ ID No:1, залишкам 136-138 у SEQ ID No:1, залишкам 137-138 у SEQ ID No:1, залишкам 138-140 у SEQ ID No:1, залишкам 138-141 у SEQ ID No:1, залишкам 152-154 у SEQ ID No:1 або видаленню залишків 149-151 у SEQ ID No:1. Четвертий аспект винаходу передбачає модифікований білок Rv3616с, де вказаний білок містить перший та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

(iii) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1;

(iv) та другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 155 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо або небезпосередньо зв'язаними через третій поліпептид та вказаний третій поліпептид відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1, де видалена принаймні одна амінокислота (наприклад, принаймні дві).

У деяких втіленнях, модифікований білок Rv3616с головним чином містить або альтернативно складається з першого та другого поліпептиду, де перший розміщений по напрямку до N-кінця відносно до другого поліпептиду, та:

(i) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 155 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1;

перший та другий поліпептиди є безпосередньо або небезпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, де вказаний третій поліпептид відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1 де видалена принаймні одна амінокислота (наприклад, принаймні дві).

Окремий інтерес викликають білки, що містять або, альтернативно, головним чином складаються або складаються з першого та другого поліпептиду, де перший розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 155 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо або небезпосередньо зв'язаними через третій поліпептид та вказаний третій поліпептид відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1, де видалена принаймні суміжна частина з щонайменш трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти).

Перший поліпептид може бути суміжною послідовністю у принаймні 110 амінокислот у межах залишків 1-133 SEQ ID No:1, як то у принаймні 120 або 130 амінокислот (наприклад, залишки 1-133).

Другий поліпептид може бути суміжною послідовністю у принаймні 180 амінокислот у межах залишків 184-392 SEQ ID No:1, як то у принаймні 190 або 200 амінокислот (наприклад, залишки 184-392).

Видалена суміжна частина з залишків, що відповідні 134-183 у SEQ ID No:1 може сягати принаймні 5 амінокислот (наприклад, 5-30, 5-20 або 5-15), головним чином, принаймні 6 амінокислот (наприклад, 6-30, 6-20 або 6-15), зокрема, принаймні 7 амінокислот (наприклад, 7-30, 7-20 або 7-15), принаймні 8 амінокислот (наприклад, 8-30, 8-20 або 8-15) або принаймні 10 амінокислот (наприклад, 10-30, 10-20 або 10-15).

У деяких втіленнях, видалена суміжна частина з залишків, що відповідні 134-183 у SEQ ID No:1 може дорівнювати:

- 4 амінокислотам, що відповідають залишкам 142-145 у SEQ ID No:1;
- 5 амінокислотам, що відповідають залишкам 135-139 у SEQ ID No:1;
- 6 амінокислотам, що відповідають залишкам 149-154 у SEQ ID No:1;
- 8 амінокислотам, що відповідають залишкам 138-145 у SEQ ID No:1 або залишкам 145-152 у SEQ ID No:1;

- 11 амінокислотам, що відповідають залишкам 150-160 у SEQ ID No:1;
- 17 амінокислотам, що відповідають залишкам 166-182 у SEQ ID No:1;
- 19 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-154 у SEQ ID No:1;
- 31 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-166 у SEQ ID No:1; або
- 48 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-183 у SEQ ID No:1.

У інших втіленнях видалена суміжна частина з залишків, що відповідні 134-183 у SEQ ID No:1 може бути 3-10 амінокислотними залишками, наприклад, 4-10 або 4-8. Певна кількість видалених амінокислот може дорівнювати 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, головним чином, 4, 5, 6 або 8.

У інших втіленнях, видалена суміжна частина з залишків, що відповідні 134-183 у SEQ ID No:1 може бути відповідною залишкам 135-138 у SEQ ID No:1, залишкам 136-138 у SEQ ID No:1, залишкам 137-138 у SEQ ID No:1, залишкам 138-140 у SEQ ID No:1, залишкам 138-141 у SEQ ID No:1, залишкам 152-154 у SEQ ID No:1 або видаленню залишків 149-151 у SEQ ID No:1. У деяких втіленнях, перший та другий поліпептиди є безпосередньо зв'язаними між собою. У інших втіленнях, перший поліпептид та другий поліпептид є безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид. Третій поліпептид може бути відповідним залишкам 134-183 у SEQ ID No:1, де виникла делеція у одиничній суміжній частині принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотирьох амінокислот). Крім того, третій поліпептид може бути відповідним залишкам 134-183 у SEQ ID No:1, де виникли делеції в кількох окремих місцях (наприклад, у 1-10, 1-5 місцях, зокрема, у одному або у двох місцях), де кожна делеція виникає у 1-10, наприклад, 1-5 амінокислотних залишків. Відповідно, третій поліпептид дорівнює 48 амінокислотам або менше (наприклад, 10-48, 20-48 або 30-48 залишків), як то 46 амінокислотам або менше (наприклад, 10-46, 20-46 або 30-46 залишків), 44 амінокислотам або менше (наприклад, 10-44, 20-44 або 30-44 залишків) або 42 амінокислотам або менше (наприклад, 10-42, 20-42 або 30-42 залишків).

П'ятий аспект винаходу передбачає модифіковані білки Rv3616с, що містять перший та другий поліпептиди, де перший розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

(iii) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-134 SEQ ID No:1; та

(iv) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 175 амінокислот у межах залишків 155-392 SEQ ID No:1;

5 де перший та другий поліпептиди є або безпосередньо зв'язаними між собою або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, де вказаний третій поліпептид відповідає залишкам 135-154 у SEQ ID No:1 де видалена принаймні одна амінокислота (наприклад, принаймні дві).

10 У деяких втіленнях, модифікований білок Rv3616с головним чином містить або альтернативно складається з першого та другого поліпептиду, де перший розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-134 SEQ ID No:1; та

15 (ii) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 175 амінокислот у межах залишків 155-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є або безпосередньо зв'язаними між собою або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, де вказаний третій поліпептид відповідає залишкам 135-154 у SEQ ID No:1 де видалена принаймні одна амінокислота (наприклад, принаймні дві).

20 Окремий інтерес викликають білки, що містять або, альтернативно, головним чином складаються або складаються з першого та другого поліпептиду, де перший розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 100 амінокислот у межах залишків 1-134 SEQ ID No:1; та

25 (ii) другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 175 амінокислот у межах залишків 155-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є або безпосередньо зв'язаними між собою або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, де вказаний третій поліпептид відповідає залишкам 135-154 у SEQ ID No:1, де видалення відбулося в одиничній суміжній частині принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотирьох амінокислот).

30 Перший поліпептид може також бути суміжною послідовністю у принаймні 110 амінокислот у межах залишків 1-134 SEQ ID No:1, як то у принаймні 120 амінокислот або у принаймні 130 амінокислот, наприклад, залишки 1-134.

35 Другий поліпептид може також бути суміжною послідовністю у принаймні 200 амінокислот у межах залишків 155-392 SEQ ID No:1, як то у принаймні 210 амінокислот або у принаймні 220 амінокислот, наприклад, залишки 155-392. Також, викликають інтерес втілення, де другий поліпептид є безперервною послідовністю у принаймні 235 амінокислот у межах залишків 155-392 SEQ ID No:1.

40 Видалена суміжна частина з залишків, що відповідні 135-154 у SEQ ID No:1 може дорівнювати принаймні 5 амінокислотам (наприклад, 5-20, 5-15 або 5-10), головним чином, принаймні 6 амінокислотам (наприклад, 6-20, 6-15 або 6-10), зокрема, принаймні 7 амінокислотам (наприклад, 7-20, 7-15 або 7-10), як то принаймні 8 амінокислотам (наприклад, 8-20, 8-15 або 8-10) або принаймні 10 амінокислотам (наприклад, 10-20, 10-15). У деяких втіленнях, видалена суміжна частина з залишків, що відповідні 135-154 у SEQ ID No:1 може дорівнювати:

- 4 амінокислотам, що відповідають залишкам 142-145 у SEQ ID No:1;

- 6 амінокислотам, що відповідають залишкам 149-154 у SEQ ID No:1;

- 8 амінокислотам, що відповідають залишкам 138-145 у SEQ ID No:1 або залишкам 145-152 у SEQ ID No:1;

50 - 11 амінокислотам, що відповідають залишкам 150-160 у SEQ ID No:1; або

- 19 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-154 у SEQ ID No:1.

У інших втіленнях видалена суміжна частина з залишків, що відповідні 135-154 може дорівнювати 3-10 амінокислотних залишків, як то, 4-10, наприклад, 4-8. Певна кількість видалених амінокислот може дорівнювати 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, головним чином 4, 5, 6 або 8.

55 У інших втіленнях, видалена суміжна частина з залишків, що відповідні 135-154 у SEQ ID No:1 може бути відповідною залишкам 135-138 у SEQ ID No:1, залишкам 136-138 у SEQ ID No:1, залишкам 137-138 у SEQ ID No:1, залишкам 138-140 у SEQ ID No:1, залишкам 138-141 у SEQ ID No:1, залишкам 152-154 у SEQ ID No:1 або видаленню залишків 149-151 у SEQ ID No:1. У деяких втіленнях, перший та другий поліпептиди є безпосередньо зв'язаними між собою. У

60 інших втіленнях, перший поліпептид та другий поліпептид є безпосередньо зв'язаними через

третій поліпептид, де третій поліпептид може бути відповідним залишкам 135-154 у SEQ ID No:1, де видалення відбулося в одиничній суміжній частині принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотирьох амінокислот). Крім того, третій поліпептид може бути відповідним залишкам 135-154 у SEQ ID No:1 де виникли делеції в кількох окремих місцях (наприклад, у 1-10, 1-5 місцях, зокрема, у одному або у двох місцях), де кожна делеція виникає у 1-10, наприклад, у 1-5 амінокислотних залишків. Відповідно, третій поліпептид дорівнює 20 амінокислот або менше (наприклад, 5-20, як то 10-20 залишків), 18 амінокислот або менше (наприклад, 5-18, як то 10-18 залишків), 16 амінокислот або менше (наприклад, 5-16, як то 10-16 залишків) або 14 амінокислот або менше (наприклад, 5-14, як то 10-14 залишків).

Шостий аспект винаходу передбачає модифікований білок Rv3616с, де вказаний білок містить перший та другий поліпептиди, де перший поліпептид розміщений по напрямку до N-кінця відносно до другого поліпептиду та:

(iii) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(iv) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо зв'язаними між собою або не є безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, вищезгаданий третій поліпептид має принаймні 90 % тотожності до послідовності, відповідній залишкам 134-183 у SEQ ID No:1 де видалена суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти).

У деяких втіленнях модифікований білок Rv3616с головним чином містить або альтернативно складається з першого та другого поліпептиду, де перший поліпептид розміщений по напрямку до N-кінця відносно до другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-133 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 184-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є безпосередньо зв'язаними між собою або не є безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, де вказаний третій поліпептид має принаймні 90 % тотожності до послідовності, відповідній залишкам 134-183 у SEQ ID No:1, де видалена суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти).

Перший поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 95 % тотожності до залишків 1-133 SEQ ID No:1, як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності.

Другий поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 95 % тотожності до залишків 184-392 SEQ ID No:1, як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності.

У деяких втіленнях, перший та другий поліпептид можуть бути безпосередньо зв'язаними між собою. У інших втіленнях, перший поліпептид та другий поліпептид можуть бути безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид. Третій поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 95 % тотожності до послідовності, відповідній залишкам 134-183 у SEQ ID No:1, де видалена суміжна частина принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти), як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності. Суміжна частина, що виділена з залишків, відповідних 134-183 у SEQ ID No:1 може дорівнювати принаймні 5 амінокислот (наприклад, 5-30, 5-20 або 5-15), головним чином, принаймні 6 амінокислот (наприклад, 6-30, 6-20 або 6-15), зокрема, принаймні 7 амінокислот (наприклад, 7-30, 7-20 або 7-15), як то принаймні 8 амінокислот (наприклад, 8-30, 8-20 або 8-15) або принаймні 10 амінокислот (наприклад, 10-30, 10-20 або 10-15). У деяких втіленнях, суміжна частина, що виділена з залишків, відповідних 134-183 у SEQ ID No:1 може дорівнювати:

- 4 амінокислотам, що відповідають залишкам 142-145 у SEQ ID No:1;

- 5 амінокислотам, що відповідають залишкам 135-139 у SEQ ID No:1;

- 6 амінокислотам, що відповідають залишкам 149-154 у SEQ ID No:1;

- 8 амінокислотам, що відповідають залишкам 138-145 у SEQ ID No:1 або залишкам 145-152 у SEQ ID No:1;

- 11 амінокислотам, що відповідають залишкам 150-160 у SEQ ID No:1;

- 17 амінокислотам, що відповідають залишкам 166-182 у SEQ ID No:1;

- 19 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-154 у SEQ ID No:1;

- 31 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-166 у SEQ ID No:1; або
- 48 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-183 у SEQ ID No:1.

У інших втіленнях, видалена суміжна частина може дорівнювати 3-10 амінокислотних залишків, як то 4-10, наприклад, 4-8. Певна кількість видалених амінокислот може дорівнювати

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, головним чином, 4, 5, 6 або 8.

У інших втіленнях, суміжна частина, що виділена з залишків, відповідних 134-183 у SEQ ID No:1 може бути відповідною залишкам 135-138 у SEQ ID No:1, залишкам 136-138 у SEQ ID No:1, залишкам 137-138 у SEQ ID No:1, залишкам 138-140 у SEQ ID No:1, залишкам 138-141 у SEQ ID No:1, залишкам 152-154 у SEQ ID No:1 або видаленню залишків 149-151 у SEQ ID No:1. Відповідно, третій поліпептид має розмір 48 амінокислот або менше (наприклад, 10-48, 20-48 або 30-48 залишків), 46 амінокислот або менше (наприклад, 10-46, 20-46 або 30-46 залишків), 44 амінокислоти або менше (наприклад, 10-44, 20-44 або 30-44 залишків) або 42 амінокислоти або менше (наприклад, 10-42, 20-42 або 30-42 залишків).

Сьомий аспект винаходу передбачає модифіковані білки Rv3616с, що містять перший та другий поліпептиди, де перший розміщений по напрямку до N-кінця відносно другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-134 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 155-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є або безпосередньо зв'язаними між собою або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид, де вищезгаданий третій поліпептид має принаймні 80 % тотожності до послідовності, відповідній залишкам 135-154 у SEQ ID No:1, де видалена суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти).

У деяких втіленнях, модифікований білок Rv3616с головним чином містить або альтернативно складається з першого та другого поліпептиду, де перший поліпептид розміщений по напрямку до N-кінця відносно до другого поліпептиду та:

(i) перший поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 1-134 SEQ ID No:1; та

(ii) другий поліпептид є послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до залишків 155-392 SEQ ID No:1;

де перший та другий поліпептиди є або безпосередньо зв'язаними між собою або безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид та де вказаний третій поліпептид має принаймні 80 % тотожності до послідовності, відповідній залишкам 135-154 у SEQ ID No:1, де видалена суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти).

Перший поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 95 % тотожності до залишків 1-134 SEQ ID No:1, як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності.

Другий поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 95 % тотожності до залишків 155-392 SEQ ID No:1, як то принаймні 97 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності.

У деяких втіленнях, перший поліпептид та другий поліпептид можуть бути безпосередньо зв'язаними між собою. У інших втіленнях, перший поліпептид та другий поліпептид можуть бути безпосередньо зв'язаними через третій поліпептид. Третій поліпептид може бути послідовністю, що має принаймні 90 % тотожності до послідовності, відповідній залишкам 135-154 у SEQ ID No:1 де видалена суміжна частина принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти), як то принаймні 95 % тотожності, принаймні 98 % тотожності, принаймні 99 % тотожності або навіть 100 % тотожності. Суміжна частина, що виділена з залишків, відповідних 135-154 у SEQ ID No:1 може дорівнювати принаймні 5 амінокислот (наприклад, 5-20, 5-15 або 5-10), головним чином, принаймні 6 амінокислот (наприклад, 6-20, 6-15 або 6-10), зокрема, принаймні 7 амінокислот (наприклад, 7-20, 7-15 або 7-10), принаймні 8 амінокислот (наприклад, 8-20, 8-15 або 8-10) або принаймні 10 амінокислот (наприклад, 10-20, 10-15).

У деяких втіленнях, суміжна частина видаленої суміжної частини з залишками, відповідними 135-154 у SEQ ID No:1 може дорівнювати:

- 4 амінокислотам, що відповідають залишкам 142-145 у SEQ ID No:1;
- 6 амінокислотам, що відповідають залишкам 149-154 у SEQ ID No:1;
- 8 амінокислотам, що відповідають залишкам 138-145 у SEQ ID No:1 або залишкам 145-152

у SEQ ID No:1;

- 11 амінокислотам, що відповідають залишкам 150-160 у SEQ ID No:1; або
- 19 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-154 у SEQ ID No:1.

У інших втіленнях, видалена суміжна частина може дорівнювати 3-10 амінокислотних залишків, як то 4-10, наприклад, 4-8. Певна кількість видалених амінокислот може дорівнювати 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, головним чином, 4, 5, 6 або 8.

У деяких втіленнях, суміжна частина видаленої суміжної частини з залишками, відповідними 135-154 у SEQ ID No:1 може бути відповідною залишкам 135-138 у SEQ ID No:1, залишкам 136-138 у SEQ ID No:1, залишкам 137-138 у SEQ ID No:1, залишкам 138-140 у SEQ ID No:1, залишкам 138-141 у SEQ ID No:1, залишкам 152-154 у SEQ ID No:1 або видаленню залишків 149-151 у SEQ ID No:1.

Відповідно, третій поліпептид дорівнює 20 амінокислотам або менше (наприклад, 5-20, 10-20 залишків), наприклад, 18 амінокислотам або менше (наприклад, 5-18, 10-18 залишків), 16 амінокислотам або менше (наприклад, 5-16, 10-16 залишків) або 14 амінокислотам або менше (наприклад, 5-14, 10-14 залишків).

Заміщення гідрофобних залишків може бути досягнуто шляхом заміщення гідрофільним залишком принаймні однієї (наприклад, принаймні двох) амінокислоти, що відповідає залишкам 134-183 SEQ ID No:1. У зв'язку з цим, прийнятні гідрофільні залишки звичайно є Gln (Q), Asp (D), Glu (E), Asn (N), His (H), Lys (K), Arg (R), Ser (S) або Thr (T).

Окремий інтерес викликає заміщення гідрофільним залишком принаймні однієї (наприклад, принаймні двох) амінокислоти, що відповідає залишкам 135-154 у SEQ ID No:1. У зв'язку з цим, прийнятні гідрофільні залишки звичайно є Gln (Q), Asp (D), Glu (E), Asn (N), His (H), Lys (K), Arg (R), Ser (S) або Thr (T).

Заміщені залишки може бути несуміжними, хоча є, відповідно, суміжними.

У восьмому аспекті винаходу передбачено модифікований білок Rv3616с, де вказаний білок містить послідовність Rv3616с, де суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти) з регіону, що відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1 заміщена гідрофільними залишками.

У деяких втіленнях, модифікований білок Rv3616с головним чином містить або альтернативно складається з послідовності Rv3616с, де суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти) з регіону, що відповідає залишкам 134-183 у SEQ ID No:1 заміщена гідрофільними залишками.

Окремий інтерес викликають модифіковані білки Rv3616с, що містять послідовність Rv3616с, де суміжна частина з принаймні трьох амінокислот (наприклад, принаймні чотири амінокислоти) з регіону, що відповідає залишкам 135-154 у SEQ ID No:1 заміщена гідрофільними залишками.

Заміщена суміжна частина може дорівнювати принаймні 5 амінокислот (наприклад, 5-30, 5-20 або 5-15), головним чином, принаймні 6 амінокислот (наприклад, 6-30, 6-20 або 6-15), зокрема, принаймні 7 амінокислот (наприклад, 7-30, 7-20 або 7-15), принаймні 8 амінокислот (наприклад, 8-30, 8-20 або 8-15) або принаймні 10 амінокислот (наприклад, 10-30, 10-20 або 10-15).

У деяких втіленнях, заміщена суміжна частина може дорівнювати:

- 4 амінокислотам, що відповідають залишкам 142-145 у SEQ ID No:1;
- 5 амінокислотам, що відповідають залишкам 135-139 у SEQ ID No:1;
- 6 амінокислотам, що відповідають залишкам 149-154 у SEQ ID No:1;
- 8 амінокислотам, що відповідають залишкам 138-145 у SEQ ID No:1 або залишкам 145-152 у SEQ ID No:1;

- 11 амінокислотам, що відповідають залишкам 150-160 у SEQ ID No:1;
- 17 амінокислотам, що відповідають залишкам 166-182 у SEQ ID No:1;
- 19 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-154 у SEQ ID No:1;
- 31 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-166 у SEQ ID No:1; або
- 48 амінокислотам, що відповідають залишкам 136-183 у SEQ ID No:1.

У інших втіленнях, заміщена суміжна частина може дорівнювати 3-10 амінокислотних залишків, як то 4-10, наприклад, 4-8.

Певна кількість заміщених амінокислот може дорівнювати 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, головним чином, 4, 5, 6 або 8.

У інших втіленнях, заміщена частина може бути відповідною залишкам 135-138 у SEQ ID No:1, залишкам 136-138 у SEQ ID No:1, залишкам 137-138 у SEQ ID No:1, залишкам 138-140 у SEQ ID No:1, залишкам 138-141 у SEQ ID No:1, залишкам 152-154 у SEQ ID No:1 або видаленню залишків 149-151 у SEQ ID No:1. Порушення гідрофобності може також бути досягнуто



додаванням гідрофільних залишків, наприклад, додаванням принаймні одного гідрофільного амінокислотного залишку (наприклад, принаймні двох, як то 2-10) до місця між цими залишками, що відповідає залишкам 133-184 SEQ ID No:1.

Відповідно, може бути додано принаймні три гідрофільних залишка (наприклад, 3-20, 3-15, головним чином, 3-10), принаймні 4 залишка (наприклад, 4-20, 4-15, головним чином, 4-10), зокрема, принаймні 5 залишків (наприклад, 5-20, 5-15, головним чином, 5-10), вибірково, принаймні 6 залишків (наприклад, 6-20, 6-15, головним чином, 6-10). У зв'язку з цим, прийнятні гідрофільні залишки звичайно є Gln (Q), Asp (D), Glu (E), Asn (N), His (H), Lys (K), Arg (R), Ser (S) або Thr (T).

Додаткові гідрофільні залишки звичайно заходяться між залишками, що відповідають 133-184 SEQ ID No:1, головним чином, між залишками 134-155 SEQ ID No:1 (як то, між залишками 135-154 SEQ ID No:1).

Додаткові гідрофільні залишки можуть бути розподілені у різних позиціях між залишками 133-184 SEQ ID No:1 (наприклад, місця 1-10, як то 1-5, зокрема 1 або 2), де кожне місце має 1-10 додаткових гідрофільних залишків, як то 1-5 додаткових залишків. Додаткові гідрофільні залишки, відповідно, будуть розміщені у одній суміжній групі. У окремих втіленнях описаних у різних аспектах вище модифікованих білків Rv3616с, модифікований білок Rv3616с не є SEQ ID No:162 (Rv3616сΔ150-160). У інших втіленнях, модифікований білок Rv3616с не містить SEQ ID No:162 (Rv3616сΔ150-160).

Модифіковані білки Rv3616с можуть бути отримані на основі послідовності білку дикого типу Rv3616с з будь-якого штаму *M. tuberculosis*. Наприклад, будь-яка послідовність SEQ ID Nos: 3-7, зокрема будь-яка послідовність SEQ ID Nos: 3-6 може бути заміщена на SEQ ID No:1 у попередніх втіленнях.

В цій заявці, білки з різних обговорених вище аспектів в сукупності зазначені, як модифіковані білки Rv3616с. Також запропоновано модифіковані білки Rv3616с для застосування в якості лікарських засобів, як то медикаменту для лікування або запобігання ТВ.

Подальший аспект винаходу стосується способу, що викликає у суб'єкта імунну відповідь, що полягає у введенні модифікованого білку Rv3616с. Подальший аспект винаходу стосується способу лікування, поліпшення стану або запобігання ТВ, що полягає у введенні суб'єкту у разі потреби безпечної та ефективної кількості модифікованого білку Rv3616с, де вказаний поліпептид викликає імунну відповідь. У іншому аспекті, спосіб додатково полягає у викликанні імунної відповіді проти *Mycobacterium tuberculosis*.

Подальший аспект винаходу стосується способу лікування, поліпшення стану, затримування або попередження реактивування туберкульозу, що полягає у введенні суб'єкту у разі потреби ефективної кількості модифікованого білку Rv3616с, де вказаний поліпептид викликає імунну відповідь. У іншому аспекті, спосіб додатково полягає у викликанні імунної відповіді проти *Mycobacterium tuberculosis*. Застосування модифікованого білку Rv3616с у виробництві лікарського засобу для лікування, поліпшення стану або запобігання ТВ, являє собою інший аспект винаходу.

Заявлений винахід стосується полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с. Також запропоновано полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с для застосування у якості лікарського засобу, як то медикаменту для лікування, поліпшення стану або запобігання ТВ.

Подальший аспект винаходу стосується способу, що викликає у суб'єкта імунну відповідь, що полягає у введенні полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с.

Подальший аспект винаходу стосується способу лікування, поліпшення стану або запобігання ТВ, що полягає у введенні суб'єкту у разі потреби безпечної та ефективної кількості полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с, де вищезгаданий полінуклеотид викликає імунну відповідь. У іншому аспекті, заявлений винахід стосується способу індукування імунної відповіді проти *Mycobacterium tuberculosis*.

Подальший аспект винаходу стосується способу лікування, поліпшення стану, затримування або попередження реактивування туберкульозу, що полягає у введенні суб'єкту у разі потреби ефективної кількості полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с, де вказаний поліпептид викликає імунну відповідь. У іншому аспекті, спосіб додатково полягає у викликанні імунної відповіді проти *Mycobacterium tuberculosis*.

Застосування полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує

поліпептид, що містить модифікований білок Rv3616с у виробництві лікарського засобу для лікування, поліпшення стану або запобігання ТВ являє собою інший аспект винаходу.

Крім того, передбачено фармацевтичну композицію, що містить:

- (а) модифікований білок Rv3616с; або
- 5 (b) полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с; та

(с) фармацевтично прийнятний носій або наповнювач.

Крім того, передбачено імуногенну композицію, що містить:

- (а) модифікований білок Rv3616с; або
- 10 (b) полінуклеотид, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с; та

(с) підсилювач неспецифічної імунної відповіді.

- Також передбачено вектор експресії, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує модифікований білок Rv3616с. Подальший аспект винаходу стосується клітини - хазяя, трансформованого з вищезгаданим вектором експресії. Крім того, передбачено клітину - хазяя, що рекомбінантно експресує модифікований білок Rv3616с. Крім того, передбачено спосіб отримання модифікованого білку Rv3616с, де вищезгаданий спосіб містить етап рекомбінантної експресії вказаного поліпептиду у клітині - хазяїні.
- 15

Також передбачені діагностичні набори, що містять:

- 20 (а) модифікований білок Rv3616с;
- (b) обладнання, достатнє для контакту вказаного модифікованого білку Rv3616с зі зразком (наприклад, цільної крові або, більш відповідно, МКПК) з суб'єктом; та
- (с) засоби для кількісної Т - клітинної відповіді зразка.

Інший аспект винаходу стосується діагностичного набору, що містить:

- 25 (а) модифікований білок Rv3616с; та
- (b) обладнання, достатнє для контакту вказаного модифікованого білку Rv3616с з клітинами шкіри пацієнта.

Подальший аспект винаходу стосується способу визначення інфекції *Mycobacterium tuberculosis* у суб'єкті, що полягає у:

- 30 (а) контакті зразка з вищезгаданим суб'єктом з модифікованим білком Rv3616с; та (b) визначення у біологічному зразку присутності антитіл, що зв'язують модифікований білок Rv3616с.

Винахід також передбачає діагностичний набір, що містить:

- 35 (а) модифікований білок Rv3616с, вибірково іммобілізований на твердій поверхні; та
- (b) реагент для виявлення.

- У одному втіленні, суб'єкт що отримує модифікований білок Rv3616с, полінуклеотид або композицію відповідно до винаходу може мати активний туберкульоз (наприклад, активну інфекцію *M. tuberculosis*). У другому втіленні, суб'єкт може мати латентний туберкульоз (наприклад, "сплячу" інфекцію *M. tuberculosis*). У третьому втіленні, суб'єкт може бути вільним від туберкульозу (наприклад, вільним від інфекції *M. tuberculosis*).
- 40

- Суб'єкт отримання модифікованого білку Rv3616с, полінуклеотиду або композиції відповідно до винаходу може попередньо бути вакцинованим проти туберкульозу (наприклад, вакцинованим проти інфекції *M. tuberculosis*), як то бути вакцинованим з *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). Альтернативно, суб'єкт отримання поліпептиду, полінуклеотиду або композиції винаходу може не бути попередньо вакцинованим проти туберкульозу (наприклад, не вакцинованим проти інфекції *M. tuberculosis*), як то не бути вакцинованим з *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG).
- 45

Модифікований білок Rv3616с, полінуклеотид або композиція відповідно до винаходу може бути надана з метою:

- лікування активного туберкульозу;
- 50 - запобігання активного туберкульозу (наприклад, шляхом введення неінфікованому суб'єкту або, альтернативно, суб'єкту, що має латентну інфекцію);
- лікування латентного туберкульозу;
- запобігання латентного туберкульозу; або запобігання або затримування реактивування туберкульозу (особливо затримування реактивування туберкульозу, наприклад, строком на декілька місяців, років або навіть на невизначений час).
- 55

Також передбачено спосіб лікування латентного туберкульозу, що полягає у:

- (i) ідентифікації суб'єкту на наявність латентної ТВ інфекції (наприклад, застосуванням туберкулінового тесту або аналізів на основі Т - клітин); та
- (ii) введенні вищезгаданому суб'єкту безпечної та ефективною кількості модифікованого білку Rv3616с або полінуклеотиду, що кодує модифікований білок Rv3616с (як то у вигляді
- 60

фармацевтичної або імуногенної композиції).

Також запропоновано застосування поліпептиду заявленого винаходу у виробництві діагностичного набору для ідентифікації туберкульозу (наприклад, латентного ТВ) у піддослідному суб'єкті.

5 Термін "Види *Mycobacterium* туберкульозного комплексу" охоплює види, що традиційно вважається причиною захворювання на туберкульоз, а саме екзогенні та умовно-патогенні види *Mycobacterium*, що спричинюють туберкульоз та захворювання легень у пацієнтів з порушенням імунної системи, як то у пацієнтів з ВІЛ, наприклад, *M. tuberculosis*, *M. bovis* або *M. africanum*, BCG, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. celatum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M.*  
10 *simiae*, *M. vaccae*, *M. fortuitum*, та *M. scrofulaceum* (див., наприклад, Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005). Заявлений винахід особливо спрямований до інфекції *M. tuberculosis*.

Термін "ктивна інфекція" стосується інфекції (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*) з проявленням симптомів захворювання та/або ураженнями (відповідно з проявленням симптомів захворювання). Терміни "неактивна інфекція", "спляча інфекція" або "латентна інфекція" має  
15 відношення до інфекції (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*) без проявлення симптомів захворювання та/або уражень (відповідно без проявлення симптомів захворювання). Суб'єкт з латентною інфекцією, відповідно, буде тест-позитивним на цю інфекцію (наприклад, за допомогою туберкулінової проби або аналізів на основі Т - клітин) але не буде проявляти  
20 симптомів захворювання та/або уражень, пов'язаних з активною інфекцією.

Термін "первинний туберкульоз" стосується клінічних проявів хвороби (наприклад, проявлення симптомів захворювання) безпосередньо під час інфекції (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*). Див., Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005).

25 Терміни "вторинний туберкульоз" або "пост-первинний туберкульоз" має відношення до реактивування сплячої, неактивної або латентної інфекції (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*). Див., Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005). Термін "реактивування туберкульозу" стосується пізнішого проявлення симптомів захворювання у тест-позитивному на інфекцію суб'єкті (наприклад, за допомогою туберкулінової  
30 проби або аналізів на основі Т - клітин), що не мав наявних симптомів захворювання. Відповідно, суб'єкт не може повторно бути уражений цією інфекцією. Позитивний діагностичний тест свідчить, що особа інфікована, однак, вона може мати або може не мати передчасного проявлення активних симптомів захворювання, яких буде достатньо лікувати для переведення туберкульозу у неактивний або латентний стан. Слід визнати, що способи запобігання, затримування або лікування реактивування туберкульозу можна розпочати застосовувати у  
35 суб'єкті, що проявляє активні симптоми захворювання.

Термін "стійкий до ліків" туберкульоз стосується інфекції (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*), де штам інфікування не підтримується в статичному стані або не знищується (тобто, є стійким до) одним або декількома так званими хіміотерапевтичними агентами першої  
40 лінії, ефективними у лікуванні туберкульозу (наприклад, ісоніазид, рифампін, етамбутол, стрептоміцин та піразинамід). Термін туберкульоз "з множинною стійкістю до ліків" стосується інфекції (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*), де штам інфікування є стійким до двох або декількох хіміотерапевтичних агентів першої лінії, ефективних у лікуванні туберкульозу.

"Хіміотерапевтичний агент" стосується відомого у цій галузі фармакологічного агента, якого застосовують для лікування туберкульозу (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*). Зразкові фармакологічні агенти, що застосовують для лікування туберкульозу охоплюють, але без обмеження, амікацин, аміносаліцилову кислоту, капреоміцин, циклорсерин, етамбутол, етіонамід, ізоніазид, канаміцин, піразинамід, рифаміцини (тобто, рифампін, рифапентин та рифабутин), стрептоміцин, офлоксацин, цiproфлорксацин, кларитроміцин, азитроміцин та  
50 флуорохінолони. Хіміотерапевтичні агенти "першої лінії" або "переднього краю", що застосовують для лікування не стійкого до ліків туберкульозу, охоплюють ізоніазид, рифампін, етамбутол, стрептоміцин та піразинамід. Хіміотерапевтичні агенти "другої лінії", що застосовують для лікування туберкульозу, що проявляє стійкість до одного або до декількох ліків "першої лінії" охоплюють офлоксацин, цiproфлорксацин, етіонамід, аміносаліцилову  
55 кислоту, циклосерин, амікацин, канаміцин та капреоміцин. Такі фармакологічні агенти розглядаються у Розділі 48 книги Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman and Limbird eds., 2001.

Терміни "поліпептид", "пептид" та "білок", що застосовані тут взаємозамінно, мають відношення до полімеру амінокислотних залишків. Амінокислоти, що зустрічаються в природі,  
60 кодуються генетичним кодом, так само, як і амінокислоти, що потім модифікують, наприклад,

гідроксипролін,  $\gamma$ - карбоксиглутамат та О-фосфосерин. Отже, поліпептид, відповідно до заявленого винаходу, буде складатися тільки з амінокислотних залишків, що зустрічаються в природі, головним чином, амінокислот, що кодуються генетичним кодом.

Під "нуклеїною кислотою" розуміють дезоксирибо- або рибонуклеотиди та їх полімери у або одно- або двохспиральній формі. Цей термін застосовують взаємозамінне з геном, кДНК, мРНК, олігонуклеотидом та полінуклеотидом.

Амінокислоти можуть бути тут зазначені або у загальновідомому трьохлітерному вигляді або у однолітерному вигляді, рекомендованому відповідно біохімічної номенклатури комісії IUPAC-IUB. Нуклеотиди також можуть бути позначені відповідно до їх загальноприйнятого однолітерного кодування.

Під застосуванням тут терміном "послідовність білка Rv3616с" мається на увазі послідовність поліпептиду Rv3616с, наведена у SEQ ID No:1 або її гомологія від видів *Mycobacterium tuberculosis* комплекс, наприклад, від видів *M. tuberculosis*, *M. Bovis*, *M. africanum* або від екзогенних або умовно-патогенних видів *Mycobacterium*, що викликають умовно-патогенні інфекції, як то інфекції легенів у хазяїв з імунodefіцитом (наприклад, пацієнтів з ВІЛ), наприклад, BCG, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. celatum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. vaccae*, *M. fortuitum* та *M. scrofulaceum* (див., наприклад, Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966, 16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005).

Для забезпечення високого рівня ефективності серед вакцинованих хазяїв, компоненти вакцини повинні добре зберігатися серед клінічно значущих штамів. Відповідно, білок Rv3616с походить від *M. tuberculosis* H37Rv (тобто, поліпептидна послідовність, надана у SEQ ID No:1) або його гомологи з інших штамів *M. tuberculosis* (як то, штамів CDC1551, F11, Haarlem A та C). Штами *M. Tuberculosis*, що пов'язані зі стійкістю до ліків (наприклад, MDR або, головним чином, XDR) є особливо цінною основою для послідовності Rv3616с білку дикого типу. Штами, що викликають інтерес охоплюють:

CDC1551 - вірулентний штам, що може передаватися.

Родину Haarlem (як то Haarlem A) – стійкі до ліків штамів, знайдені у переповнених популяціях людини. Штами *M. tuberculosis*, що є членами цієї родини, зустрічаються у будь-якій частині світу. Першого представника родини відкрили у місті Гарлем, Нідерланди.

KZN4207 – стійкий до ліків ізолят, вилучений у пацієнтів у KwaZulu-Natal, Південна Африка.

KZN1435 - стійкий до багатьох ліків (MDR) ізолят, вилучений у пацієнтів у KwaZulu-Natal, Південна Африка.

KZN605 – ізолят з широкою стійкістю до ліків (XDR), вилучений у пацієнтів у KwaZulu-Natal, Південна Африка.

C – штам з високим ступенем передачі з Нью-Йорку. У одних дослідженнях було знайдено, що цей штам був більш розповсюджений серед споживачів ін'єкційних наркотиків та був стійким до реакційних проміжних азоту (Friedman et al. J. Infect. Dis. 1997 176(2):478-84).

94\_M4241A - виділений у Сан - Франциско у 1994 р. у пацієнта, що народився у Китаї. Цей штам було попередньо проаналізовано геномним делеційним аналізом (Gagneux et al., PNAS 2006 103(8):2869-2873).

02\_1987 - виділений у Сан - Франциско у 2002 р. з пацієнта, що народився у Південній Кореї. Цей штам було попередньо проаналізовано геномним делеційним аналізом (Gagneux et al., PNAS 2006 103(8):2869-2873).

T92 - виділений у Сан – Франциско у 1999 р. у пацієнта, народженого у Філіпінах. Про цей штам надруковано у Hirsh et al. PNAS 2004 101:4871–4876).

T85 - виділений у Сан - Франциско у 1998 р. у пацієнта, народженого у Китаї. Про цей штам надруковано у Hirsh et al. PNAS 2004 101:4871–4876).

EAS054 - виділений у Сан - Франциско у 1993 р. у пацієнта, що народився в Індії. Цей штам було попередньо проаналізовано геномним делеційним аналізом (Gagneux et al., PNAS 2006 103(8):2869-2873).

Gagneux et al., PNAS 2006 103(8):2869-2873 та Herbert et al. Infect. Immun. 2007 75(12):5798-5805 наводять цінну довідкову інформацію про ряд відомих існуючих штамів *M. tuberculosis*.

Найбільш відповідним чином, білок Rv3616с було вибрано від поліпептидних послідовностей, наведених у SEQ ID 1 та 3-7, зокрема, SEQ ID 1 та 3-6, наприклад, SEQ ID No:1. Вирівнювання SEQ ID 1 та 3-7 наведено у Фіг. 15.

3 модифікованих білків Rv3616с окремий інтерес викликають ті, що містять (наприклад, складаються з) SEQ ID No:161-169.

Полінуклеотиди, що викликають окремий інтерес походять від послідовностей дикого типу, відповідних вищезазначеним штамам *M. Tuberculosis*, наприклад, що походять від SEQ ID No: 2 або від спорідненої з ними *E. coli* кодон - оптимізованою SEQ ID No:160.

Послідовність, що містить модифіковані білки Rv3616с (або пов'язані з ними полінуклеотиди) заявленого винаходу може, крім того, містити інші компоненти, розроблені для підсилення їх імуногенності або для поліпшення цих антигенів в інших аспектах. Наприклад, поліпшеному виділенню поліпептидних антигенів можна сприяти додаванням відрізків гістидинових залишків (звичайно відомих, як his-tag) до одного кінця антигену.

Термін "his-tag" має відношення до низки гістидинових залишків, типово у шість залишків, що вставлені у послідовність зразка. Для мінімізування порушення активності, пов'язаного з послідовністю зразка, звичайно his-tag вставляють до N-кінця, зазвичай безпосередньо після ініціювання метіонінового залишку або іншого на C - кінці. Вони звичайно є гетерологічними до нативній послідовності, але здатні до включення, оскільки сприяють виділенню шляхом поліпшення зв'язування білка з іммобілізованими смолами у афінній хроматографії з застосуванням іммобілізованих металів (IMAC). Звичайно, розмова про присутність або відсутність не має значення з точки зору виявлення бажаної імунної відповіді проти референсного білка. Однак, для уникнення ризику несприятливої реакції проти самих his-tag, вважається кращим звести до мінімуму їх довжину, наприклад, до чотирьох або менше залишків, зокрема, до двох залишків або взагалі повністю виключити застосування his-tag.

Для підвищення величини та/або розмірів викликаного імунної відповіді, композиції, поліпептиди (та нуклеїнові кислоти, що їх кодують), можуть бути отримані у такому вигляді, щоб вони містили численні модифіковані послідовності Rv3616с та/або додаткові гетерологічні поліпептиди або полінуклеотиди, що їх кодують, отримані з видів *Mycobacterium* (зокрема, *M. tuberculosis*).

Досвідченому фахівцю зрозуміло, що коли у комбінації застосовано декілька компонентів, то точне відтворення може змінюватись. Наприклад, модифікований компонент послідовності Rv3616с та додаткова копія антигену або додатковий гетерологічний антигенний компонент можуть бути відтворені у вигляді:

- (1) двох індивідуальних поліпептидних компонентів;
- (2) гібридного білку, що містить обидва поліпептидні компоненти;
- (3) одного поліпептидного та одного полінуклеотидного компонента;
- (4) двох індивідуальних полінуклеотидних компонентів;
- (5) одиничного полінуклеотиду, що кодує два індивідуальних поліпептидних
- (6) компонента; або одиничного полінуклеотиду, що кодує гібридний білок, що містить обидва поліпептидні компоненти.

Така гнучкість в рівній мірі відноситься до ситуацій, де у комбінації застосовано три або більше компонентів. Однак, часто для зручності є бажаним, щоб при наявності кількох компонентів, вони були розміщені у одиничному гібридному білку або у полінуклеотиді, що кодує одиничний гібридний білок. У одному втіленні винаходу всі антигенні компоненти надано у вигляді поліпептидів (наприклад, у одиничному гібридному білку). У альтернативному втіленні винаходу всі антигенні компоненти надано у вигляді полінуклеотидів (наприклад, одиничного полінуклеотиду, що кодує одиничний гібридний білок).

Термін "гетерологічний" при застосуванні з посиланням на частини нуклеїнової кислоти вказує на те, що нуклеїнова кислота містить дві або більше підпослідовностей, що не зустрічаються з подібним взаємним розташуванням одна до іншої у природі. Наприклад, нуклеїнова кислота, що типово є рекомбінантно отриманою, має дві або більше послідовностей з неспорідненими генами, розташованими, щоб створити нову функціональну нуклеїнову кислоту, наприклад, а промотором з одного джерела та з кодуючим регіоном з іншого джерела. Подібним чином, гетерологічний білок вказує на те, що білок містить дві або більше підпослідовностей, що не зустрічаються з подібним взаємним розташуванням одна до іншої у природі. (наприклад, гібридний білок).

Термін "Гібридний (злитий) поліпептид" або "гібридний білок" (fusion protein) стосується білка, що має принаймні два гетерологічних поліпептиди (наприклад, принаймні два поліпептиди *Mycobacterium* sp.), ковалентно пов'язані між собою, або безпосередньо або крізь амінокислотний лінкер. Поліпептиди, що утворюють гібридний білок типово пов'язані C-кінцем до N-кінця, хоча вони також можуть бути пов'язані C-кінцем до C-кінця, N-кінцем до N-кінця або N-кінцем до C-кінця. Поліпептиди гібридного білку можуть бути розміщені в будь-якому порядку. Цей термін також стосується консервативно змінених варіантів, поліморфних варіантів, алелей, мутантів, імуногенних фрагментів та міжвидових гомологів антигену, що входять до складу гібридного білка. Антигени *Mycobacterium tuberculosis* описано у Cole et al., Nature 393:537 (1998), що висвітлює повний геном *Mycobacterium tuberculosis*. Антигени інших видів *Mycobacterium*, що відповідають антигенам *M. tuberculosis* можуть бути ідентифіковані, наприклад, з застосуванням, як тут описано, алгоритмів порівняння послідовності або інших

відомих фахівцям способів, наприклад, гібридизації та зв'язування антитіл.

Термін "злитий" стосується ковалентного зв'язку між двома поліпептидами у гібридному білку. Звичайно поліпептиди з'єднані пептидним зв'язком або безпосередньо один до іншого або через амінокислотний лінкер. Вибірково, пептиди можуть бути з'єднані непептидними ковалентними зв'язками, відомими фахівцям. Зразкові антигени M. Tuberculosis, що можуть бути скомбіновані з модифікованою послідовністю Rv3616с охоплюють один або декілька з (наприклад, 1-5, 1-3, зокрема 1) наступного:

(i) послідовність поліпептиду Mtb8.4 (також відома, як DPV та Rv1174с), що описана у SEQ ID No:102 у WO97/09428 (кДНК у SEQ ID No:101) та у Coler et al Journal of Immunology 1998 161:2356-2364. Окремий інтерес викликає зріла послідовність Mtb8.4, що позбавлена головного сигнального пептиду (тобто амінокислотних залишків 15-96 з SEQ ID No:102 °F WO97/09428). Повнорозмірна послідовність поліпептиду Mtb8.4 показана у SEQ ID No: 8;

(ii) послідовність поліпептиду Mtb9.8 (також відома, як MSL та Rv0287), описана, як SEQ ID No:109 у WO98/53075 (фрагменти MSL є у SEQ ID Nos: 110-124 у WO98/53075, SEQ ID Nos: 119-120 також викликають окремий інтерес) та також у Coler et al Vaccine 2009 27:223-233 (зокрема, реагуючі фрагменти показано тут у Фіг. 2). Повнорозмірну поліпептидну послідовність для Mtb9.8 показано у SEQ ID No: 9;

(iii) послідовність поліпептиду Mtb9.9 (також відома, як Mtb9.9A, MTI, MTI-A та Rv1793) що описана у SEQ ID No:19 °F WO98/53075 та у Alderson et al Journal of Experimental Medicine 2000 7:551-559 (фрагменти MTI виявлені у SEQ ID Nos: 17, 51-66 у WO98/53075, SEQ ID Nos: 17, 51, 52, 53, 56 та 62-65 також викликають окремий інтерес). Кілька поліпептидних варіантів MTI описано у SEQ ID Nos: 21, 23, 25, 27, 29, 31 у WO98/53075 та у Alderson et al Journal of Experimental Medicine 2000 7:551-559. Повнорозмірну послідовність поліпептиду для Mtb9.9 показано у SEQ ID No:10;

(iv) послідовність поліпептиду Ra12 (також відома, як Mtb32A C-кінцевий антиген), що описана у SEQ ID No:10 у WO01/98460 та у Skeiky et al Journal of Immunology 2004 172:7618-7682. Повнорозмірну послідовність поліпептиду для Ra12 показано у SEQ ID No:11;

(v) послідовність поліпептиду Ra35 (також відома, як Mtb32A N-кінцевий антиген), що описана у SEQ ID No: 8 °F WO01/98460 та у Skeiky et al Journal of Immunology 2004 172:7618-7682. Повнорозмірну послідовність поліпептиду для Ra35 показано у SEQ ID No:12;

(vi) послідовність поліпептиду TbH9 (також відома, як Mtb39, Mtb39A, TbH9FL та Rv1196), що описана у SEQ ID No:107 у WO97/09428, та також у Dillon et al Infection and Immunity 1999 67(6):2941-2950 та Skeiky et al Journal of Immunology 2004 172:7618-7682. Повнорозмірну послідовність поліпептиду для TbH9 показано у SEQ ID No:13; (vii) послідовність поліпептиду Mtb41 (також відома, як MTCC2 та Rv0915с), що описана у SEQ ID No:142 у WO98/53075 (кДНК у SEQ ID No:140) та у Skeiky et al Journal of Immunology 2000 165:7140-7149. Повнорозмірну послідовність поліпептиду для Mtb41 показано у SEQ ID No:14;

(viii) послідовність поліпептиду ESAT-6 (також відома, як esxA та Rv3875), що описана у SEQ ID No:103 у WO97/09428 (кДНК у SEQ ID No:104) та у Sorensen et al Infection and Immunity 1995 63(5):1710-1717. Повнорозмірну послідовність поліпептиду для ESAT-6 показано у SEQ ID No:15.L. Sorensen, S. Nagai, G. Houen, P. Andersen and A.B. Andersen, Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis, Infect Immun 63 (1995) (5), pp. 1710-1717;

(ix) комплексні антигени Ag85 (наприклад, Ag85A, також відомий, як fbpA та Rv3804с; або Ag85B, також відомий, як fbpB та Rv1886с), що обговорювалися, наприклад, у Content et al Infection and Immunity 1991 59:3205-3212 та у Huugen et al Nature Medicine 1996 2(8):893-898. Повнорозмірну послідовність поліпептиду для Ag85A показано у SEQ ID No:16 (зрілий білок залишків 43-338, тобто з втраченим сигнальним пептидом, також викликає окремий інтерес). Повнорозмірну послідовність поліпептиду для Ag85B показано у SEQ ID No:17 (зрілий білок залишків 41-325, тобто з втраченим сигнальним пептидом, також викликає окремий інтерес);

(x) альфа - кристалін (також відомий, як hspX та Rv2031с), що описаний у Verbon et al Journal of Bacteriology 1992 174:1352-1359 та у Friscia et al Clinical and Experimental Immunology 1995 102:53-57 (Окремий інтерес викликають фрагменти, що відповідають залишкам 71-91, 21-40, 91-110 та 111-130)). Повнорозмірну послідовність поліпептиду для альфа-кристаліну показано у SEQ ID No:18;

(xi) Mpt64 (також відома, як Rv1980с) що описана у Roche et al Scandinavian Journal of Immunology 1996 43:662-670. Повнорозмірну послідовність поліпептиду для MPT64 показано у SEQ ID No:19 (зрілий білок залишків 24-228, тобто з втраченим сигнальним пептидом, також викликає окремий інтерес);

(xii) Mtb32A, що описана у SEQ ID No: 2 (повнорозмірна) та залишки 8-330 SEQ ID No: 4

(зріла) у WO01/98460, головним чином, варіанти мають принаймні одну мутовану каталітичну тріаду (наприклад, каталітичний залишок серину, що може, наприклад, бути мутованим на аланін). Повнорозмірну послідовність поліпептиду для Mtb32A показано у SEQ ID No: 20. Зрілу форму Mtb32A, що має a Ser/Ala мутацію показано у SEQ ID No: 21; (xiii) TB10.4, повнорозмірну послідовність поліпептиду для TB10.4 показано у SEQ ID No: 22

.L. Sorensen, S. Nagai, G. Houen, P. Andersen and A.B. Andersen, Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect Immun* 63 (1995) (5), pp. 1710–1717; (xiv) Rv1753c, повнорозмірну послідовність поліпептиду для Rv1753c з *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv показано у SEQ ID No:157;

(xv) Rv2386c, повнорозмірну послідовність поліпептиду для Rv2386c з *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv показано у SEQ ID No:158; та/або

(xvi) Rv2707c, повнорозмірну послідовність поліпептиду для Rv2707c з *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv показано у SEQ ID No:159.

Або їх комбінації, як то:

(a) комбінація компонентів Ra12, TbH9 та Ra35, наприклад, у вигляді гібридного білку, як то Mtb72f. Послідовність поліпептиду Mtb72f показана у SEQ ID No: 6 у WO2006/117240 (кДНК у SEQ ID No: 5) та у Skeiky et al *Journal of Immunology* 2004 172:7618-7682 (де вона вибірково містить His-tag для сприяння очищення, при застосуванні у заявленому винаході, відповідно, Mtb72f позбавлена вибірових гістидинових залишків). Послідовність поліпептиду для Mtb72f показана у SEQ ID No: 23;

(b) комбінація компонентів Ra12, TbH9 та Ser/Ala мутованого Ra35 (тобто, де каталітичний сериновий залишок заміщено на аланін), наприклад, у вигляді гібридного білку, як то M72. Послідовність поліпептиду M72 показана у SEQ ID No: 4 у WO2006/117240 (кДНК у SEQ ID No: 3) де вона містить вибіровий подвійний гістидин для сприяння у виробництві, при застосуванні у заявленому винаході M72 може також включати подвійний гістидин, хоча, відповідно, у M72 вибіровий подвійний гістидин відсутній (тобто, залишки 4-725 з SEQ ID No: 4 у WO2006/117240 викликають окремий інтерес). Послідовність поліпептиду для M72 показана у SEQ ID No: 24;

(c) комбінація компонентів Mtb8.4, Mtb9.8, Mtb9.9 та Mtb41, наприклад, у вигляді гібридного білку, як то Mtb71f. Послідовність поліпептиду Mtb71f показана у SEQ ID No:16 у WO99/051748 (кДНК у SEQ ID No:15), де вона містить вибіровий His-tag для сприяння очищення, при застосуванні у заявленому винаході, відповідно, Mtb71f відповідає амінокислотним залишкам 9-710 у SEQ ID NO:16 з WO99/051748. Послідовність поліпептиду для Mtb71f показана у SEQ ID No: 25;

(d) комбінація компонентів Mtb72f або M72 (відповідно, без вибірових гістидинових залишків для сприяння експресії) з Mtb9.8 та Mtb9.9, наприклад, у гібридному білку. Послідовність поліпептиду для гібриду M72-Mtb9.9-Mtb9.8 показана у SEQ ID No: 26 (гібрид M92), при застосуванні у заявленому винаході, гібрид M72-Mtb9.9-Mtb9.8 може вибірково містити подвійний гістидин слідом за ініціаторним метіоніновим залишком для сприяння у виробництві;

(e) комбінація компонентів Mtb72f або M72 (відповідно, без вибірових гістидинових залишків для сприяння експресії) з Ag85B, наприклад, у вигляді гібридного білку, як-то Mtb103f. Послідовність поліпептиду Mtb103f описана у SEQ ID No:18 з WO03/070187 (кДНК у SEQ ID No:10), де вона містить вибіровий His-tag для сприяння очищення, при застосуванні у заявленому винаході, відповідно, Mtb103f відповідає амінокислотним залишкам 8-1016 у SEQ ID No:18 з WO03/070187. Також, окремий інтерес викликає M103, тобто Mtb103f, що містить Ser/Ala мутацію у Ra35 компоненті, при застосуванні у заявленому винаході, відповідно, M103 відповідає амінокислотним залишкам 8-1016 у SEQ ID No:18 з WO03/070187, де сериновий залишок у позиції 710 заміщений на аланін. Послідовність поліпептиду для M103 показана у SEQ ID No: 27, при застосуванні у даному винаході, гібрид M72-Mtb9.9-Mtb9.8 може вибірково містити подвійний гістидин слідом за ініціаторним метіоніновим залишком для сприяння у виробництві;

(f) комбінація компонентів Mtb72f або M72 (відповідно, без вибірових гістидинових залишків для сприяння експресії) з Mtb41, наприклад, у вигляді гібридного білку, як то Mtb114f. Послідовність поліпептиду Mtb114f описана у SEQ ID No:16 у WO03/070187 (кДНК у SEQ ID No: 9), де вона містить вибіровий His-tag для сприяння очищення, при застосуванні у заявленому винаході, відповідно, Mtb114f відповідає амінокислотним залишкам 8-1154 SEQ ID No:16 з WO03/070187. Також, окремий інтерес викликає M114, тобто Mtb114f incorporating a Ser/Ala мутації у Ra35 компонент, при застосуванні у заявленому винаході, відповідно, M114 відповідає амінокислотним залишкам 8-1154 у SEQ ID No:16 з WO03/070187, де сериновий залишок у позиції 710 заміщений аланіном. Послідовність поліпептиду для M114 показана у SEQ ID No: 28, при застосуванні у заявленому винаході, гібрид M72-Mtb9.9-Mtb9.8 може вибірково подвійний

гістидин слідом за ініціаторним метіоніновим залишком для сприяння виробництва;

(g) комбінація компонентів Ag85B та ESAT-6, наприклад, у гібриді, описаному у Doherty et al *Journal of Infectious Diseases* 2004 190:2146–2153; та/або

(h) комбінація компонентів Ag85B та TB10.4, наприклад, у гібриді, описаному у Dietrich et al *Journal of Immunology* 2005 174(10):6332-6339 190:2146–2153.

Окремий інтерес викликають комбінації компонента модифікованої послідовності Rv3616с та компонента Rv1753с. Очевидно, що подібні комбінації можуть вибірково містити інші додаткові антигенні компоненти (наприклад, компоненті M72).

Інші інтересуючі комбінації містять компонент модифікованої послідовності Rv3616с та компонент M72.

Наступні інтересуючі комбінації містять компонент модифікованої послідовності Rv3616с та компонент Rv2386с.

Інші інтересуючі комбінації охоплюють комбінації, що містять компонент модифікованої послідовності Rv3616с та компонент Rv2707с.

Додаткові інтересуючі комбінації містять компонент модифікованої послідовності Rv3616с та альфа - кристаліновий компонент.

Досвідченому фахівцю зрозуміло, що комбінації не повинні спиратися на специфічні послідовності, описані вище у (i)-(xvi) та (a)-(h) та що консервативно модифіковані варіанти (наприклад, що мають принаймні 70 % тотожності, як то принаймні 80 % тотожності, зокрема, принаймні 90 % тотожності та, головним чином, принаймні 95 % тотожності) або імуногенні фрагменти (наприклад, принаймні 20 % повнорозмірного антигену, як то принаймні 50 % антигену, зокрема, принаймні 70 % та, головним чином, принаймні 80 %) описаної послідовності можуть бути застосовані для досягнення того ж практичного ефекту.

Кожна з вищезгаданих індивідуальних антигенних послідовностей також висвітлена у Cole et al *Nature* 1998 393:537-544 та Camus *Microbiology* 2002 148:2967-2973. Генوم H37Rv *M. tuberculosis* є загальнодоступним, наприклад, на веб - сайті Welcome Trust Sanger Institute ([www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/)) та в інших джерелах.

Багато вищезгаданих антигенів також описано у U.S. patent application №№ 08/523,435, 08/523,436, 08/658,800, 08/659,683, 08/818,111, 08/818,112, 08/942,341, 08/942,578, 08/858,998, 08/859,381, 09/056,556, 09/072,596, 09/072,967, 09/073,009, 09/073,010, 09/223,040, 09/287,849 та у PCT patent applications PCT/US98/10407, PCT/US98/10514, PCT/US99/03265, PCT/US99/03268, PCT/US99/07717, WO97/09428 та WO97/09429, WO98/16645, WO98/16646, кожна з яких включена тут в якості посилання.

Композиції, поліпептиди та нуклеїнові кислоти винаходу також можуть містити додаткові поліпептиди з інших джерел. Наприклад, композиції та гібридні білки винаходу можуть містити поліпептиди або нуклеїнові кислоти, що кодують поліпептиди, де поліпептид підсилює експресію антигену, наприклад, NS1, білка вірусу грипу (див., наприклад, WO99/40188 та WO93/04175). Нуклеїнові кислоти винаходу можуть бути побудовані на основі невинного застосування кодонів (codon preference) у вибраних видах, наприклад, у людині (у випадку експресії *in vivo*) або у окремих бактеріях (у випадку продукування поліпептиду). SEQ ID No:160 наприклад, стосується кодон - оптимізованого полінуклеотиду для експресії Rv3616с від послідовності H37Rv у *E. coli*.

Модифікований компонент послідовності Rv3616с може також бути введено з одним або декількома хіміотерапевтичними агентами, ефективними проти туберкульозу (наприклад, проти інфекції *M. tuberculosis*). Приклади таких хіміотерапевтичних агентів охоплюють, але без обмеження, амікацин, аміносаліцилову кислоту, капреоміцин, циклосерин, етамбутол, етіонамід, ізоніазид, канаміцин, піразинамід, рифаміцинів (тобто, рифампіцин, рифабутин та рифампентин), стрептоміцин, офлоксацин, ципрофлоксацин, кларитроміцин, азитроміцин та фторхінолони. Таку хіміотерапію призначають за рішенням лікаря з застосуванням найбільш прийнятної лікарської комбінації. Хіміотерапевтичні агенти першої лінії, застосовані для лікування нестійкого до ліків туберкульозу (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*), охоплюють ізоніазид, рифампіцин, етамбутол, піразинамід та стрептоміцин. Хіміотерапевтичні агенти другої лінії, застосовані для лікування туберкульозу, (наприклад, інфекції *M. tuberculosis*), що проявляє стійкість до одного або декількох ліків першої лінії охоплюють офлоксацин, ципрофлоксацин, етіонамід, аміносаліцилову кислоту, циклосерин, амікацин, канаміцин та капреоміцин. Загальноприйнятні хіміотерапевтичні агенти звичайно вводять протягом відносно тривалого періоду (біля 9 місяців). Комбінація загальноприйнятних хіміотерапевтичних агентів з введенням компонента модифікованої послідовності Rv3616с відповідно до заявленого винаходу може дозволити скоротити період хіміотерапевтичного лікування (наприклад, до 8 місяців, 7 місяців, 6 місяців, 5 місяців, 4 місяців, 3 місяців або менше) без зниження ефективності.



Окремий інтерес викликає застосування компонента модифікованої послідовності Rv3616с у поєднанні з *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), наприклад, у вигляді модифікованої BCG, що рекомбінантно експресує модифікований білок Rv3616с. Альтернативно, компонент модифікованої послідовності Rv3616с може бути застосований для підвищення відповіді суб'єкта до вакцинації з BCG або шляхом спільного введення або бустер - імунізації з попередньою вакцинацією з BCG. При застосуванні для підвищення відповіді суб'єкта до вакцинації з BCG, компонент модифікованої послідовності Rv3616с, звичайно, може бути надано у вигляді поліпептиду або полінуклеотиду (вибірково, у поєднанні з вищевказаними додатковими антигенними компонентами).

Досвідченому фахівцю відомі комбінації компонентів, що не потребують спільного введення та яких можна застосувати окремо або у комбінації; в той же час, послідовно або протягом короткого періоду, одним або різними шляхами. Тим не менше, для зручності звичайно бажаним є (при сумісності режимів введення) вводити комбінацію компонентів у вигляді одиначної композиції.

Поліпептиди, полінуклеотиди та композиції заявленого винаходу звичайно призначають людям але, очікується, що вони будуть ефективними для інших ссавців, в тому числі, для хатніх ссавців (наприклад, собак, кішок, кроликів, щурів, мишей, морських свинок, хом'яків, шиншил) та сільськогосподарських ссавців (наприклад, корів, свиней, овець, кіз, коней).

T - клітинні епітопи є короткими суміжними послідовностями амінокислот, що впізнають T - клітини (наприклад, T- клітини CD4+ або CD8+). Ідентифікація T - клітинних епітопів може бути досягнута за допомогою відомих фахівцям експериментів по картуванню епітопів (див.,наприклад, Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (1993); Beißbarth et al *Bioinformatics* 2005 21(Suppl. 1):i29-i37). Альтернативно, епітопи можна передбачити та картувати з застосуванням підходів, розглянутих у Прикладах.

У неоднорідній безпородній популяції, наприклад, людей, наявність різних типів HLA означає, що окремі епітопи можуть не розпізнаватися всіма членами популяції. В результаті вирішальної участі T - клітинної відповіді у туберкульозі, для максимізування рівня впізнавання та шкали імунної відповіді, оптимально модифікований білок Rv3616с є тим, що містить більшість (або, відповідно, всі) T- клітинних епітопів в інтактному стані.

"Варіанти" або "консервативно модифіковані варіанти" мають відношення до амінокислотних послідовностей та послідовностей нуклеїнових кислот. Відносно окремих послідовностей нуклеїнових кислот, консервативно модифіковані варіанти мають відношення до нуклеїнових кислот, що кодують ідентичні або суттєво ідентичні амінокислотні послідовності або, якщо нуклеїнові кислоти не кодують амінокислотну послідовність до суттєво ідентичних послідовностей. У зв'язку з виродженням генетичного коду, велика кількість функціонально ідентичних нуклеїнових кислот кодують будь-який обраний білок. Наприклад, кодони GCA, GCC, GCG та GCU всі кодують амінокислоту аланін. Отже, у кожній позиції, де аланін визначається кодоном, цей кодон може бути замінено будь-яким з відповідних описаних кодонів без змінення закодованого поліпептиду. Такі змінення нуклеїнових кислот ведуть до появи "тихих" або "дегенеративних" варіантів, що є одним з видів консервативно модифікованих варіантів. Тут кожна послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид також описує кожне можливе "тихе" змінення нуклеїнової кислоти. Будь-якому фахівцю зрозуміло, що кожен кодон нуклеїнової кислоти (за виключенням AUG, що звичайно є тільки метіоніновим кодоном та TGG, що звичайно є тільки триптофановим кодоном) можна замінити з отриманням функціонально ідентичної молекули. Відповідно, кожне "тихе" змінення нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид передбачено у кожній описаній послідовності. "Не - тихі" змінення є такими, що ведуть до змінень у кодуючій амінокислотній послідовності (заміщенням, видаленням або додаванням амінокислотних залишків). Фахівцям зрозуміло, що певна полінуклеотидна послідовність може містити як "тихі", так і "не - тихі" консервативні змінення. Відносно заміщень білкової послідовності, то досвідченому фахівцю зрозуміло, що окремі заміщення, видалення або додавання до поліпептиду, що змінюють, видаляють або додають одиничні амінокислоти або невеликий відсоток амінокислот відноситься до "консервативно модифікованого варіанту", де змінення ведуть до заміни амінокислоти на функціонально подібну амінокислоту або до заміщення/видалення/додавання залишків, що суттєво не впливає на біологічну функцію варіанту. Таблиці консервативних заміщень, що стосуються подібних функціональних амінокислот є добре відомими. Подібні консервативно модифіковані варіанти також не виключають поліморфні варіанти, міжвидові гомологи та алелі винаходу. Головним чином, подібні консервативні заміни будуть припадати на одну з амінокислотних груп, зазначених нижче, хоча в деяких обставинах, можлива заміна без істотного впливу на імуногенні властивості антигену. З наступних восьми груп кожна містить амінокислоти, які є типовими

консервативними заміщеннями одних на інші:

- 1) Аланін (A), Гліцин (G);
  - 2) Аспарагінова кислота (D), Глутамінова кислота (E);
  - 3) Аспарагін (N), Глутамін (Q);
  - 4) Аргінін (R), Лізин (K);
  - 5) Ізолейцин (I), Лейцин (L), Метіонін (M), Валін (V);
  - 6) Фенілаланін (F), Тирозин (Y), Триптофан (W);
  - 7) Серин (S), Треонін (T);
  - 8) Цистеїн (C), Метіонін (M)
- (див., наприклад, Creighton, Proteins 1984).

Відповідно, такі заміщення не проводять у ділянці епітопа, отже, вони не мають значного впливу на імуногенні властивості антигену.

Білкові варіанти можуть також охоплювати варіанти з вставленою додатковою амінокислотою порівняно з референсною послідовністю. Відповідно, подібні вставки не проводять у ділянці епітопа, отже, вони не мають значного впливу на імуногенні властивості антигену. Одним прикладом подібних вставок є короткі відрізки гістидинових залишків (наприклад, 2-6 залишків), що застосовують для сприяння експресії та/або очищення антигену.

Білкові варіанти можуть також охоплювати варіанти з видаленою амінокислотою порівняно з референсною послідовністю. Відповідно, подібні видалення не проводять у ділянці епітопа, отже, вони не мають значного впливу на імуногенні властивості антигену.

Досвідченому фахівцю зрозуміло, що певні білкові варіанти можуть містити заміщення, видалення та додавання (або їх будь-які комбінації).

Терміни "ідентичність" або відсоток "ідентичності", у контексті двох або більше нуклеїнових кислот або послідовностей поліпептидів, має відношення до двох або більше послідовностей або суб-послідовностей що є схожими або мають певний відсоток однакових амінокислотних залишків або нуклеотидів (тобто, 70 % тотожності, вибірково 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % тотожності у певному регіоні), що при порівнянні та вирівнюванні для максимальної відповідності через вікно порівняння або призначений регіон вимірюють за допомогою одного з наступних алгоритмів порівняння послідовності або вирівнюванням вручну та візуальним оглядом. Потім подібні послідовності вважаються "істотно ідентичними". Це визначення також стосується компліменту тестової послідовності. Вибірково, тотожність існує у регіоні, що має довжину, принаймні, біля 25-50 амінокислот або нуклеотидів або, вибірково, у регіоні, що має довжину, принаймні, біля 75-100 амінокислот або нуклеотидів. Відповідно, порівняння проводять у вікні, що відповідає всій довжині референсної послідовності (порівняно з варіантною послідовністю).

Звичайно, для послідовного порівняння, одна послідовність є у якості референсної послідовності, до якої порівнюють тестові послідовності. При застосуванні алгоритму порівняння послідовності, до комп'ютера вводять тестові та референсні послідовності та, у разі необхідності, визначають координати послідовностей та програмні параметри алгоритму послідовності. Також можуть бути застосовані програмні параметри за замовчуванням або визначені альтернативні параметри. Далі, за допомогою алгоритму порівняння послідовності обчислюють відсоток тотожностей тестових послідовностей щодо референсної послідовності на основі програмних параметрів.

"Вікно порівняння", як тут застосовано, має відношення до сегменту, у якому послідовність можна порівняти з референсною послідовністю з тією ж кількістю суміжних позицій після оптимального вирівнювання двох послідовностей. Способи вирівнювання послідовностей для порівняння добре відомі. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути проведено, наприклад, за допомогою алгоритму місцевої гомології від Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), за допомогою алгоритму вирівнювання гомології від Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), за допомогою способу пошуку подібностей від Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), комп'ютеризованими втіленнями цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA, TFASTA у Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) або вирівнюванням вручну та візуальним оглядом (див., наприклад, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).

Одним прикладом корисного алгоритму є PILEUP. PILEUP створює численні послідовні вирівнювання з групою споріднених послідовностей з застосуванням прогресивних, попарних вирівнювань для того, щоб показати спорідненість та відсоток ідентичності послідовностей. Він також дозволяє накреслити дерево або дендрограму, що показує застосовану для отримання вирівнювання кластеризацію спорідненостей. У PILEUP застосовано спрощення способу

прогресивного вирівнювання від Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987). Застосований спосіб є подібним до описаного у Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989). Програма може вирівняти до 300 послідовностей, кожен з максимальною довжиною у 5,000 нуклеотидів або амінокислот. Численні процедури вирівнювання починаються з попарного вирівнювання двох найбільш подібних послідовностей з отриманням кластеру двох вирівнених послідовностей. Цей кластер потім вирівнюють до наступних найбільш споріднених послідовностей або до кластеру вирівнених послідовностей. Два кластери послідовностей вирівнюють за допомогою простого розширення попарного вирівнювання двох індивідуальних послідовностей. Кінцеве вирівнювання проводять за допомогою серії прогресивних, попарних вирівнювань. Програма визначає специфічні послідовності та їх амінокислотні або нуклеотидні координати для ділянок послідовного порівняння та встановлює програмні параметри. За допомогою PILEUP, референсну послідовність порівнюють з іншими тестовими послідовностями для визначення відсотка тотожності послідовності з застосуванням наступних параметрів: вага пробілу за замовчуванням (3.00), довжина пробілу за замовчуванням (0.10) та зважені кінцеві пробіли. PILEUP можна отримати з набору GCG sequence analysis software package, наприклад, версії 7.0 (Devereaux et al., Nuc. Acids Res. 12:387-395 (1984)).

Іншими прикладами прийнятних алгоритмів визначення відсотка тотожності та подібності послідовності є алгоритми BLAST та BLAST 2.0, описані у Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) та Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), відповідно. Програмне забезпечення для проведення BLAST - аналізу є загальнодоступним від National Center for Biotechnology Information (БЕФ - сайт на [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Цей алгоритм спочатку полягає у ідентифікації пар послідовностей з максимальною схожістю (HSP) шляхом ідентифікації коротких "слів" довжиною W у послідовності запиту, що або відповідають або задовольняють деякому позитивно оціненому граничному параметру T при вирівнюванні зі "словом" однакової довжини у послідовності бази даних. T тут позначено, як показник границь сусідньої групи (Altschul et al., *supra*). Ці початкові сусідні співпадіння "слів" діють як первісний матеріал для початкових пошуків довших HSP, що їх містять. Співпадіння "слова" поширюються у обох напрямках вздовж кожної послідовності до тих пір, доки може бути збільшено сукупне значення вирівнювання. Сукупні значення обчислюють з застосуванням, для нуклеотидних послідовностей, параметрів M (заохочувальне значення для пари залишків, що співпадають; завжди  $> 0$ ) та N (пеня значення для пари залишків, що не співпадають; завжди  $< 0$ ). Для амінокислотних послідовностей, для обчислення сукупного значення застосовують матрицю заміщень. Поширення співпадіння "слова" у кожному напрямку зупиняють у наступних випадках: сукупне значення вирівнювання падає на величину X від свого максимального досягнутого рівня; за рахунок накопичення одного або декількох залишків вирівнювань з негативними значеннями сукупне значення наближується до нуля або нижче; або при досягненні кінця кожної послідовності. Параметри W, T, та X алгоритму BLAST визначають чутливість та швидкість вирівнювання. У програмі BLASTN (для нуклеотидних послідовностей) за замовчуванням застосовують довжину "слова" (W) у 11 нуклеотидів, очікуване значення (E) або 10, M=5, N=-4 та порівняння обох ланцюгів. Для амінокислотних послідовностей, у програмі BLASTP за замовчуванням застосовують довжину "слова" у 3 амінокислоти та очікуване значення (E) у 10, та матрицю заміщень BLOSUM62 (див. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) вирівнювання (B) у 50, очікуване значення (E) у 10, M=5, N=-4, та порівняння обох ланцюгів.

Алгоритм BLAST також виконує статистичний аналіз подібності між двома послідовностями (див., наприклад, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одним з вимірювань подібності, передбаченим алгоритмом BLAST є ймовірність найменшої суми (P(N)), що дає уявлення про ймовірність, з якою буде випадково відбуватися співпадіння між двома нуклеотидними або амінокислотними послідовностями. Наприклад, нуклеїнова кислота вважається подібній до референсної послідовності, якщо ймовірність найменшої суми у порівнянні тестової нуклеїнової кислоти до референсної нуклеїнової кислоти є меншим, ніж приблизно 0.2, більш переважно, меншим, ніж приблизно 0.01, та, ще переважніше, меншим, ніж приблизно 0.001.

У будь-якому випадку, варіанти послідовності поліпептиду будуть мати істотно ту ж саме активність, що і референсна послідовність (у випадку полінуклеотидів, варіантні полінуклеотидні послідовності будуть кодувати поліпептид, що має істотно таку ж саме активність, що і референсна послідовність). Під істотно такою ж саме активністю мається на увазі принаймні 50 %, відповідно, принаймні 75 % та, головним чином, принаймні 90 % активності референсної послідовності у аналізі рестимуляції *in vitro* МКПК або цільної крові зі специфічними антигенами (наприклад, рестимуляції строком від декількох годин до двох тижнів, наприклад, строком від

однієї доби до одного тижня або у 1-2 тижні), що вимірює активування клітин шляхом лімфопроліферації, продукування цитокінів у культуральному супернатанті

(вимірюють за допомогою ІФА, СВА тощо) або характеристики Т та В- клітинних відповідей за допомогою внутрішньо- та позаклітинного забарвлення (наприклад, з застосуванням антитіл, специфічних до імунних маркерів, як то CD3, CD4, CD8, IL2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , CD40L, CD69 etc), після чого слідує аналіз проточною цитометрією. Відповідно, під істотно такою ж саме активністю мається на увазі принаймні 50 %, відповідно, принаймні 75 % та, головним чином, принаймні 90 % активності референсної послідовності у аналізі Т - клітинної проліферації та/або продукування гамма- інтерферону.

Як відомо фахівцям, полінуклеотиди, застосовані у цьому винаході можуть містити геномні, екстра - геномні послідовності, послідовності, що кодуються плазмідами та маленькі рекомбінантні генні сегменти, що експресуються або можуть бути пристосовані до експресії, а також білки, поліпептиди, пептиди тощо. Подібні сегменти можуть бути отримані з природних джерел або синтетично модифіковані людиною.

Як зрозуміло фахівцям, полінуклеотид може бути одноланцюговим (кодуючим або антисенсовим) або двохланцюговим; та може бути молекулою ДНК (геномною ДНК, кДНК або синтетичною ДНК) або РНК. Молекули РНК охоплюють молекули гетерогенної ядерної РНК, що містять інтрони та взаємно-однозначно відповідають молекулам ДНК та молекули мРНК, що не містять інтронів. Також полінуклеотид заявленого винаходу може містити, але необов'язково, додаткові кодуючі або некодуючі послідовності та полінуклеотид може, але необов'язково, бути зв'язаним з іншими молекулами та/або підтримуваними матеріалами.

Полінуклеотид може містити нативну послідовність (тобто, ендегенну послідовність, що кодує антиген *Mycobacterium* або його частину) або може містити варіант або біологічний або функціональний еквівалентої такої послідовності. Варіанти полінуклеотиду можуть містити одне або декілька заміщень, додавань, видалень

та/або вставок таким чином, що імуногенність закодованого поліпептиду не зменшується в порівнянні з референсним білком.

Полінуклеотид можна ідентифікувати, отримати та/або проводити з ним маніпуляції з застосуванням будь-якого з численних добре відомих способів. Наприклад, полінуклеотид можна ідентифікувати, як більш детально описано нижче, скринінгом з кДНК-чипами. Подібні скринінгові дослідження можна проводити, наприклад, з застосуванням мікрочипу Synteni (Palo Alto, CA) відповідно до інструкцій виробника (як докладно описано у Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619 (1996) та у Heller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155 (1997)). Альтернативно, полінуклеотид можна ампліфікувати з кДНК, отриманою з клітин, що експресують описані тут білки, наприклад, з клітин *M. tuberculosis*. Такий полінуклеотид можна ампліфікувати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього, на основі запропонованої тут послідовності, можуть бути розроблені, придбані або синтезовані специфічні до послідовності праймери. Ампліфіковану частину полінуклеотиду можна застосувати для виділення повнорозмірного гену з прийнятною бібліотекою (наприклад, з бібліотеки кДНК *M. tuberculosis*) з застосуванням добре відомих способів. У цих способах проводять скринінг бібліотеки (кДНК або геномною) з застосуванням одного або декількох полінуклеотидних зондів або прийнятних для ампліфікації праймерів. Переважно, бібліотека є селектованою по розміру для виключення більш довгих молекул. Бібліотеки, створені випадковим чином також можуть бути застосовані для ідентифікації 5' та розміщених вище регіонів генів. Геномні бібліотеки переважним чином можуть бути застосовані для отримання інтронів та розширених 5' послідовностей.

Для способів гібридизації, часткові послідовності можуть бути мічені (наприклад, нік-трансляцією або міченням кінців з <sup>32</sup>P) з застосуванням добре відомих процедур. Бактеріальну або бактеріофагову бібліотеку потім, звичайно, піддають скринінгу з застосуванням гібридизаційних фільтрів, що містять денатуровані бактеріальні колонії (або "газонів", що містять фагові бляшки) з міченим зондом (Див. Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual (2000)). Гібридизовані колонії або бляшки відбирають, підрощують та виділяють з них ДНК для подальшого аналізу. Клоні кДНК можна аналізувати для визначення кількості додаткової послідовності за допомогою, наприклад, ПЛР з застосуванням праймера від окремої послідовності та праймера від вектора. Для ідентифікації одного або декількох клонів, що перекриваються, можна отримати рестрикційні мапи та окремі послідовності. Визначення повної послідовності проводять з застосуванням стандартних способів, що можуть полягати у отриманні серії делеційних клонів. Отримані послідовності, що перекриваються потім можна буде зібрати у єдиничну суміжну послідовність. Повнорозмірну молекулу кДНК можна отримати лігуванням прийнятних фрагментів, з застосуванням добре відомих способів.

Альтернативно, існують численні способи ампліфікації для отримання повнорозмірної кодуючої послідовності з часткової послідовності кДНК. У таких способах, звичайно застосовують ампліфікацію шляхом ПЛР. Для етапу ампліфікації можна застосувати будь-який з різних наявних у продажу наборів. Праймери можна розробити з застосуванням, наприклад, добре відомого у цій галузі програмного забезпечення. Переважно, праймери сягають 22-30 нуклеотидів у довжину, мають GC - зміст у принаймні 50 % та приєднуються до цільової послідовності при температурах біля 68°C-72°C. Ампліфікований регіон можна секвенувати, як описано вище та зібрати послідовності, що перекриваються у суміжну послідовність.

Одним з таких способів ампліфікації є зворотня ПЛР (Див. Triglia et al., Nucl. Acids Res. 16:8186 (1988)), де за допомогою застосування ферментів рестрикції отримують фрагмент відомого регіону гена. Потім цей фрагмент внутрішньомолекулярним лігуванням зшивають у кільце та застосовують у якості зразка для ПЛР з дивергентними праймерами, отриманими з відомого регіону. При альтернативному підході, послідовності, прилеглі до часткової послідовності можуть бути отримані шляхом ампліфікації з праймером до лінкерної послідовності та праймером, специфічним до відомого регіону. Ампліфіковані послідовності звичайно піддають другому етапу ампліфікації з тим же лінкерним праймером та другим праймером, специфічним до відомого регіону. Варіація цієї процедури, де застосовано два праймера, що ініціюють елонгацію у протилежні напрями з відомої послідовності, описана у WO 96/38591. Інший подібний спосіб відомий, як " швидка ампліфікація кінців кДНК " або RACE. Цей спосіб полягає у застосуванні внутрішнього праймера та зовнішнього праймера, що гібридується до polyA регіону або до векторної послідовності для визначення 5" та 3" послідовностей відомої послідовності. Додаткові способи охоплюють захоплюючи ПЛР (Lagerstrom et al., PCR Methods Applic. 1:111-19 (1991)) та "гуляючу" ПЛР (Parker et al., Nucl. Acids. Res. 19:3055-60 (1991)). Інші способи застосування ампліфікації також можуть бути застосовані для отримання повнорозмірних послідовностей кДНК.

У деяких випадках, можливо отримання повнорозмірних послідовностей кДНК за допомогою аналізу послідовностей, наданих у базі даних маркерних послідовностей, що експресуються (EST), наприклад, від GenBank. Пошуки перекриваючихся EST можна, звичайно, здійснити з застосуванням добре відомих програм (наприклад, NCBI BLAST searches), та подібні EST - послідовності можна застосувати для отримання суміжної повнорозмірної послідовності. Повнорозмірні послідовності ДНК також можна отримати за допомогою аналізу фрагментів генома.

Полінуклеотидні послідовності або їх фрагменти, що кодують поліпептиди або гібридні білки або їх функціональні еквіваленти можна також застосувати у рекомбінантних молекулах ДНК для прямої експресії поліпептиду у відповідній клітині - хазяїні. Завдяки природженому виродженню генетичного коду можна отримати інші послідовності ДНК, що кодують по суті ті ж самі або функціонально еквівалентні амінокислотні послідовності та застосувати ці послідовності для клонування та експресії вибраного поліпептиду.

Як зрозуміло фахівцям, у деяких випадках може бути бажаним отримати нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептид та мають кодони, що не зустрічаються в природі. Наприклад, можна відібрати бажані для окремих про- або еукариотичних клітин-хазяїв кодони з метою підвищення рівня експресії білку або для отримання рекомбінантних транскриптів РНК, що мають бажані властивості, як то більш тривалий період напівжиття, ніж у транскрипті, отриманому з послідовності, що зустрічається в природі.

Більш того, полінуклеотидні послідовності можна побудувати з застосуванням звичайно відомих способів для змінення послідовностей, що кодують поліпептид керуючись рядом причин, в тому числі, але без обмеження, заміщення, що змінюють клонування, процесинг, та/або експресію продукту гена. Наприклад, для побудування нуклеотидних послідовностей можна застосувати переміщення послідовностей всередині гена з наступною рекомбінацією цього сегмента в інтактну ДНК (DNA shuffling) шляхом фрагментації випадковим чином та ПЛР - збірку фрагментів гена та синтетичних олігонуклеотидів. На додачу, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу можна вводити нові сайти рестрикції, змінювати профілі глікозилювання, міняти невідповідне застосування кодонів (codon preference), отримувати сплайс-варіанти, вводити мутації, тощо.

Природні, модифіковані або рекомбінантні послідовності нуклеїнової кислоти можна лігувати до гетерологічної послідовності, що кодує гібридний білок. Наприклад, скринінг пептидних бібліотек на інгібітори поліпептидної активності може бути корисним для кодування химерного білку, що може розпізнаватися комерційно прийнятним антитілом. Гібридний білок також можна побудувати таким чином, щоб він містив сайт розщеплення, розташований між послідовністю, що кодує поліпептид та послідовністю гетерологічного білку, таким чином, щоб поліпептид

можна було розщепити та очистити від гетерологічної частини.

Послідовності, що кодують бажаний поліпептид можна цілком або частково синтезувати з застосуванням добре відомих у цій галузі хімічних способів (див. Caruthers, M. H. et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. pp. 215-223 (1980), Horn et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. pp. 225-232 (1980)). Альтернативно, сам білок можна отримати за допомогою хімічних способів синтезу амінокислотної послідовності поліпептиду або його частини. Наприклад, пептидний синтез можна виконати з застосуванням різних твердофазних способів (Roberge et al., Science 269:202-204 (1995)) та автоматизований синтез можна виконати з застосуванням, наприклад, пептидного синтезатору ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

Новий синтезований пептид можна в значній мірі очистити за допомогою препаративної вискоєфективної рідинної хроматографії (наприклад, Creighton, Proteins, Structures and Molecular Principles (1983)) або іншими відповідними прийнятними способами. Композицію синтетичних пептидів можна перевірити амінокислотним аналізом або сіквенсом (наприклад, процедурою деградації по Ердману). Крім того, амінокислотну послідовність поліпептиду або будь-якої її частини, можна модифікувати шляхом прямого синтезу та/або об'єднати з застосуванням хімічних способів з послідовностями з інших білків або будь-якою їх частиною, для отримання варіантного поліпептиду.

Для експресії бажаного поліпептиду, нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептид або функціональні еквіваленти можна вставити у відповідний вектор експресії, тобто, у вектор, що містить необхідні елементи для транскрипції та трансляції вставленої кодуючої послідовності. Для отримання вектора експресії, що містить послідовності, які кодують інтересуючий поліпептид та відповідні контрольні елементи транскрипції та трансляції можна застосувати способи, що добре відомі фахівцям. Ці способи охоплюють способи рекомбінантної ДНК *in vitro*, способи синтезу та генетичну рекомбінацію *in vivo*. Подібні способи описані у Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2000), та Ausubel et al., Current Protocols y Molecular Biology (updated annually).

Для розміщення та експресії полінуклеотидних послідовностей можна застосувати ряд систем типу вектор експресії/хазяїн. Вони охоплюють, але без обмеження, мікроорганізми, наприклад, бактерії, трансформовані з рекомбінантними бактеріофаговими, плазмідними або космічними векторами експресії ДНК; дріжджі, трансформовані з дріжджовими векторами експресії; системи клітин комах, інфіковані з вірусними векторами експресії (наприклад, бакуловірусними); рослинні клітинні системи, трансформовані з вірусними векторами експресії (наприклад, на основі вірусу мозаїки цвітної капусти, CaMV, вірусу тютюнової мозаїки, BTM) або з бактеріальними векторами експресії (наприклад, на основі плазмід Ti або pBR322); або людинні клітинні системи.

"Контрольні елементи" або "регуляторні послідовності", присутні у векторі експресії, являють собою регіони вектора, що не підлягають трансляції, як то підсилювачі, промотори, 5' та 3' нетрансльовані регіони та взаємодіють з клітинними білками хазяя для проведення транскрипції та трансляції. Подібні елементи можуть мати різну специфічність та стійкість. В залежності від застосованого хазяя та векторної системи можна застосувати будь-яку кількість прийнятних елементів транскрипції та трансляції, в тому числі, конститутивні та індуковані промотори. Наприклад, при клонуванні у бактеріальних системах, можна застосувати індуковані промотори, як то гібридний промотор lacZ фагміди PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) або плазмиди PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). У клітинних системах ссавців, звичайно бажаними є промотори генів ссавців або вірусів ссавців. Якщо є необхідним отримати клітинну лінію, що містить численні копії послідовності, що кодує поліпептид, бажаним є застосування векторів на основі вірусу SV40 або EBV з відповідним селективним маркером.

У бактеріальних системах, кількість векторів експресії можна вибрати в залежності від призначеного застосування поліпептиду, що експресується. Наприклад, у разі потреби великих кількостей, наприклад, для індукування антитіл, можуть бути застосовані вектори, що спрямовують високий рівень експресії гібридних білків, що можуть бути легко очищені. Такі вектори охоплюють, але без обмеження, мультифункціональні вектори, здатні до експресії та клонування у *E. Coli*, як то BLUESCRIPT (Stratagene), де послідовність, що кодує інтересуючий поліпептид можна лігувати у вектор у рамці з послідовностями для аміно-термінального Met та наступних 7 залишків  $\beta$ -галактозидази таким чином, щоб можна було отримати гібридний білок; вектори pIN (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503-5509 (1989)); тощо. Також, для експресії чужорідних поліпептидів у якості гібридних білків з глутатіон S-трансферазою (GST) можна застосувати вектори pGEX (Promega, Madison, Wis.). Головним чином, такі гібридні білки мають розчинні властивості та можуть бути легко очищені від лізованих клітин адсорбцією на глутатіон-агарозних гранулах, після чого слідує елювання у присутності вільного глутатіону.

Білки, отримані у таких системах можуть бути побудовані таким чином, щоб вони містили гепарин, тромбін або сайти розщеплення фактору ХА протеази та щоб клонований інтересуючий поліпептид можна було легко вивільнити від GST - частини коли завгодно.

У дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* можна застосувати ряд векторів, що містить конститутивні або індуковані промотори, як то альфа- фактор, алкогольоксидазу та PGH. Інші вектори, що містять конститутивні або індуковані промотори охоплюють GAP, PGK, GAL та ADH. Огляди наведені у Ausubel et al. (supra) та Grant et al., *Способи Enzymol.* 153:516-544 (1987) та Romas et al. *Yeast* 8 423-88 (1992).

У випадках застосування рослинного вектора експресії, експресія послідовності, що кодує поліпептиди може проходити під контролем будь-якої кількості промоторів. Наприклад, вірусні промотори, наприклад, промотори 35S та 19S вірусу CaMV можуть бути застосовані окремо або у комбінації з омега - лідерною послідовністю від TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)). Альтернативно, можна також застосувати рослинні промотори, як то мала субодиниця RUBISCO або промотори теплового шоку (Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); Broglie et al., *Science* 224:838-843 (1984); та Winter et al., *Results Probl. клітин Differ.* 17:85-105 (1991)). Ці констракти можна вводити у клітини рослин або шляхом прямої ДНК - трансформації або шляхом патоген-опосередкованої трансфекції. Подібні способи описані в ряді загальнодоступних оглядів (див., наприклад, Hobbs у McGraw Hill *Yearbook of Science and Technology* pp. 191-196 (1992)).

Також для експресії інтересуючого поліпептиду можна застосувати систему клітин комах. Наприклад, у одній такій системі, в якості вектора для експресії чужорідних генів у клітинах *Spodoptera frugiperda* або *Trichoplusia larvae* застосовують вірус ядерного поліедрозу *Autographa californica*(AcNPV). Послідовності, що кодують поліпептид можна клонувати у регіон вірусу, що не є життєво важливим, наприклад, у поліедриновий ген та розмістити їх під контролем поліедринового промотору. Успішне встроювання послідовності, що кодує поліпептид веде до неактивного стану поліедринового гена та до продукування рекомбінантного вірусу, що втратив білок оболонки. Рекомбінантні віруси потім можна застосувати для інфікування, наприклад, клітин *S. frugiperda* або *Trichoplusia larvae*, де може експресуватися інтересуючий поліпептид (Engelhard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3224-3227 (1994)).

У клітинах - хазяях ссавців, звичайно прийнятним є ряд систем для експресії на вірусній основі. Наприклад, у випадках застосування аденовірусу у якості вектора експресії, послідовності, що кодують інтересуючий поліпептид можна лігувати у аденовірусний транскрипційно / трансляційний комплекс, що складається з пізнього промотор та з трьохчастинної лідерної послідовності. Для отримання життєздатного вірусу, здатного до експресії поліпептиду у інфікованих клітинах - хазяях може бути застосовано встроювання у незначущі E1 або E3 регіони вірусного генома (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3655-3659 (1984)). На додачу, для збільшення експресії у клітинах - хазяях ссавців можна застосувати підсилювачі транскрипції, як то підсилювач вірусу саркоми Payca(RSV). Способи та протоколи для роботи з аденовірусними векторами розглядені у Wold, *Adenovirus Methods and Protocols*, 1998. Додаткові посилання щодо застосування аденовірусних векторів можна знайти у *Adenovirus: A Medical Dictionary, Bibliography, and Annotated Research Guide to Internet References*, 2004.

Для досягнення більш ефективної трансляції послідовності, що кодує інтересуючий поліпептид можна також застосувати специфічні сигнали ініціювання. Такі сигнали містять в собі стартовий кодон ATG та суміжні послідовності. У випадках, коли послідовність, що кодує поліпептид, його стартовий кодон та послідовності, що розміщені проти ходу транскрипції вставляють у відповідний вектор експресії, додаткові транскрипційні або трансляційні контрольні сигнали можуть бути непотрібні. Однак, у випадках, де вставлені тільки кодуюча послідовність або її частина, повинна бути забезпечена екзогенна трансляція всіх контрольних сигналів, в тому числі, стартового кодону ATG. Крім того, стартовий кодон повинен знаходитися у прийнятній рамці зчитування для забезпечення трансляції всієї вставки. Екзогенні трансляційні елементи та стартові кодони можуть бути застосовані від різних джерел, як природні, так і синтетичні. Ефективність експресії можна посилити включенням підсилювачів, прийнятних для окремих клітинних систем, що застосовують, як описано у літературі (Scharf. et al., *Results Probl. клітин Differ.* 20:125-162 (1994)).

Додатково, можна вибрати вид клітини - хазяїна по її здатності змінювати експресію вставленої послідовності або змінювати білок, що експресується, бажаним чином. Такі модифікації поліпептиду охоплюють, але без обмеження, ацетилювання, карбоксилювання, глікозилювання, фосфорилування, ліпидування та ацилювання. Пост- трансляційний процесинг, що розщеплює "препро" форми білку також можна застосувати для сприяння належного

встроювання, фолдингу та/або функціонування. Для забезпечення належної модифікації та процесингу чужорідного білка можна вибрати різні клітини-хазяї, як то CHO, HeLa, MDCK, HEK293 та WI38, що мають специфічний клітинний апарат та характерні механізми для такої пост-трансляційної діяльності.

5 Для довготривалого та високоефективного отримання рекомбінантних білків, бажаною звичайно є стійка експресія. Наприклад, клітинні лінії, що стабільно експресують інтересуючий полінуклеотид можна трансформувати з застосуванням векторів експресії, що можуть містити вірусні точки початку реплікації та/або ендогенні елементи експресії та селективний маркерний ген у тому ж або у окремому векторі. Після введення вектора, клітини можуть залишити зростати строком на 1-2 доби у збагаченому середовищі перед переходом на селективне середовище. Метою селективного маркера є надання стійкості до відбору та його присутність дозволяє зростання та відновлення клітин, що успішно експресують вставлені послідовності. Резистентні клони стабільно трансформованих клітин можна проліферувати з застосуванням прийнятних обраному типу клітин способів культури тканин.

15 Для відновлення трансформованих клітинних ліній можна застосувати будь-яку кількість систем відбору. Вони охоплюють, але без обмеження, гени тимідинкінази вірусу простого герпесу (Wigler et al., Cell 11:223-32 (1977)) та аденінфосфорибозилтрансферази (Lowy et al., Cell 22:817-23 (1990)), що можна застосувати, відповідно, у tk.sup.- або aprt.sup.- клітинах. Також, можна застосувати відбір на основі стійкості до антиметаболіту, антибіотику або гербіциду; наприклад, dhfr, що надає стійкість до метотрексату (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3567-70 (1980)); npt, що надає стійкість до аміноглюкозидів, неоміцину та G-418 (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1-14 (1981)); als або pat, що надають, відповідно, стійкість до хлорсульфурону та фосфохінотрицин - ацетилтрансферази (Murry, supra). Також були описані додаткові селективні гени, наприклад, trpB, що дозволяє клітинам застосовувати індол замість триптофану або hisD, що дозволяє клітинам застосовувати гістинол замість гістидину (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8047-51 (1988)). Останнім часом набуло популярності застосування видимих маркерів, як то антоціани,  $\beta$  - глюкуронідаза та її субстрат GUS, люцифераза та її субстрат люциферин, що широко застосовують не тільки для визначення трансформантів, але також для кількісного визначення транз'єнтної або стійкої експресії білка, пов'язаної з конкретною векторною системою (Rhodes et al., Methods Mol. Biol. 55:121-131 (1995)).

Хоча присутність/відсутність експресії маркерного гену наводить на думку про присутність інтересуючого гену, може бути потрібно підтвердження його присутності та експресії. Наприклад, якщо послідовність, що кодує поліпептид вставлена у послідовність маркерного гену, то рекомбінантні клітини, що містять ці послідовності можна ідентифікувати по відсутності функції маркерного гену. Альтернативно, маркерний ген можна розмістити у тандемі з послідовністю, що кодує поліпептид під контролем одиничного промотору. Експресія маркерного гена у відповідь на індукування або відбір звичайно вказує також на експресію тандемного гена.

40 Альтернативно, клітини-хазяї, що містять та експресують бажану полінуклеотидну послідовність можна ідентифікувати за допомогою ряду процедур, відомих фахівцям. Ці процедури охоплюють, але без обмеження, ДНК - ДНК або ДНК- РНК гібридизацію та способи біологічного або імунного аналізу білку, що охоплюють мембранні, розчинні або технології з застосуванням чипів для визначення та/або кількісного аналізу нуклеїнової кислоти або білку.

45 Фахівцям відомий ряд процедур для визначення та вимірювання експресії продуктів, що кодують полінуклеотиди, з застосуванням або поліклональних або моноклональних антитіл, специфічних для цих продуктів. Приклади охоплюють твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА), радіоімунний аналіз (RIA) та сортування флуоресцентно активованих клітин (FACS). У деяких випадках може бути бажаним застосування двохстадійного моноклонального імунного аналізу, у якому застосовують моноклональні антитіла, що реагують з двома роздільними епітопами даного поліпептиду, але також можна застосувати конкурентний аналіз зв'язування. Ці та інші аналізи описані, серед іншого, у Hampton et al., Serological Methods, a Laboratory Manual (1990) та Maddox et al., J. Exp. Med. 158:1211-1216 (1983).

55 Фахівцям також відомий широкий ряд способів мічення та кон'югації, що можна застосувати у різних аналізах нуклеїнових кислот та амінокислот. Способи проведення гібридизації з міткою або ПЛР - зондів для виявлення послідовностей, пов'язаних з полінуклеотидами охоплюють мічення олігонуклеотидів, нік - трансляцію, мічення кінців або ПЛР - ампліфікацію з застосуванням міченого нуклеотиду. Альтернативно, послідовності або будь-які їх частини можна клонувати у векторі для отримання мРНК зонду. Подібні вектори відомі у цій галузі, є у продажу та їх можна застосувати для синтезування РНК - зондів in vitro додаванням відповідної



РНК – полімерази, як то T7, T3 або SP6 та мічених нуклеотидів. Ці процедури можна проводити з застосуванням ряду комерційно прийнятих наборів. Прийнятні репортерні молекули або мітки, що можна застосувати містять радіонукліди, ензими, флуоресцентні, хемолюмінесцентні або хромогенні агенти, а також субстрати, кофактори, інгібітори, магнітні частинки тощо.

Клітини - хазяї, трансформовані з інтересуючою полінуклеотидною послідовністю можна культивувати в умовах, прийнятих для експресії та відновлення білка з культури клітин. Білок, що виробляють рекомбінантні клітини можуть виділятися або зберігатися у клітинах у залежності від застосованої послідовності та/або вектора. Як зрозуміло фахівцям, можна отримати вектор експресії, що містить полінуклеотид, щоб він містив сигнальні послідовності, що спрямовують секрецію закодованого поліпептиду через прокаріотичну або еукаріотичну клітинну мембрану. Інші рекомбінантні конструкції можна застосувати для приєднання послідовності, що кодує інтересуючий поліпептид до нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептидний домен, що буде сприяти очищенню розчинних білків. Такі домени, що сприяють очищенню охоплюють, але без обмеження, метал -зв'язуючі (хелатні) пептиди як то гістидин-триптофанові модулі що дозволяють проводити очищення на іммобілізованих металах, домени білка А, дозволяють проводити очищення на іммобілізованому імуноглобуліні та домени, що застосовують у системі експресії/афінного очищення FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Включення лінкерних послідовностей, що можуть розщеплюватися, наприклад, специфічних до фактора ХА або ентерокинази (Invitrogen. San Diego, Calif.) між доменом очищення та закодованим поліпептидом також можна застосувати для сприяння очищення. Один такий вектор експресії передбачено для експресії гібридного білка, що містить інтересуючий поліпептид та нуклеїнової кислоти, що кодує 6 гістидинових залишків, що знаходяться перед тіоредоксином або рестрикційним сайтом ентерокинази. Гістидинові залишки сприяють очищенню за допомогою IMIAC (метал-хелат-афінний хроматографії), як описано у Porath et al., Prot. Exp. Purif. 3:263-281 (1992), в той час, як рестрикційний сайт ентерокинази надає спосіб очищення бажаного поліпептиду з гібридного білка. Обговорення векторів, що містять гібридні білки див. у Kroll et al., DNA Cell Biol. 12:441-453 (1993)).

У додаткових втіленнях, генетичні констракти, що містять один або більше полінуклеотидів винаходу вводять у клітини *in vivo*. Це можна зробити за допомогою будь-якого з ряду добре відомих підходів, частина яких наведена нижче з ілюстративною метою.

Один з кращих способів доставки *in vivo* однієї або декількох послідовностей нуклеїнових кислот полягає у застосуванні аденовірусного вектора експресії.

"Аденовірусний вектор експресії" містить констракти, що містять аденовірусні послідовності, яких достатньо для (а) підтримання пакування констракту та (б) експресії клонованого у векторі полінуклеотиду у сенсовій або антисенсовій орієнтації. Зрозуміло, що у контексті антисенсового констракту, експресія не вимагає синтезування продукту гена. Аденовірусний вектор експресії містить генно-інженерно розроблену форму аденовірусу. Знання генетичної організації аденовірусу, лінійного, двохланцюгового ДНК - вірусу у 36 Кб, дозволяє замінювати великі частини аденовірусної ДНК на чужорідні послідовності розміром до 7 Кб (Grunhaus & Horwitz, 1992). На відміну від ретровірусу, аденовірусні інфекції клітин-хазяїв не ведуть до хромосомальної інтеграції, тому що аденовірусна ДНК може реплікуватися епісомально без потенційної тенотоксичності. Також, аденовіруси є структурно стійкими та після екстенсивної ампліфікації в них не було виявлено геномних перебудов. Аденовірус фактично може інфікувати всі епітеліальні клітини незалежно від їх стадії клітинного циклу. До сих пір, аденовірусної інфекції, як вважається, пов'язані тільки з легкими формами захворювання, як то гострі респіраторні захворювання у людей.

Аденовірус є особливо прийнятним для застосування у якості вектора для генного перенесення завдяки його геному середніх розмірів, легкості маніпуляції, високому титру, широкому кругу клітин-мішеней та високій інфекційності. Обидва кінця вірусного геному містять інвертовані повтори (ITR) у 100-200 пар основ, так звані *cis* елементи, необхідні для реплікації вірусної ДНК та пакування. Ранні (E) та пізні (L) регіони генома містять різні транскрипційні одиниці, що розділюються початком реплікації вірусної ДНК. E1 регіон (E1A та E1B) кодує білки, що відповідають за регуляцію транскрипції вірусного генома та деяких клітинних генів. Експресія E2 регіону (E2A та E2B) веде до синтезу білків реплікації вірусної ДНК. Ці білки беруть участь у реплікації ДНК, експресії пізніх генів та виключення клітин-хазяїв (Renan, 1990). Продукти пізніх генів, в тому числі більшість білків вірусної оболонки, експресуються тільки після значного процесингу одиничного первинного транскрипту з головного пізнього промотору (MLP). MLP, (знаходиться у 16.8 т.н.) є особливо ефективним у пізній фазі інфекції та всі мРНК, що виходять з цього промотору мають 5'-тричленну лідерну послідовність (TPL), що робить їх кращими мРНК для трансляції. В даній системі, рекомбінантний аденовірус отримують шляхом

гомологічної рекомбінації між човниковим (шатл-вектором) вектором та провірусним вектором. Завдяки можливій рекомбінації між двома провірусними векторами, у цьому процесі можна отримати аденовірус дикого типу. Тому, критичним є отримання одиничного клону вірусу з індивідуальної бляшки та перевірка структури його геному.

Отримання та розповсюдження сучасних аденовірусних реплікаційно-дефектних векторів залежить від унікальної хелперної клітинної лінії, позначеної, як 293, трансформованої з ембріональних клітин нирки людини фрагментами ДНК Ad5, що конститутивно експресує білки E1 (Graham et al., 1977). Оскільки регіон E3 є необов'язковим для аденовірусного генома (Jones & Shenk, 1978), сучасні аденовірусні вектори, за допомогою клітин 293, несуть чужорідну ДНК або у одному з регіонів E1, D3 або у обидвох з них (Graham & Prevec, 1991). У природі, аденовірус може запакувати приблизно 105 % генома дикого типу (Ghosh-Choudhury et al., 1987), забезпечуючи місткість для приблизно двох додаткових кілобаз ДНК. У поєднанні з приблизно 5.5 кБ ДНК, що можна замінити у E1 та E3 регіонах, максимальна місткість сучасного аденовірусного вектора сягає біля 7.5 кБ або біля 15 % від загальної довжини вектора. Більш, ніж 80 % аденовірусного генома залишається у основі вектора та є джерелом породженої вектором цитотоксичності. Також, реплікаційна недостатність вірусу з делецією у E1 регіоні є неповною. Наприклад, у наявних на даний час прийнятних векторах спостерігали втрату експресії вірусного гена при високих множинностях зараження (MOI) (Mulligan, 1993).

Хелперні клітинні лінії можна отримати з клітин людини, наприклад, з людських ембріональних клітин нирок, м'язових клітин, гемопоетичних клітин або інших людських ембріональних мезенхімальних або епітеліальних клітин. Альтернативно, хелперні клітини можна отримати з клітин інших видів ссавців, прийнятних для аденовірусу людини. Такі клітини охоплюють, наприклад, клітини Vero або інші ембріональні, мезенхімальні або епітеліальні клітини мавп. Як було вказано вище, на даний час кращою хелперною клітинною лінією є 293.

Racher et al. (1995) винайшли покращені способи культивування клітин 293 та розповсюдження аденовірусу. В одному форматі, природні клітинні агрегати підрощували інокулюванням індивідуальних клітин у 1 л силіконізованих ролерних колбах (Techne, Cambridge, UK), що містили 100-200 мл середовища. Після струшування при 40 об/хв, життєздатність клітин перевірили аналізом з трипановим синім барвником. У іншому форматі, мікроносії Fibra-Cel (Bibby Sterlin, Stone, UK) (5 г/л) застосували наступним чином: інокулят клітин, ресуспендований у 5 мл середовища, додали до носія (50 мл) у 250 мл флаконах Erlenmeyer та залишили у нерухомому стані, з випадковим струшуванням, на 1-4 год. Потім середовище замінили на 50 мл свіжого середовища та почали струшування. Для отримання вірусу, клітин підрощували до ступеня змикання моношару (конфлуентності) у біля 80 %, після чого середовище ще раз замінили (до 25 % кінцевого обсягу) та додали аденовірус з MOI у 0.05. Культури інкубували у нерухомому стані протягом ночі, в результаті чого обсяг збільшився до 100 % та далі струшували протягом наступних 72 год.

Окрім вимоги, щоб аденовірусний вектор був реплікаційно - дефектним або, принаймні, умовно дефектним, природа аденовірусу вектора, вважається, не має вирішального значення для успішного втілення винаходу. Аденовірус може бути будь-яким з 42 різних відомих серотипів або субгруп A-F. Аденовірус типу 5 субгрупи C є кращим початковим матеріалом для отримання необхідного реплікаційно - дефектного аденовірусного вектора для застосування у заявленому винаході, оскільки аденовірус типу 5 є аденовірусом людини, про якого відомо багато біохімічної та генетичної інформації та його вже історично застосовують для більшості констрактивів, де у якості вектора застосовано аденовірус.

Як зазначено вище, типовий вектор відповідно до заявленого винаходу є реплікаційно - дефектним та не має аденовірусного регіону E1. Отже, буде найбільш зручним введення полінуклеотиду, що кодує інтересуючий ген у місце, звідки видалили E1-кодуючі послідовності. Однак, місце встроювання у аденовірусних послідовностях констракту для винаходу не є критичним. Полінуклеотид, що кодує інтересуючий ген можна також вставити замість видаленого регіону E3 у векторах з E3 заміщенням, як описано у Karlsson et al. (1986) або у регіон E4, якщо дефективність по E4 доповнює хелперна клітинна лінія або хелперний вірус.

Аденовірус є легким для підрощування та маніпуляцій та має широкий ряд хазяїв *in vitro* та *in vivo*. Цю групу вірусів можна отримати з високими титрами, наприклад,  $10^9$ - $10^{11}$  одиниць, що утворюють бляшки на мл, крім того, вони є високо інфекційними. Життєвий цикл аденовірусу не потребує інтегрування у геном клітини - хазяїна. Чужорідні гени, що доставляються за допомогою аденовірусних векторів є епісомального походження, отже, вони мають низьку генотоксичність до клітин - хазяїв. У дослідженнях вакцинації з аденовірусом дикого типу не спостерігали побічних дій (Couch et al., 1963; Tor et al., 1971), що демонструє їх безпечність та терапевтичний потенціал у вигляді векторів для переносу генів *in vivo*.

Аденовірусні вектори також застосували для експресії еукаріотичного гену (Levrero et al., 1991; Gomez-Foix et al., 1992) та у розробці вакцин (Grunhaus & Horwitz, 1992; Graham & Prevec, 1992). Останнім часом, дослідження на тваринах наводять на думку, що рекомбінантний аденовірус можна буде застосувати для генної терапії (Stratford-Perricaudet & Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Rich et al., 1993). Були проведені дослідження введення рекомбінантного аденовірусу у різні тканини, в тому числі інстиляцією у трахею (Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992), внутрішньом'язовою ін'єкцією (Ragot et al., 1993), периферичними внутрішньовенними ін'єкціями (Herz & Gerard, 1993) та треперотаксичною інюкуляцією у мозок (Le Gal La Salle et al., 1993).

Аденовірусні вектори також можна отримати з аденовірусу людини. Альтернативно, їх можна отримати з аденовірусів інших видів, наприклад, шимпанзе, що можуть мати перевагу в тому, що вірусні вектори не будуть нейтралізуватися антитілами проти аденовірусу людини, які присутні у багатьох людських суб'єктах (див., наприклад, : Tatsis N et al *Gen Therapy* 2006 13:421-429).

В якості системи доставки у деяких туберкульозних вакцинах, що зараз розробляють, застосовано аденовірус типу 35, що порівняно рідко зустрічається та тому існують низькі рівні вже існуючого імунітету до самого вектора (див., наприклад, Radosevic et al *Infection and Immunity* 2007 75(8):4105-4115). Аденовірус тип 35 також може мати певну цінність у заявленому винаході в якості вектора доставки.

Ретровіруси є групою одноланцюгових РНК - вірусів, що характеризуються здатністю перетворювати їх РНК у двохланцюгову ДНК у інфікованих клітинах за допомогою зворотної транскрипції (Coffin, 1990). Отримана ДНК потім стабільно інтегрується у клітинні хромосоми в якості провірусу та спрямовує синтез вірусних білків. Інтегрування веде до збереження послідовностей вірусного гену у реципієнтних клітинах та їх нащадках. Ретровірусний геном містить три гена, *gag*, *pol*, та *env*, що кодують, відповідно, білки капсиду, фермент полімерази та компоненти вірусної оболонки. Послідовність, що знайдена вище *gag* гена містить сигнал пакування геному у віріони. На 5' та 3' кінцях вірусного генома знаходяться дві довгих кінцевих послідовностей, що повторюються (LTR). Ці послідовності, що містять сильний промотор та підсилювач також необхідні для інтегрування у геном клітини-хазяя (Coffin, 1990).

Для створення ретровірусного вектора, нуклеїнову кислоту, що кодує один або декілька інтересуючих олігонуклеотидів або полінуклеотидних послідовностей вставляють у вірусний геном замість деяких вірусних послідовностей для отримання реплікаційно - дефектного вірусу. Для отримання віріонів, створюють пакувальну клітинну лінію, що містить гени *gag*, *pol*, та *env* без LTR та пакувальних компонентів (Mann et al., 1983). Коли рекомбінантну плазмиду, що містить кДНК разом з ретровірусними LTR та пакувальними послідовностями вводять у цю клітинну лінію (за допомогою, наприклад, преципітації з фосфатом кальцію), пакувальні послідовності дозволяють РНК - транскрипту рекомбінантної плазмиди запаковуватися у вірусні частинки, що потім вивільнюються у культуральне середовище (Nicolas & Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Середовище, що містить рекомбінантні ретровіруси потім збирають, вибірково концентрують та застосовують для переносу генів. Ретровірусні вектори здатні інфікувати широкий ряд клітинних типів, однак, інтегрування та стійкість експресії вимагає поділу клітини-хазяя (Paskind et al., 1975).

Новітній підхід для специфічного таргетингу ретровірусних векторів був розроблений на основі хімічного змінення ретровірусу шляхом хімічного додавання залишків лактози до вірусної оболонки. Ця модифікація може дозволити специфічне інфікування гепатоцитів через сіалоглюкопротеїнові рецептори.

Також розроблено інший підхід для таргетингу рекомбінантних ретровірусів, де застосували біотинільовані антитіла проти білку ретровірусної оболонки та проти специфічного клітинного рецептору. Антитіла з'єднували через біотинові компоненти за допомогою стрептавідину (Roux et al., 1989). При застосуванні антитіл проти антигенів головного комплексу гістосумісності класу I та класу II, вони інфікували ряд клітин людини, що мали ті поверхневі антигени з екотропним вірусом *in vitro* (Roux et al., 1989).

AAV (Ridgeway, 1988; Hermonat & Muzycska, 1984) є парвовірусом, відкритим у якості забруднення аденовірусних фондів. Він є розповсюдженим вірусом (антитіла до нього є у 85 % популяції людей у США), що не пов'язаний з будь-яким захворюванням. Його також класифікують, як залежного вірусу (*dependovirus*), тому що його реплікація залежить від присутності хелперного вірусу, як то аденовірусу. Було отримано 5 серотипів, з яких найкраще описаний AAV-2. AAV має одноланцюгову лінійну ДНК, що запакована у капсид білками VP1, VP2 та VP3 зі створенням ікосаедричного віріону діаметром 20-24 нм (Muzyczka & McLaughlin, 1988).

ДНК AAV сягає 4.7 кБ у довжину, містить дві відкриті рамки зчитування та фланкована двома ITR. Геном AAV містить два головних гена: гер та сар. Ген гер кодує білки, що відповідають за вірусну реплікацію, а ген сар кодує капсидний білок VP1-3. Кожен ITR утворює Т- подібну структурну "шпильку". Тільки ці кінцеві повтори є головними цис- компонентами AAV для хромосомного інтегрування. Тому AAV можна застосувати у якості вектора, де всі вірусні кодуєчі послідовності видалені та заміщені набором генів для доставки. Було також ідентифіковано три вірусних промотору, яким дали назви р5, р19, та р40, відповідно до їх положень на карті. Транскрипція з промоторів р5 та р19 веде до отримання гер білків та транскрипція з р40 веде до отримання білків капсиду (Hermonat & Muzyczka, 1984).

Є декілька факторів, що спонукають дослідників до вивчення можливості застосування gAAV у якості вектору експресії. Одним з них є те, що вимоги для доставки гену для інтегрування у хромосому хазяїна дивно низькі. Необхідно мати ITR довжиною у 145 пар основ, що складає тільки 6 % від геному AAV. Це залишає місце у векторі для вставки ДНК довжиною у 4.5 кБ. Хоча ця здатність може перешкодити AAV доставляти великі гени, вона цілком прийнятна для доставки антисенсових констрактивів.

AAV є гарним вибором серед векторів доставки також завдяки його безпечності. Існує досить складний рятувальний механізм: не тільки аденовірус дикого типу, але й також гени AAV необхідні для мобілізування gAAV. Крім того, AAV не є патогенним та не пов'язаний з будь-яким захворюванням. Видалення вірусних кодуєчих послідовностей мінімізує імунні реакції на експресію вірусного гена, тому gAAV не в змозі викликати запальну відповідь.

У заявленому винаході, в якості констрактивів експресії для доставки олігонуклеотидних або поліонуклеотидних послідовностей до клітин - хазяїв можна також застосувати інші вірусні вектори. Можна застосувати вектори, що отримані, наприклад, з вірусу коров'ячій віспи (Ridgeway, 1988; Courpar et al., 1988), лентівірусів, поліовірусів та вірусів герпесу. Також можна розглянути для застосування вектори на основі поксвірусу, як то на основі вірусу пташиної віспи. Вони пропонують кілька привабливих особливостей для різних клітин ссавців (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Courpar et al., 1988; Horwich et al., 1990).

З нещодавнім визнанням дефектних вірусів гепатиту В, був отриманий новий погляд на структурно - функціональні відносини різних вірусних послідовностей. Дослідження *in vitro* показали, що вірус може зберігати здатність до хелпер-залежного пакування та зворотної транскрипції незважаючи на видалення до 80 % його генома (Horwich et al., 1990). Це наводить на думку про те, що великі частини генома можуть бути замінені на чужорідний генетичний матеріал. Гепатотропізм та стійкість (інтегрування) є особливо привабливими властивостями для спрямованого до печінки переносу генів. Chang et al. (1991) ввели ген хлорамфенікол ацетилтрансферази (CAT) у геном вірусу качиноного гепатиту В замість полімеразних, поверхневих та пре-поверхневих кодуєчих послідовностей та співтранскрибували його разом з вірусом дикого типу у клітинну лінію пташиної гепатоми. Для інфікування первинних качиних гепатоцитів застосували культуральне середовище, що містило високі титри рекомбінантного вірусу. Стійкість експресії гену CAT спостерігали протягом принаймні 24 днів після трансфекції (Chang et al., 1991).

Для експресії олігонуклеотидних або поліонуклеотидних послідовностей заявленого винаходу, констракт експресії повинен бути введений у клітину. Цю доставку можна здійснити *in vitro*, у вигляді лабораторної процедури трансформації клітинної лінії або *in vivo* або *ex vivo*, у вигляді лікування деяких хворобливих станів. Як описано вище, одним бажаним механізмом доставки є доставка шляхом вірусної інфекції, де констракт експресії інкапсульовано у інфекційну вірусну частину.

Після доставки констракту експресії у клітину, нуклеїнова кислота, що кодує бажані олігонуклеотидні або поліонуклеотидні послідовності може бути розташованою та відображеною у різних сайтах. У деяких втіленнях, нуклеїнова кислота, що кодує констракт може бути стабільно інтегрована у клітинний геном. Це інтегрування може відбуватися у специфічному місці та зі специфічною орієнтацією через гомологічну рекомбінацію (заміщення гена) або воно може відбуватися у випадковому, не- специфічному місці (аугментація гена). У додаткових втіленнях, нуклеїнову кислоту можна стабільно підтримувати у клітині у якості окремого, епісомального сегмента ДНК. Такі сегменти нуклеїнової кислоти або "епісоми" кодуєчі послідовності, достатні для того, щоб дозволити їх підтримку та реплікацію незалежно або синхронізовано з клітинним циклом хазяя. Спосіб доставки у клітину констракту експресії та місце розташування у клітині нуклеїнової кислоти залежить від типу застосованого констракту експресії.

У деяких втіленнях винаходу, констракт експресії, що містить одну або декілька олігонуклеотидних або поліонуклеотидних послідовностей може просто складатися з оголених

рекомбінантних ДНК або плазмід. Перенос констракту можна здійснити, наприклад, за допомогою будь-якого способу, що фізично або хімічно робить клітинну мембрану більш проникною. Це особливо стосується переносу *in vitro* але також може бути застосовано *in vivo*. Dubensky et al. (1984) успішно ввели шляхом ін'єкції ДНК вірусу полііоми з частинками фосфату кальцію у печінку та селезінку дорослих та новонароджених мишей, що показали активну вірусну реплікацію та гостру інфекцію. Benvenisty & Reshef (1986) також показали, що пряма внутрішньочеревна ін'єкція плазмід, осаджених фосфатом кальцію веде до експресії трансфікованих генів. Передбачається, що ДНК, що кодує інтересуючий ген можна також перенести подібним чином *in vivo* та експресувати продукт гена.

Інші втілення винаходу для перенесення у клітини оголеної ДНК констракту експресії можуть полягати у бомбардуванні частинками. Цей спосіб залежить від здатності ДНК-вкритих мікрочастинок прискорюватися до великої швидкості, що дозволяє їм проникати крізь клітинні мембрани та досягати до клітин без їх знищення (Klein et al., 1987). Розроблено також кілька приладів, що прискорюють маленькі частинки. У одному такому пристрої застосовано розряд високої напруги для генерації електричного струму, що, в свою чергу, надає рушійну силу (Yang et al., 1990). Застосовані мікрочастинки містять біологічно інертні субстанції, наприклад, вольфрамові або золоті гранули.

Вибрані органи, в тому числі печінку, шкіру та м'язову тканину щурів та мишей бомбардували *in vivo* (Yang et al., 1990; Zelenin et al., 1991). Також може бути потреба у хірургічному втручанні з метою усунення будь-якої проміжної тканини між пушкою та органом-мішенню, тобто, у лікуванні *ex vivo*. Знову ж таки, за допомогою цього способу, ДНК, що кодує певний ген можна доставити та інкорпорувати до клітин.

Для доставки також можна застосувати бактерії (наприклад, *listeria*, див. WO2004/11048) та, зокрема, BCG.

Поліпептиди також можна отримати з застосуванням будь-якого з ряду добре відомих способів. Рекомбінантні поліпептиди, що кодуються послідовностями ДНК, як зазначено вище, можна легко отримати з цих послідовностей ДНК за допомогою будь-якого з відомих фахівцям векторів експресії. Можна досягти експресії у будь-якої відповідній кітін-хазяїні, що була трансформована або трансфікована вектором експресії, що містить молекулу ДНК, що кодує рекомбінантний поліпептид. Прийнятні клітини-хазяї охоплюють прокаріотів, дріжджі та клітини вищих еукаріотів, як то ссавців та рослин. Переважним чином, застосовані клітини-хазяї охоплюють *E. coli*, дріжджові клітинні лінії або клітинні лінії ссавців, наприклад, COS або CHO. Супернатанти від прийнятих систем хазяїн/вектор, що секретують рекомбінантний білок або поліпептид у культуральне середовище спочатку можуть бути сконцентровані за допомогою комерційно доступного фільтру. Під час концентрації, можна застосувати концентрат до прийнятної матриці очищення, наприклад, до афінної матриці або до іонообмінної смоли. Зрештою, для подальшого очищення рекомбінантного поліпептиду можна застосувати один або декілька етапів ВЕРХ-хроматографії (HPLC) зі зворотною фазою.

Більш короткі поліпептиди також можна отримати синтетичним шляхом, з застосуванням добре відомих фахівцям способів. Наприклад, такі поліпептиди можна синтезувати з застосуванням будь-яких комерційно прийнятних твердофазних способів, як то твердофазний спосіб синтезу Меріфілда, де амінокислоти послідовно додають до зростаючого амінокислотного ланцюга. Див. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146 (1963). Обладнання для автоматизованого синтезу поліпептидів можна придбати у постачальників, наприклад, у Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), та воно може бути застосовано відповідно до інструкцій виробника.

У деяких певних втіленнях, поліпептид може бути білком злиття (гібридним білком), що містить, як тут описано, декілька модифікованих білків Rv3616с або принаймні один з модифікованих білків Rv3616с, як тут описано та неспоріднену послідовність, як то описані вище у (i) - (xvi) та (a) - (g).

Партнер злиття може, наприклад, сприяти у наданні Т- хелперних епітопів (імунологічний партнер злиття), переважно, у наданні Т- хелперних епітопів, що розпізнаються людиною або можуть сприяти у експресії білка (підсилювачі експресії) з більшим виходом, ніж нативний рекомбінантний білок. Деякі бажані партнери злиття мають властивості як імунологічних партнерів злиття, так і підсилювачів експресії. Інші партнери злиття можуть бути вибрані, наприклад, для збільшення розчинності білка або для спрямовування білка до бажаних внутрішньоклітинних локацій. Інші додаткові партнери злиття охоплюють афінні мітки, що сприяють очищенню білка.

Гібридні білки можна звичайно отримати за допомогою стандартних способів, в тому числі хімічної кон'югації. Переважно гібридний білок експресується в якості рекомбінантного білку, що

дозволяє отримання у системі експресії збільшених рівнів відносно звичайного (не гібридного) білка. Стислим чином, послідовності ДНК, що кодують поліпептидні компоненти можна зібрати по окремої та лігувати у відповідний вектор експресії. 3' – кінець послідовності ДНК, що кодує один поліпептидний компонент лігують (зшивають) разом з або без пептидного лінкеру, до 5' кінця послідовності ДНК, що кодує другий поліпептидний компонент таким чином, що рамки зчитування послідовності знаходяться у фазі. Це робить можливим трансляцію одиничного гібридного білка, що зберігає біологічну активність обидвох поліпептидних компонентів.

Пептидну лінкерну послідовність можна застосувати для відокремлення партнерів злиття відстанню, достатньою для забезпечення згортання кожного поліпептиду у свою вторинну та третинну структуру. Таку пептидну лінкерну послідовність розміщують у гібридному білку з застосуванням стандартних добре відомих у цій галузі способів. Прийнятні пептидні лінкери послідовності можна вибрати на основі наступних факторів: (1) здатності приймати гнучку розтягнуту конформацію; (2) нездатності утворювати вторинну структуру, що може взаємодіяти з функціональними епітопами першого та другого поліпептиду; та (3) відсутністю гідрофобних або заряджених залишків, що можуть реагувати з функціональними епітопами поліпептиду. Бажані пептидні лінкери послідовності містять залишки Gly, Asn та Ser. Також, у лінкерних послідовностях можна застосувати інші амінокислоти, близькі до нейтральних, як то Thr та Ala. Амінокислотні послідовності, що можна корисно застосувати у якості лінкерів наведені у Maratea et al., ген 40:39-46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262 (1986); U.S. Patent No. 4,935,233 та U.S. Patent No. 4,751,180. Лінкерна послідовність може, звичайно, мати 1-50 амінокислот у довжину. Лінкери послідовності не потрібні у разі, коли перший та другий поліпептиди мають несуттєві N-термінальні амінокислотні регіони, що можна застосувати для відокремлення функціональних доменів та запобігання стеричного перешкоджання.

У бажаних втіленнях, імунологічний партнер злиття походить від білка D, поверхневого білка грам-негативних бактерій *Haemophilus influenza B* (WO 91/18926). Переважним чином, похідна білку D містить приблизно першу третину білка (наприклад, перші N-кінцеві 100-110 амінокислот) та її можна ліпідувати. У деяких бажаних втіленнях, перші 109 залишків ліпобілка D партнера злиття включають до N-кінця для отримання поліпептиду з додатковими екзогенними T-клітинними епітопами та для збільшення рівню експресії у *E. coli* (отже, для функціонування у якості підсилювача експресії). Ліпідний хвіст забезпечує оптимальне надання антигену клітинам з наданим антигеном. Інші партнери злиття охоплюють неструктурний білок вірусу грипу, NS1 (гемаглютинін). Звичайно застосовують N-кінцеві 81 амінокислот, хоча також можна застосувати різні фрагменти, що містять T-хелперні епітопи.

У іншому втіленні, імунологічний партнер злиття є білком, що відомий, як LYTA або його частина (переважним чином, C-кінцева частина). LYTA походить від *Streptococcus pneumoniae*, що синтезує N-ацетил-L-аланін амідазу, відому, як амідазу LYTA (кодується геном *lytA*; ген 43:265-292 (1986)). LYTA - це автолизин, що специфічно розщеплює деякі зв'язки у пептидоглікановому каркасі. C-кінцевий домен білка LYTA відповідає за спорідненість до холіну або до його деяких аналогів, як то DEAE. Цю властивість застосовують для розробки корисних для експресії білків злиття плазмід, що експресують *E. coli* C-LYTA. Очищення гібридних білків, що містять C-LYTA фрагмент на N-кінці описано у *Biotechnology* 10:795-798 (1992). У бажаному втіленні, частину LYTA, що повторюється, можна вставити у гібридний білок. Частина, що повторюється, знайдена у C-кінцевому регіоні та починається з залишку 178, більш переважніше, ця частина містить залишки 188-305.

У додаткових втіленнях, висвітлені тут полінуклеотидні або поліпептидні композиції можна отримати у вигляді фармацевтично прийнятних або фізіологічно прийнятних розчинів для введення до клітин або до тварин або окремо або у комбінації з одним або з декількома іншими засобами терапії. Композиція може бути наведена у вигляді порошку (наприклад, у ліофілізованому стані) для швидкого відновлення перед застосуванням та подібні сухі композиції звичайно є більш стійкими протягом зберігання.

Фармацевтичні композиції можуть містити гібридний білок або полінуклеотид, що кодує гібридний білок у комбінації з фармацевтично - прийнятним носієм або наповнювачем.

Також зрозуміло, що, якщо це бажано, сегмент нуклеїнової кислоти (наприклад, РНК або ДНК), що експресує поліпептид може бути також введений у комбінації з іншими агентами, як то, наприклад, з іншими білками або поліпептидами або з різними фармацевтично активними агентами, в тому числі. з хіміотерапевтичними агентами, ефективними проти інфекції *M. tuberculosis*. Фактично, практично немає обмеження до інших компонентів, що також можуть бути включеними, беручи на увагу те, що додаткові агенти не викликають значної шкідливої дії при контактуванні з клітинами - мішенями або тканинами хазяя. Отже, композиції можна

доставити разом з іншими агентами по мірі необхідності в кожному конкретному випадку. Такі композиції можуть бути отримані з клітини-хазяїв або інших біологічних джерел або, альтернативно, можуть бути синтезовані хімічно, як описано тут. Також, вони можуть додатково містити заміщені або дериватизовані композиції РНК або ДНК.

Отримання фармацевтично прийнятних наповнювачів та розчинів носіїв добре відомо фахівцям, розробка прийнятного дозування та схем лікування для застосування певних композицій висвітлені тут у різних схемах лікування, в тому числі, наприклад, пероральне, парентеральне, внутрішньовенне, інтраназальне та внутрішньом'язове введення та розробка композиції. Інші шляхи введення охоплюють введення крізь слизові оболонки. Звичайно, препарати, що містять терапевтично ефективну кількість доставки біля 0.01 мкг - 1000 мкг модифікованого поліпептиду Rv3616с на введення, більш типово - біля 0.1 мкг - 100 мкг поліпептиду на введення (наприклад, 0.5-50 мкг). По відношенню до полінуклеотидних композицій, вони типово доставляють біля 10 мкг - 20 мг полінуклеотиду винаходу на введення, більш типово - біля 0.1 мг - 10 мг полінуклеотиду винаходу на введення. Природним чином, кількість активного з'єднання (з'єднань) у кожній терапевтично - корисній композиції можна отримати таким чином, що у будь-якій даній одиничній дозі з'єднання буде отримано прийнятне дозування. При отриманні подібних фармацевтичних препаратів, фахівці передбачають наступні впливові фактори, як то розчинність, життєздатність, біологічний час напіввиведення, шлях введення, час зберігання продукту, а також враховують інші фармакологічні міркування, щоб отримати ряд бажаних режимів лікування та дозувань.

У деяких втіленнях, висвітлені тут фармацевтичні композиції можна ввести тваринам шляхом перорального введення. Для такого введення, можна отримати композиції з інертним розріджувачем або з їстівним носієм, що засвоюється або їх можна упакувати у тверду або м'яку желатинову капсулу або їх можна спресувати у таблетки або їх можна прямо ввести разом з їжею в раціоні.

Активні з'єднання навіть можна об'єднати з наповнювачами та застосувати у вигляді таблеток для внутрішнього застосування, щічних таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, вафель тощо (Mathiowitz et al., 1997; Hwang et al., 1998; U. S. Patent 5,641,515; U. S. Patent 5,580,579 та U. S. Patent 5,792,451, де кожен, зокрема, включений тут в якості посилання в повному обсязі). Таблетки, пастилки, пігулки, капсули тощо можуть також містити наступне: речовини, що їх скріплюють, як то трагакант, акацію, кукурудзяний крохмаль або желатин; наповнювачі, як то дикальцію фосфат; розпушувачі, як то кукурудзяний або картопляний крохмаль, альгінову кислоту тощо; мастила, як то стеарат магнію; підсолоджувачі, як то цукрозу, лактозу та сахарин або смакові агенти, як то м'яту, масло грушанки або вишневий смаковий агент. Коли одиницю дозування запаковують у капсулу, вона також може містити, на додачу до перелічених вище матеріалів, рідкий носій. Також різні інші матеріали можна застосувати в якості оболонки або для змінення іншим чином фізичної форми одиниці дозування. Таблетки, пігулки, капсули також можуть бути покриті шелаком, цукром або обома компонентами. Сироп або еліксир може містити активний компонент, цукрозу у якості підсолоджувача, метил- та пропілпарабени у якості консервантів, а також барвник та ароматизатор, наприклад, вишневого або апельсинового смаку. Зрозуміло, що будь-який матеріал, застосований у отриманні будь-якої одиниці дозування, повинен бути фармацевтично чистим та по своїй суті нетоксичним у застосованих кількостях. Додатково, активні компоненти можуть входити до складу препаратів з уповільненим вивільненням.

Альтернативно, для перорального введення, композиції заявленого винаходу можуть містити один або декілька наповнювачів у вигляді у вигляді рідини для полоскання рота, чищення зубів, щічної таблетки, перорального спрею, або сублінгвального препарату для перорального введення. Наприклад, можна отримати рідину для полоскання рота шляхом додавання активного інгредієнта у необхідній кількості до відповідного розчинника, як то до розчину бората натрію (розчин Добеля). Альтернативно, активний інгредієнт можна включити до складу розчину для перорального введення, наприклад, розчину, що містить борат натрію, гліцерин та бікарбонат калію або деспергувати у засіб для чищення зубів, або додати у терапевтично - ефективній кількості до композиції, що може містити воду, сполучні речовини, абразивні матеріали, смакові агенти, агенти спінування та зволожувачі. Альтернативно, композиції можна отримати у вигляді таблеток або у розчинному вигляді для розміщення під язиком або розчинення у роті іншим чином.

Загальним чином, може бути бажаним доставляння заявленої тут фармацевтичної композиції парентерально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, або навіть внутрішньочеревно, як описано у U. S. Patent 5,543,158; U. S. Patent 5,641,515 та U. S. Patent 5,399,363 (кожен певним чином включений тут у своїй повноті у якості посилання). Розчини

активних з'єднань у вигляді вільної основи або фармакологічно прийнятних солей також можна отримати у воді, відповідно перемішаної з поверхнево - активною речовиною, як то з гідроксипропілцелюлозою. Також можна отримати дисперсні системи у гліцерині, рідких поліетиленгліколях та їх сумішах та у оліях. У звичайних умовах зберігання та застосування, ці

5 препарати містять консерванти для запобігання зростання мікроорганізмів.

Фармацевтичні форми, прийнятні для застосування для ін'єкцій охоплюють стерильні водні розчини або дисперсії та стерильні порошки для непередбаченого отримання стерильних розчинів для ін'єкцій або дисперсій (U. S. Patent 5,466,468, специфічно включений тут у своїй повноті у якості посилання). У всіх випадках форми повинні бути стерильними та повинні бути

10 рідкими для легкого проходження крізь голку шприцу. Вони повинні бути стійкими до умов виробництва та зберігання та повинні бути захищені проти забруднення мікроорганізмами, як то бактерії та гриби. Носій може бути розчинником або дисперсною системою, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь, рідкий поліетиленгліколь тощо), їх прийнятними сумішами та/або рослинними оліями. Належну

15 плинність можна підтримати, наприклад, застосуванням покриття, як то лецитин, збереженням необхідних розмірів частинок у разі дисперсії та застосуванням поверхнево - активних речовин. Запобігання дії мікроорганізмів можна забезпечити за допомогою різних антибактеріальних та протигрибкових агентів, наприклад, парабенів, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти, тімеросалу, тощо. У будь-яких випадках, може бути бажаним додавання ізотонічних агентів,

20 наприклад, цукрів або хлориду натрію. Подовжену абсорбцію композиції для ін'єкцій можна забезпечити застосуванням у композиції агентів затримування абсорбції, наприклад, моностеарату алюмінію та желатину.

Для парентерального введення, наприклад, у водному розчині, розчин повинен бути, відповідно, по необхідності буферизованим та спочатку досягають ізотонічності рідкого розріджувача достатньою кількістю фізіологічного розчину або глюкози. Ці окремі водні розчини,

25 головним чином, є прийнятними для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного та внутрішньочеревного введення. У зв'язку з цим, фахівцям відомі стерильні водні середовища для застосування у світі заявленого винаходу. Наприклад, одну дозу можна розчинити у 1 мл ізотонічного розчину NaCl та або додати до 1000 мл рідини гіподермоклізу або ввести шляхом

30 ін'єкції у запропоноване місце інфузії (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 та 1570-1580). Деяка мінливість у дозуванні обов'язково буде відбуватися в залежності від стану суб'єкта, що підданий лікуванню. Особа, що відповідає за введення буде, у будь-якому випадку, визначати відповідну дозу для окремого суб'єкта. Більш того, для введення людині, препарати повинні відповідати стандартам стерильності,

35 пірогенності та загальним стандартам безпеки та чистоти відповідно до вимог FDA Office of Biologics standards.

Стерильність для розчинів для ін'єкцій отримують включенням активних з'єднань у відповідній кількості у відповідний розчинник, з різними іншими переліченими вище інгредієнтами, в міру необхідності, після чого розчин фільтрується стерилізацією. Звичайно,

40 дисперсні системи отримують включенням різних стерилізованих активних інгредієнтів у стерильний носій, що містить базове дисперсійне середовище та вимагає інших інгредієнтів з числа перелічених вище. У разі стерильних порошків для отримання стерильних розчинів для ін'єкцій, бажаними способами отримання є способи ліофілізації та вакуумної сушки, що забезпечують отримання активного інгредієнту разом з будь-яким додатковим бажаним

45 інгредієнтом у вигляді порошку з їх попередньо стерильно відфільтрованого розчину.

Описані тут композиції можна отримати у нейтральній формі або у вигляді солі. Фармацевтично прийнятні солі, солі приєднання кислоти (утворюється при вільних аміногрупах білка) та солі, що утворюються з неорганічних кислот, як то, наприклад, соляна або фосфорна кислота або з органічних кислот, як то оцтова, щавлева, винна, мигдальна тощо. Солі, утворені

50 з вільними карбоксильними групами також можна отримати з неорганічних основ, як то, наприклад, натрію, калію, амонію, кальцію або з гідроксидів заліза та з таких органічних основ, як то ізопропіламін, тріметіламін, гістидин, прокаїн тощо. Після отримання, розчини вводять в манері, сумісній з дозуванням препарату та в кількості, що буде терапевтично ефективним. Препарати легко вводять у ряд лікарських форм, як то розчини для ін'єкцій, капсули з

55 уповільненим вивільненням, тощо.

Як тут застосовано, "носій" охоплює будь-які та всі розчинники, засоби дисперсії, транспортні засоби, покриття, розріджувачі, антибактеріальні та протигрибкові агенти, ізотонічні агенти та агенти затримування абсорбції, буфери, розчини - носії, суспензії, колоїдні розчини тощо. Застосування таких засобів та агентів для фармацевтично активних субстанцій добре

60 відомо у цій галузі. Передбачено застосування будь-якого загальноприйнятого середовища



або агента у терапевтичній композиції за виключенням випадків, коли їх застосування є несумісними з активним інгредієнтом. Також композиція може містити додаткові активні інгредієнти.

Фраза "фармацевтично прийнятний" стосується молекулярних об'єктів та композицій, що при введенні людині не спричиняють алергічних або подібних несприятливих реакцій. Отримання водної композиції, що містить білок у якості активного інгредієнту добре відомо у цей галузі. Звичайно, такі композиції отримують для ін'єкцій, у вигляді рідких розчинів або суспензій; також можна отримати композиції у твердому вигляді, прийнятні для розчинення або суспендування у рідині перед ін'єкцією. Препарат також може бути емульсовано.

У деяких втіленнях, фармацевтична композиція може бути доставлена інтраназальними спреями, трансбукальними аерозолями, інгаляцією, та/або іншими аерозольними засобами доставки. Способи доставки генів, нуклеїнових кислот та пептидних композицій безпосередньо до легенів за допомогою назальних та булакних аерозольних спреїв описані, наприклад, у U. S. Patent 5,756,353 та U. S. Patent 5,804,212 (кожен з них специфічно включений тут у своїй повноті у якості посилання). Також, у фармацевтичній науці добре відома доставка ліків з застосуванням інтраназальних мікрочастинкових смол (Takenaga et al., 1998) та лізофосфатидил - гліцеринових з'єднань (U. S. Patent 5,725,871, специфічно включений тут у своїй повноті у якості посилання) Трансмукозальна доставка ліків у вигляді політетрафлуороетиленових матриць підтримання описана у U. S. Patent 5,780,045 (специфічно включений тут у своїй повноті у якості посилання).

У деяких втіленнях, винахідниками передбачено застосування ліпосом, наноканул, мікрочастинок, мікросфер, ліпідних частинок, везикул тощо, для введення композиції заявленого винаходу у прийнятні клітини - хазяї. Зокрема, можуть бути отримані композиції заявленого винаходу для доставки в інкапсульованому вигляді у ліпідних частинках, ліпосомах, везикулах, наносферах, наночастинках тощо.

Такі формулювання можуть бути бажаними для введення фармацевтично прийнятних препаратів нуклеїнових кислот або описаних тут констрактів. Отримання та застосування ліпосом звичайно відоме фахівцям (див., наприклад, Couvreur et al., 1977; Couvreur, 1988; Lasic, 1998; що описує застосування ліпосом та наноканул у цільовій антибіотичній терапії внутрішньоклітинних бактеріальних інфекцій та захворювань). Останнім часом, набули розвитку ліпосоми з підвищеними сировотковою стабільністю та часом напіввиведення (Gabizon & Papahadjopoulos, 1988; Allen та Choun, 1987; U. S. Patent 5,741,516, специфічно включений тут у своїй повноті у якості посилання). Додатково були розглянуті різні способи ліпосомальних та подібних до них препаратів у якості потенціальних носіїв ліків (Takakura, 1998; Chandran et al., 1997; Margalit, 1995; U. S. Patent 5,567,434; U. S. Patent 5,552,157; U. S. Patent 5,565,213; U. S. Patent 5,738,868 та U. S. Patent 5,795,587, кожен з них специфічно включений тут у своїй повноті у якості посилання).

Ліпосоми успішно застосовували у багатьох типах клітин, звичайно стійких до трансфекції іншими процедурами, в тому числі у суспензіях Т - клітин, у первинних культурах гепатоцитів та у клітинах PC 12 (Renneisen et al., 1990; Muller et al., 1990). На додачу, ліпосоми вільні від обмежень по довжині ДНК, що типові у системах доставки на основі вірусів. Ліпосоми ефективно застосовують для введення генів, ліків (Heath & Martin, 1986; Heath et al., 1986; Balazsovits et al., 1989; Fresta & Puglisi, 1996), радіотерапевтичних агентів (Pikul et al., 1987), ензимів (Imaizumi et al., 1990a; Imaizumi et al., 1990b), вірусів (Faller & Baltimore, 1984), факторів транскрипції та алостеричних ефекторів (Nicolau & Gersonde, 1979) до ряду культуральних клітинних ліній та тварин. Додатково, успішно завершено декілька клінічних випробувань, що перевіряли ефективність ліпосомно-опосередкованої доставки ліків (Lopez-Berestein et al., 1985a; 1985b; Coune, 1988; Sculier et al., 1988). Крім того, різні дослідження наводять на думку, що застосування ліпосом не є пов'язаним з аутоімунними відповідями, токсичністю або гонадною локалізацією після системної доставки (Mori & Fukatsu, 1992).

Ліпосоми утворюють з диспергованих у водному середовищі фосфоліпідів та спонтанно утворюють мультиламелярні концентричні двошарові везикули (також відомі, як мультиламелярні везикули (MLV) ). MLV звичайно мають діаметри 25 нм - 4 мкм. Обробка MLV ультразвуком веде до утворення маленьких одношарових везикул (SUV) з діаметрами у діапазоні 200-500 Å, що містить водний розчин у ядрі.

Ліпосоми мають схожість до клітинних мембран та передбачені для застосування у зв'язку з винаходом в якості носіїв для пептидних композицій. Вони є дуже зручними, тому що до них можуть бути включені як водні, так і жиророзчинні субстанції, тобто, відповідно, у їх водній та двошаровій частинах. Навіть можливо застосування ліпосом, що містять ліки для сайт - специфічної доставки активних агентів селективно модифікованим ліпосомальним препаратом.

На додачу до наведеного у Couvreur et al. (1977; 1988), наступна інформація може бути застосованою у отриманні ліпосомальних препаратів. Фосфоліпіди можуть утворювати ряд структур, інших, ніж ліпосоми при диспергуванні у воді, в залежності від молярного співвідношення ліпіду до води. У низьких співвідношеннях ліпосоми є структурами, що мають перевагу. Фізичні характеристики ліпосом залежать від pH, іонної сили та присутності бівалентних катіонів. Ліпосоми можуть показувати низьку проникність до іонних та полярних речовин, але при підвищеній температурі відбувається фазовий перехід, який помітно змінює їх проникність. Фазовий перехід пов'язаний з перетворенням від щільно упакованої, упорядкованої структури, що відома, як стан гелю, у вільно упаковану, менш впорядковану структуру, відому як рідкий стан. Це відбувається при характерній температурі фазового переходу, що призводить до збільшення проникності для іонів, цукрів та ліків.

Додатково до температури, дія білків може також змінювати проникність ліпосом. Деякі розчинні білки, як то цитохром c, зв'язує, деформує та проникає до бішару, тим самим спричинюючи змінення проникності. Холестерин інгібує це проникнення білків, вірогідно, більш щільним пакуванням фосфоліпідів. Передбачено, що найбільш корисні ліпосомальні препарати для антибіотичної та інгібіторної доставки будуть містити холестерин.

Здатність захоплювати розчинені речовини є змінною у різних типах ліпосом. Наприклад, MLV є помірно ефективними у захопленні розчинених речовин, а SUV є вкрай неефективними. SUV пропонують перевагу у гомогенності та відтворюваності в розподіленні за розмірами, однак, у якості компромісу між розміром та ефективністю захоплення запропоновано застосування великих моношарових везикул (LUV). Їх отримують випаровуванням ефіру та вони мають в три - чотири рази більшу ефективність захоплення, ніж MLV.

Додатково до ліпосомних характеристик, важливим вирішальним фактором у з'єднаннях, що захоплюються, є фізико-хімічні властивості самого з'єднання. Полярні з'єднання захоплюються водною частиною та неполярні з'єднання приєднуються до ліпідного бішару везикули. Полярні з'єднання вивільнюються завдяки проникності або при порушенні бішару, але неполярні з'єднання залишаються зв'язаними з бішаром, доки його не порушують дією температури або білків. Обидва типи показують максимальну швидкість витікання при температурі фазового переходу.

Ліпосоми взаємодіють з клітинами за допомогою чотирьох різних механізмів: ендоцитозу фагоцитарними клітинами ретикулоендотеліальної системи, як то макрофагами та нейтрофілами; адсорбції до клітинної поверхні, навіть неспецифічними слабкими гідрофобними або електростатичними силами або специфічними взаємодіями з компонентами клітинної поверхні; злиттям з цитоплазматичною мембраною клітини шляхом встроювання ліпідного бішару ліпосоми у цитоплазматичну мембрану з одночасним вивільненням ліпосомального змісту у цитоплазму; та шляхом перенесення ліпосомальних ліпідів до клітинної або субклітинної мембрани або навпаки, без будь-якої асоціації зі змістом ліпосоми. Часто важко визначити, який механізм є дієвим та більш, ніж один може працювати одночасно.

Розташування та участь внутрішньовенно введених шляхом ін'єкції ліпосом залежить від їх фізичних властивостей, як то від розміру, плинності та поверхневого заряду. Вони можуть зберігатися в тканинах годинами або днями, в залежності від їх композиції та час напіввиведення у крові є у діапазоні від декількох хвилин до декількох годин. Більш великі ліпосоми, як то MLV та LUV, швидко усуваються фагоцитарними клітинами ретикулоендотеліальної системи, але фізіологія серцево - судинної системи стримує вихід таких великих видів у більшості місць. Вони можуть вийти тільки у місцях, де у капілярному ендотелії існують великі отвори або пори, як то синусоїди печінки або селезінки. Отже, ці органи є домінуючими місцями поглинання. З іншого боку, SUV показують широкий розподіл у тканинах, але все-таки сильно поглинаються у печінці та селезінці. Головним чином, ця поведінка in vivo обмежує потенціальний таргетинг ліпосоми тільки тими органами та тканинами, що прийнятні до їх великого розміру та охоплюють кров, печінку, селезінку, кістковий мозок та лімфоїдні органи.

Таргетинг, як правило, не є обмеженням з точки зору заявленого винаходу. Однак, якщо бажано зробити специфічний таргетинг, то потрібно застосувати способи, прийнятні для його здійснення. Антитіла можна застосувати для зв'язування з поверхнею ліпосом та для спрямування антитіл та ліків, що вони містять до специфічних антигенних рецепторів, розташованих на поверхні певного клітинного типу. Вуглеводні детермінанти (глікобілкові або гліколіпідні компоненти клітинної поверхні, що відіграють роль у міжклітинному впізнаванні, взаємодії та зчепленні) також можна застосувати у якості сайтів впізнавання, тому що вони мають потенційну можливість спрямовувати ліпосоми до окремих типів клітин. Головним чином, передбачено застосування внутрішньовенної ін'єкції ліпосомальних препаратів, але також

можливі інші шляхи введення.

Альтернативно, винахід передбачає фармацевтично прийнятні нанокapsулярні препарати композиції заявленого винаходу. Нанокapsули звичайно можуть захоплювати з'єднання стійким та прийнятним для відтворення шляхом (Henry-Michelland et al., 1987; Quintanar-Guerrero et al., 1998; Douglas et al., 1987). Для уникнення побічних дій, спричинених внутрішньоклітинним полімерним перенавантаженням, подібні ультрадисперсні частинки (розміром біля 0.1 мкм) повинні бути отримані з застосуванням полімерів, здатних до деградації *in vivo*. Здатні до біологічної деградації поліалкіл - ціаноакрілатні наночастинки, що задовольняють цим вимогам також передбачені для застосування у заявленому винаході. Такі частинки можна легко отримати, як описано у (Couvreur et al., 1980; 1988; zur Muhlen et al., 1998; Zambaux et al. 1998; Pinto-Alphandry et al., 1995 та U. S. Patent 5,145,684, специфічно включений тут у своєї повноті у якості посилання).

Також, для черезшкірної доставки можна застосувати шкірні пластирі.

Деякі втілення заявленого винаходу стосуються імуногенних композицій, що будуть містити одну або декілька модифікованих послідовностей Rv3616с (поліпептиди або полінуклеотиди), як обговорювалося вище, у комбінації з імуностимулятором.

Імуногенні композиції також можуть містити гібридний білок або полінуклеотид, що кодує гібридний білок у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм або наповнювачем.

Імуностимулятор може бути будь-якою субстанцією, що підвищує або посилює імунну відповідь (антитіл та/або клітинно-опосередковану) до екзогенного антигену. Приклади імуностимуляторів охоплюють адьюванти.

Отримання імуногенної композиції в загальних рисах описано у, наприклад, Powell & Newman, eds., Vaccine Design (субодиничний та адьювантний підход) (1995). Фармацевтичні композиції та імуногенні композиції в межах заявленого винаходу можуть також містити інші з'єднання, що можуть бути біологічно активними або неактивними. Наприклад, можуть бути присутніми одна або декілька імуногенних частин інших антигенів *M. tuberculosis*; або у складі гібридного поліпептиду або у якості окремого компоненту, у фармацевтичній або імуногенній композиції.

Ілюстративні імуногенні композиції можуть містити полінуклеотид (наприклад, ДНК) що кодує один або декілька поліпептидів, як описано вище, таким чином, що поліпептид генерується *in situ* (тим самим викликаючи імунну відповідь). Як зазначено вище, ДНК може бути презентована разом з будь-яким з ряду відомих фахівцям систем доставки, в тому числі систем експресії нуклеїнових кислот, бактеріальних та вірусних систем експресії. Численні способи доставки генів добре відомі у цій галузі, наприклад, описані у Rolland, Crit. Rev. Therap. Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198 (1998), та посилання на них наведені тут. Відповідні системи експресії нуклеїнових кислот містять необхідні послідовності ДНК для експресії у пацієнта (як то, прийнятний промотор та сигнал термінації). Бактеріальні системи доставки полягають у введенні бактеріальної клітини-хазяя (наприклад, зі штаму *Mycobacterium*, *Bacillus* або *Lactobacillus*, в тому числі *Bacillus-Calmette-Guerrin* або *Lactococcus lactis*), що експресує поліпептид (наприклад, на його клітинній поверхні або секретують поліпептид) (див., наприклад, Ferreira, et al., An Acad Bras Cienc (2005) 77:113-124; та Raha, et al., Appl Microbiol Biotechnol (2005) PubMedID 15635459).

У бажаному втіленні, ДНК може бути введена з застосуванням системи вірусної експресії (наприклад, на основі вірусу коров'ячій віспи або іншого поксвірусу, ретровірусу або аденовірусу), що може полягати у застосуванні непатогенного (дефектного), здатного до реплікації вірусу. Прийнятні системи висвітлюються, наприклад, у Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321 (1989); Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103 (1989); Flexner et al., Vaccine 8:17-21 (1990); U.S. Patent Nos. 4,603,112, 4,769,330, and 5,017,487; WO 89/01973; U.S. Patent No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, Biotechniques 6:616-627 (1988); Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219 (1994); Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502 (1993); Guzman et al., Circulation 88:2838-2848 (1993); and Guzman et al., Cir. Res. 73:1202-1207(1993). Способи включення ДНК у такі системи експресії добре відомі фахівцям. ДНК також може бути "оголеною," як описано, наприклад, у Ulmer et al., Science 259:1745-1749 (1993) та розглянуто у Cohen, Science 259:1691-1692 (1993). Поглинання оголеної ДНК може бути збільшено нанесенням ДНК на здатні до біологічної деградації гранули, що можуть бути ефективно перенесені у клітину. Очевидно, що імуногенні композиції також можуть містити обидва (полінуклеотидний та поліпептидний) компоненти. Такі імуногенні композиції можуть бути надані для посилення імунної відповіді.

Зрозуміло, що імуногенні композиції можуть містити фармацевтично прийнятні солі

наведених тут полінуклеотидів та поліпептидів. Такі солі можна отримати з фармацевтично прийнятних нетоксичних основ, в тому числі, органічних основ (наприклад, солей первинних, вторинних та третинних амінів та базових амінокислот) та неорганічних основ (наприклад, солей натрію, калію, літію, амонію, кальцію та магнію).

В той час, як будь-який відомий фахівцям прийнятний носій можна застосувати у імуногенній композиції цього винаходу, тип носія буде змінюватися в залежності від способу введення. Композиції заявленого винаходу можна отримати для будь-якого відповідного типу введення, в тому числі, наприклад, для місцевого, перорального, назального, внутрішньовенного, внутрішньочерепного, внутрішньочеревного, підшкірного або внутрішньом'язового введення. Для парентерального введення, наприклад, для підшкірної ін'єкції, носій буде, переважним чином, включати в себе воду, фізіологічний розчин, спирт, жир, віск або буфер. Для перорального введення, можна застосувати будь-який з вищезгаданих носіїв або твердий носій, як то маніт, лактозу, крохмаль, стеарат магнію, сахаринат натрію, тальк, целюлозу, глюкозу, сахарозу та карбонат магнію. Також, у якості носіїв для фармацевтичної композиції цього винаходу можна застосувати здатні до біологічної деградації мікросфери (наприклад, полілактат-поліглюколат). Прийнятні, здатні до біологічної деградації мікросфери висвітлюються, наприклад, у U.S. Patent Nos. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344 та 5,942,252. Можна також застосувати носій, що містить білкові комплекс з макрочастинками, що описані у U.S. Patent No. 5,928,647 та здатні індукувати у хазяїні обмежені цитотоксичні Т-лімфоцитарні відповіді I класу.

Подібні композиції також можуть містити буфери (наприклад, нейтральний буферизований фізіологічний розчин або фосфатний буферизований фізіологічний розчин), вуглеводи (наприклад, глюкозу, манозу, цукрозу або декстрини), манітол, білки, поліпептиди або амінокислоти, наприклад, гліцин, антиоксиданти, бактеріостатичні агенти, хелатуючі агенти, як то EDTA або глутатіон, ад'юванти (наприклад, гідроксид алюмінію), розчинні речовини, що надають препарату ізотонічних, гіпотонічних або слабких гіпотонічних властивостей у крові реципієнта, суспендуючі агенти, загущувачі та/або консерванти. Альтернативно, композиції заявленого винаходу можна отримати у ліофілізованому стані. З'єднання також можна інкапсулювати у ліпосоми з застосуванням добре відомої технології.

У імуногенній композиції цього винаходу можна застосувати будь-який з цілого ряду імуностимуляторів. Наприклад, вона може містити ад'ювант. Ад'ювант має відношення до компоненту вакцини або терапевтичної композиції, що збільшує специфічну імунну відповідь до антигену (див., наприклад, Edelman, AIDS Res. Hum Retroviruses 8:1409-1411 (1992)). Ад'юванти індукують імунні відповіді Th-1 та Th-2 типів. Цитокіни типу Th-1 (наприклад, IFN- $\gamma$ , IL-2, та IL-12), як правило, сприяють індуванню клітинно-опосередкованої імунної відповіді до введеного антигену, в той час, як цитокіни типу Th-2 (наприклад, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) сприяють гуморальним імунним відповідям.

У запропонованих тут імуногенних композиціях, ад'ювантні композиції переважно призначені для викликання імунної відповіді переважно типу Th1.

Прийнятні ад'ювантні композиції містять олію у водних емульсіях, зокрема, олію у водній емульсії, що містить на одну дозу для людини 0.5-10 мг здатної до метаболізації олії (наприклад, сквалену), 0.5-11 мг токолу (наприклад, альфа-токоферолу) та 0.1-4 мг емульсуючого агента (наприклад, поліоксиетилену сорбітанмоноолеата). Див., наприклад, WO2008/043774, що включена тут у якості посилання.

Альтернативний ад'ювант містить імунологічно активну фракцію сапоніну, що отримана з кори дерева Quillaja Saponaria Molina (наприклад, очищена за допомогою ВЕРХ - хроматографії фракція QS21, як описано у US5,057,540) та знаходиться у вигляді ліпосоми та ліпосахариду (наприклад, 3-де-О-ацилований монофосфорил - ліпід А). Ці композиції можуть додатково містити стерол (наприклад, холестерин), наприклад, де вагове співвідношення сапонін: стерол є у діапазоні 1:1-1:100 (наприклад, у діапазоні 1:1-1:10 у ваговому співвідношенні). Особливо прийнятними є ад'юванти, де вищезгаданий QS21 та вищезгаданий 3-де-О-ацилований монофосфорил - ліпід А присутні у ваговому співвідношенні 1:1 та обидва присутні у дозі для людини з рівнем, нижчим, ніж 30 мкг. Подібні ад'ювантні композиції описані, наприклад, у WO2007/068907 та US2008279926, що включені тут у якості посилання.

Інші інтересуючі ад'ювантні системи охоплюють системи на основі солі алюмінію у поєднанні з ліпополісахаридом 3-де-О-ацилованого монофосфорил - ліпід А. Антиген та 3-де-О-ацилований монофосфорил - ліпід А можуть бути спільно адсорбовані до тих саме частинок металічної солі або можуть бути адсорбовані до різних частинок металічної солі. Див., наприклад, WO00/23105, US7357936 та US20080226672A1, включені тут у якості посилання, що описують імуногенні композиції, які містять антиген, приєднаний до першої частинки металічної

солі (зокрема, до фосфату або до гідроксиду алюмінію) та 3-де-О-ацилований монофосфорил - ліпід А, приєднаний до другої частинки металічної солі (зокрема, до фосфату або до гідроксиду алюмінію).

Будь-які запропоновані тут імуногенні композиції можна отримати з застосуванням добре відомих способів, що ведуть до отримання комбінації антигену, підсилювача імунної відповіді та прийняттого носія або наповнювача (по необхідності).

У фармацевтичних та імуногенних композиціях для сприяння отримання антиген - специфічної імунної відповіді можна також застосувати будь-які з багатьох засобів доставки.

Засоби доставки охоплюють антиген - презентуючі клітини (APC), як то дендритні клітини, макрофаги, В - клітини, моноцити та інші клітини, що можуть бути розроблені для того, щоб бути ефективними APC – клітинами. Такі клітини можуть, але не обов'язково, бути генетично модифікованими для збільшення здатності презентування антигену, для покращення активування та/або підтримання Т - клітинної відповіді та/або бути імунологічно сумісними з одержувачем (тобто, відповідним HLA гаплотипом). APC, звичайно, можна виділити з будь-яких з цілого ряду біологічних рідин та органів та вони можуть бути аутологічними, алогенними, сингенними або ксеногенними клітинами.

У деяких втіленнях заявленого винаходу застосовані дендритні клітини або їх клітини - попередники, як то антиген - презентуючі клітини. Дендритні клітини є дуже потужними APC (Banchereau & Steinman, *Nature* 392:245-251 (1998)) та, як було показано, вони ефективні у якості фізіологічних адьювантів для викликання профілактичного або терапевтичного імунітету (див. Timmerman & Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529 (1999)). Головним чином, дендритні клітини можна ідентифікувати по їх типовому вигляду (зіркоподібні *in situ*, з відміченими цитоплазматичними процесами (дендритами), примітними візуально *in vitro*), по їх здатності поглинати, обробляти та презентувати антигени з високою ефективністю та їх здатності активувати наївні Т - клітинні відповіді. Можна, зрозуміло, отримати дендритні клітини для експресії специфічних рецепторів клітинної поверхні або лігандів, що, звичайно не зустрічаються у дендритних клітинах *in vivo* або *ex vivo*, та подібні модифіковані дендритні клітини є передбаченими заявленим винаходом. Як альтернативу дендритним клітинам, у імуногенній композиції можна застосувати секретовані везикули заряджених антигеном дендритних клітин (також відомі, як екзосоми) (див. Zitvogel et al., *Nature Med.* 4:594-600 (1998)).

Дендритні клітини та попередники можна отримати з периферичної крові, кісткового мозку, лимфатичних вузлів, селезінки, шкіри, пуповинній крові або з будь-якої іншої прийнятої тканини або рідини. Наприклад, дендритні клітини можна диференціювати *ex vivo* додаванням комбінації цитокінів, як то GM-CSF, IL-4, IL-13 та/або TNF $\alpha$  до культур моноцитів, зібраних з периферичної крові. Альтернативно, CD34 позитивні клітини, зібрані з периферичної крові, пуповинній крові або кісткового мозку можна диференціювати у дендритні клітини додаванням до культурального середовища комбінацій GM-CSF, IL-3, TNF $\alpha$ , ліганду CD40, LPS, ліганду flt3 та/або іншого з'єднання (з'єднань), що викликають диференціацію, дозрівання та поширення дендритних клітин.

Дендритні клітини постійно характеризують, як "незрілі" та "зрілі" клітини, що дозволяє простим чином розрізнити два добре описаних фенотипу. Тим не менш, ця номенклатура не повинні тлумачитися як заперечення всіх можливих проміжних стадій диференціювання. Незрілі дендритні клітини характеризують, як APC з високою здатністю поглинання та обробки (процесингу) антигену, що корелює з високою експресією рецептора Fc $\gamma$  та рецептора манози. Зрілий фенотип звичайно характеризується зниженою експресією цих маркерів та високою експресією молекул клітинної поверхні, що відповідають за активування Т клітин, наприклад, активування MHC (головного комплексу гістосумісності) I та II класу, адгезивні молекули (наприклад, CD54 та CD11) та ко-стимуляційні молекули (наприклад, CD40, CD80, CD86 та 4-1BB).

APC звичайно можна трансфікувати з полінуклеотидом, що кодує білок (або його частину або його інший варіант) таким чином, щоб експресія поліпептиду відбувалася на клітинній поверхні. Така трансфекція може відбуватися *ex vivo* та потім можна буде застосувати, як тут описано, фармацевтичні або імуногенні композиції, що містять подібні трансфіковані клітини. Альтернативно, пацієнту можна ввести засіб доставки гена, що спрямований до дендритних або інших антиген - презентуючих клітин, з отриманням трансфекції, що відбувається *in vivo*. Трансфекцію дендритних клітин *in vivo* та *ex vivo*, наприклад, можна звичайно отримати з застосуванням будь-яких відомих у цей галузі способів, наприклад, описаних у WO 97/24447 або способом генної гармати, що описаний у Mahvi et al., *Immunology and Cell Biology* 75:456-460 (1997). Зарядження дендритних клітин антигеном можна здійснити шляхом інкубування дендритних клітин або попередників з поліпептидом, ДНК (оголеною або у плазмідному векторі)

або РНК; або з рекомбінантними бактеріями або вірусами, що експресують антиген (наприклад, вектори на основі віспи корів, віспи курей та аденовірусні або лентивірусні вектори). Перед зарядженням, поліпептид може бути ковалентно кон'югованим до імунологічного партнера, що надає Т - клітинну допомогу (наприклад, до молекули носія). Альтернативно, дендритні клітини можна пульсувати з некон'югованим імунологічним партнером, окремо або у присутності поліпептиду.

Імуногенні фармацевтичні композиції можуть бути у наявності у однодозових або багатодозових контейнерах, наприклад, у запаяних ампулах або у флаконах. Подібні контейнери, переважним чином, є герметично запаяними для збереження стерильності препарату до застосування. Головним чином, препарати можуть зберігатися у вигляді суспензій, розчинів або емульсій у олійних або водних транспортних засобах. Альтернативно, імуногенні або фармацевтичні композиції можуть зберігатися у ліофілізованому стані, що потребує тільки додавання стерильного рідкого носія безпосередньо перед застосуванням.

У деяких втіленнях, після "примування" або першого введення модифікованого білку Rv3616s (в тому числі, гібридного білку) або полінуклеотиду, що кодує вищезгаданий білок, слідує один або декілька "бустингів" або наступних введеннь модифікованого білку Rv3616s (в тому числі, гібридного білку) або полінуклеотиду, що кодує вищезгаданий білок, (спосіб "примування та бустингу"). Наприклад, спочатку вводять модифікований поліпептид Rv3616s (в тому числі, гібридний білок) або полінуклеотид, що кодує вищезгаданий білок, після чого слідує одне або декілька наступних введеннь з модифікованим поліпептидом Rv3616s (в тому числі, гібридного білку) або полінуклеотиду, що кодує вказаний поліпептид.

У одному втіленні, за першим введенням з модифікованим білком Rv3616s або полінуклеотидом, слідує одне або декілька наступних введеннь модифікованого білку Rv3616s. У одному втіленні, після першого введення з модифікованим білком Rv3616s або полінуклеотидом чого слідує одне або декілька наступних введеннь модифікованого полінуклеотиду Rv3616s. Звичайно, перше введення або "примування" та друге введення або "бустинг" проводять з інтервалом від біля 2-12 тижнів до 4-6 місяців. Наступні "бустингові" введення проводять з інтервалом біля 6 місяців або з інтервалом у 1, 2, 3, 4 або у 5 років. Загальноприйнятне бустинг- лікування (наприклад, перше введення білку у якості примування, після чого слідує "бустингове" введення білку) може також бути корисним у запобіганні або лікуванні туберкульозу (наприклад, у запобіганні або лікуванні латентного туберкульозу, зокрема, у запобіганні або у затримуванні реактивування туберкульозу).

У іншому аспекті, цей винахід стосується способів застосування одного або декількох вищеописаних модифікованих білків Rv3616s для діагностики туберкульозу, як то латентного туберкульозу (наприклад, за допомогою аналізів з застосуванням Т - клітинної відповіді або аналізів загальноприйнятого формату з застосуванням антитіл).

Наприклад, передбачено спосіб визначення латентної інфекції *M. tuberculosis* у суб'єкта, що полягає у:

- (a) отриманні зразка від особи;
- (b) контактуванні вказаного зразка з модифікованим білком Rv3616s;
- (c) кількісному обчисленні відповіді зразка.

Зразок може, наприклад, бути зразком крові або зразком очищених клітин. Відповідно, зразок буде містити мононуклеарні клітини периферичної крові (МПКК). У одному втіленні винаходу, особа є серопозитивною. У іншому втіленні винаходу особа є серонегативною.

Відповідно, особи не є попередньо вакцинованими проти інфекції *M. tuberculosis* (наприклад, відповідно особи не є попередньо вакцинованими з BCG).

Відповідь зразка можна кількісно обчислити за допомогою цілого ряду засобів, відомих фахівцям, в тому числі моніторингом лімфоцитарної проліферації або отриманням специфічних цитокінів або антитіл. Наприклад, для моніторингу цитокінів, як то гамма- інтерферону (IFN $\gamma$ ), інтерлейкіну 2 (IL2) та інтерлейкіну 5 (IL5), можна застосувати Т- клітинний аналіз імуоферментних плям (ELISPOT). В - клітинний аналіз імуоферментних плям можна застосувати для моніторингу стимулювання специфічних антигенів *M. tuberculosis*. Клітинну відповідь також можна характеризувати з застосуванням внутрішньо - та зовнішньоклітинного фарбування та аналізу на проточному цитометрі.

Способи кількісного обчислення поширення відповіді зразка полягають у:

(i) пульсуванні культивованих клітин з радіоактивним міченням (наприклад, тимідином з трітійем) та моніторингу поглинання трітію (наприклад, на газовому сцинтиляторі);

(ii) міченні карбоксифлуоресцеїн – діацетат – сукцинімідил ефіром (CFSE) та моніторингу флуоресценції ділення клітин на проточному цитометрі.

Кількісне обчислення цитокінової відповіді, зокрема, полягає у моніторингу продукування

гамма-інтерферону.

При застосуванні способів такого кількісного аналізу, позитивна відповідь до антигену може бути визначена співвідношенням сигналу до шуму (співвідношення S/N) у принаймні 2:1 (наприклад, принаймні 3:1 або принаймні 5:1).

У подальшому аспекті заявленого винаходу передбачені способи діагностування латентної інфекції *M. tuberculosis* з застосуванням шкірного тесту. Як тут застосовано, "шкірний тест" є будь-яким аналізом, здійсненим безпосередньо пацієнту, у якого, після внутрішньошкірної ін'єкції модифікованого, як описано вище, білку Rv153с, вимірюють реакцію гіперчутливості уповільненого типу (DTH) (як то набряк, почервоніння або дерматит). Таку ін'єкцію можна здійснити за допомогою будь-якого прийнятного пристрою, достатнього для контакту антигенної комбінації з клітинами шкіри пацієнта, наприклад, туберкулінового шприца або шприца у 1 мл. Реакцію вимірюють після певного періоду часу, наприклад, після принаймні 48 год. після ін'єкції, головним чином, після 48-72 год.

Реакція DTH є клітинно-опосередкованою імунною відповіддю, яка є більшою у пацієнтів, що були піддані дії перед тестовим антигеном. Відповідь можна візуально виміряти лінійкою. Головним чином, відповідь є позитивною, якщо вона є більшою, ніж біля 0.5 см у діаметрі, головним чином, більшою, ніж біля 1.0 см у діаметрі, що вказує на попередню інфекцію *M. tuberculosis*, яка може проявлятися або може не проявлятися в якості активного захворювання.

Для застосування у шкірному тесті, компонент модифікованого білку Rv3616с, відповідно, формують у якості фармацевтичної композиції, що містить фізіологічно прийнятний носій. Відповідно, носій, застосований у подібній фармацевтичній композиції є фізіологічним розчином з відповідними консервантами, як то фенол та/або Tween 80™.

Заявлений винахід, крім того, стосується наборів для застосування у будь-якому вищевказаному діагностичному способу. Подібні набори типово складаються з двох або більше компонентів, необхідних для проведення діагностичного аналізу. Компоненти можуть являти собою з'єднання, реагенти, контейнери та/або обладнання. Наприклад, один контейнер у наборі може містити модифікований білок Rv3616с. Такий білок може бути надано у прикріпленому до підтримуючого матеріалу вигляді. Такі набори також можуть містити реагент виявлення, що містить репортерну групу, прийнятну для прямого або непрямого визначення зв'язування антитіл.

Інші діагностичні набори охоплюють набори, розроблені для визначення клітинно - опосередкованих відповідей (що можуть, наприклад, бути застосовані у діагностичних способах заявленого винаходу). Подібні набори типово складаються з:

- (i) обладнання для отримання відповідного клітинного зразка з суб'єкта;
- (ii) засобів для стимулювання вказаного клітинного зразка з поліпептидом Rv3616с (або його варіантами, його імуногенними фрагментами або ДНК, що кодує такі поліпептиди);
- (iii) засобів для визначення або кількісного аналізу клітинної відповіді на стимулювання.

Прийнятні засоби для кількісного аналізу клітинної відповіді охоплюють набір для В-клітинного ELISPOT - аналізу або, альтернативно, набір для Т- клітинного ELISPOT - аналізу, що відомі фахівцям.

Один можливий набір складається з:

- (а) поліпептиду винаходу; та
- (б) з реагенту визначення, прийнятного для прямого або непрямого визначення зв'язування антитіл.

Окремий інтерес викликають діагностичні набори, розроблені для кількісного аналізу Т - клітинної відповіді:

Діагностичний набір, що складається з:

- (а) поліпептиду винаходу; та
- (б) обладнання, достатнього для контакту вказаного поліпептиду з клітиною шкіри суб'єкту.

Діагностичний набір, що складається з:

- (а) поліпептиду винаходу; та;
- (б) обладнання, достатнього для контакту вказаного поліпептиду зі зразком (наприклад, цільної крові або, більше відповідно, МКПК) від суб'єкта; та
- (с) засобів кількісного аналізу Т - клітинної відповіді (наприклад, проліферації або продукування гамма - інтерферону).

#### ПРИКЛАДИ

Наступні приклади не є обмежувальними та наведені тільки з ілюстративною метою. Фахівцям буде зрозумілим ряд некритичних параметрів, що можна змінювати або модифікувати для отримання по суті аналогічних результатів.

Приклад 1 – ідентифікація Rv3616с у якості мішені вакцини проти латентного туберкульозу.

Ген Rv3616с кодує консервативний гіпотетичний аланін та багатий на гліцин білок.

Rv3616с вибрали на основі повногеномного аналізу генів *Mycobacterium tuberculosis*, пов'язаних з підтриманням фази спокою та інфекційністю, як зазначено у Murphy and Brown BMC.Infect. Dis. 2007 7:84-99. Пріоритетність потенційних генетичних об'єктів фази спокою *Mycobacterium* визначили за допомогою біоінформаційного мета - аналізу опублікованих повногеномних даних мікроматричного аналізу експресії бактеріального гену зі стимульованими властивостями фази спокою. Субклітинна локалізація білків *M. Tuberculosis*, що кодується генами, згодом розповсюджуються на весь геном для визначення цілей для вакцини.

Стислим чином, завдяки тому, що експериментальні властивості моделей фази спокою виявилися дуже різними, була розроблена система від нуля до п'яти балів для нормалізації цих даних на основі двох критеріїв: 1) відповідності експериментальних умов до фази спокою та 2) рангового порядку експресії. Максимальний рахунок для окремих експериментальних даних відрегулювали на основі потенційної відповідності клінічному проявленню фази спокою інфекції *M. tuberculosis*. У Таблиці 1 наведені набори даних, зібраних для Етапу 1 разом з максимальною скоригованою оцінкою для кожного набору даних. Додаткові набори даних по важливості гену для зростання були отримані з опублікованих досліджень з застосуванням способу генного нокауту на основі транспозонів (TraSH). Гени, що не впливають на зростання, отримали нульову відмітку.

Таблиця 1 – джерела, експериментальні моделі та критерії класифікації для мікроматричного аналізу генетичної експресії ДНК *M. tuberculosis* та повногеномного генного нокауту (важливість фази зростання).

Посилання	Експериментальна модель	Момент часу: максимальна оцінка <sup>a</sup>
Betts JC et al. Mol.Microbiol.2002 43:717-731	Голодування з контрольованим O <sub>2</sub>	96.h:3 24h:2 4h: 1
Hampshire T et al. Tuberculosis.(Edinb.) 2004 84:228-238	Втрата поживних речовин з контрольованим O <sub>2</sub>	62 та 75d: 5 49d:4 18d: 2
Muttucumaru DG et al. Tuberculosis.(Edinb.) 2004 84:239-246	Модель гіпоксії по Вейну <sup>#</sup>	14d (NRP-2): 4 7d (NRP-1): 2
Voskuil MI et al. Tuberculosis.(Edinb.) 2004 84:218-227	Модель гіпоксії по Вейну <sup>#</sup>	30 та 80d: 5 14 та 20d: 4 10 та 12d: 3 6 та 8d: 2
Schnappinger D et al. J. Exp. Med. 2003 198:693-704	Інфікування мишачих макрофагів, +/- γ-INF	24 та 48h: 5
Karakousis PC et al. J. Exp.Med. 2004 200:647-657	Пористоволоконний підшкірний імплант у мишей	10d: 3
Talaat AM et al. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A2004,101:4602-4607	Інфікування мишей. MTB зібрано з легень <sup>b</sup>	28d: 3
Sasseti CM et al. Mol.Microbiol.2003 48:77-84	TraSH-мутовані бібліотеки, що підрощували на твердому середовищі	14d: 5
Rengarajan J et al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2005, 102:8327-8332	Інфікування мишачих макрофагів, +/- γ-INF з TraSH-мутованих бібліотек <i>M. tuberculosis</i>	7d: 5
Sasseti CM et al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2003 100:12989-12994	Миші C57BL/6J, інфіковані з TraSH-мутованих бібліотек <i>M. tuberculosis</i>	7, 14, 28 та 56d: 5

<sup>a</sup> максимальна оцінка на основі доречності у якості моделі фази спокою;

h = годин; d = день.

<sup>b</sup> Співвідношення *M. tuberculosis* з легень мишей Balb/c до MTB у аерованій культурі на 28 день.

<sup>#</sup> Wayne LG та Hayes LG Infect. Immun. 1996 64:2062-2069

Етап 2 - При застосуванні другого критерію, ранговий порядок експресії гена, оцінки гена з кожного набору даних розташували у порядку від найвищого до найнижчого на основі



співвідношення експресії (кратність експресії у експериментальних умовах порівняно з клітинами у лог-фазі суспензійної культури). Ген з найвищою оцінкою отримав максимальну кількість балів для певного набору даних (перелічено у колонці 3 Таблиці 1. (наприклад, 5, 4...1 бал)). Оцінка знижувалася на 0,005 бала для кожного гена в порядку до нуля або було

5 досягнуто кінця набору даних. Отже, коли максимальна оцінка сягала 4 пункти, ген на сотому місті отримував оцінку 3.500. Для максимальної оцінки у 5 балів, було оцінено 1000 генів або 25 % геному *M. tuberculosis*. Для експериментів, де були зібрані дані з декількох моментів часу, в якості остаточної оцінки застосували максимальну кількість балів у всіх тимчасових точках.

10 На Етапі 3 оцінки для кожного гена у кожній з експериментальних умов збрали у базу даних Microsoft Access. Для сприяння пріоритетності додали поля посилань, як то Refseq ID, функція (Genbank), примітка (Genbank), класифікація по Tuberculist classification, KEGG та посилання від Sanger Center. За допомогою об'єднання даних від різних досліджень та джерел, була досягнута консенсусна точка зору стосовно найбільш критичних для виживання у стані спокою окремих генів та шляхів.

15 На Етапі 4, в результаті застосування понад 400 оцінених генів (~10 % геному), був отриманий перелік пріоритетності терапевтичних цілей, доповнений експертним обчислювальним аналізом та аналізом вручну біохімічних шляхів, ензимології, зручності ліків, гомології з генами людини та інших попередніх знань. Переважна більшість генів, що отримали високі оцінки, походять з субпопуляції, де перетинаються дві або три групи.

20 На Етапі 5, у межах цілого геному проводили ідентифікацію субклітинно локалізованих білків *M. Tuberculosis*, що кодуються генами. Евристичний спосіб, застосований для передбачення мембранного білку описаний у Chalker et al. J. Bacteriol. 2001 183:1259-1268. Були отримані середні профілі гідрофобності (H) (von Heijne G J. Mol. Biol. 1992 225:487-494) з застосуванням GES значень гідрофобності (Engelman DM et al. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 1986 15:321-353), зважених за допомогою трапеційного вікна. В результаті застосування процесу, подібного до початкових етапів алгоритму TopPred II (Claros MG et al. Comput. Appl. Biosci. 1994 10:685-686), для кожної пептидної послідовності була передбачена наявність гвинтових трансмембранних сегментів (TMS) шляхом відбору 19 амінокислот, що знаходилися у центрі найвищого значення H (MaxH), маскуванням їх від подальшого розгляду та повторенням процесу, доки не залишиться жоден пік з  $H > 0.5$ . Субклітинні місця визначено на основі пікового значення MaxH, кількості сегментів з  $H > 1.0$ , та розподіленню та піковим значенням H путативного TMS. Відсічку MaxH у 1.15 вибрали для максимізування розрізнення між двома базами даних SwissProtein, що випустили 34 тестові бази даних, що охоплюють, відповідно, трансмембранні та цитоплазматичні білки (Boyd D et al. Protein Sci. 1998 7:201-205). Білки з MaxH < 1.15 класифікували, як цитоплазматичні, в той час, як білки з MaxH > 1.15 та принаймні три можливих TMS класифікували, як мембранні білки.

30 Було визначено, що закріплені білки точно мають два TMS, де один починається перед амінокислотою (aa) 35 та має H > 1.15 з іншим, що має H не менш, ніж 0.5. Для визначення секретованих білків серед тих, що класифікуються у евристичному аналізі як "цитоплазматичні" або "невідомі" для *M. bacterium* специфічно застосували SignalP з грам - позитивними налаштуваннями (Nielsen H et al. Protein Eng. 1997 10:1-6).

Rv3616c відмічено у якості сильного вакцинного антигену відповідно по декільком критеріям:

45 (i) Rv3616c послідовно активується у всіх моделях стану спокою. Серед повного набору у 3999 оцінених у мета-аналізі генів, Rv3616c був відмічений у верхній квартилі генів з надлишковою експресією у всіх моделях стану спокою. Оцінка підвищуючої регуляції для Rv3616c сягала 6.52, що сприятливо можна порівняти з найвищою оцінкою гена у 22.28.

(ii) Rv3616c відмічений, як дуже важливий для виживання у мишачій моделі інфекції селезінки (оцінка 4.945 з можливих 5 балів).

50 (iii) Субклітинна локалізація передбачає, що білок Rv3616c є мембранно-зв'язаним білком, отже має значний позаклітинний вплив, що вказує на придатність в якості вакцинної мішені.

(iv) Rv3616c може викликати захисну відповідь проти початкового туберкульозного інфікування.

(v) Rv3616c широко відомий у якості антигену.

Приклад 2 - передбачення епітопу Rv3616c.

55 В основі передбачення Т – клітинного епітопу лежать наступні підходи:

Передбачення	Назва	URL/посилання
CD4 та CD8	Multipred	Веб-сайт: <a href="http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/">antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/</a> Zhang, G.L., Khan, A.M., Srinivasan, K.N., August, J.T. and Brusic, V. (2005) "MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides" <i>Nucleic Acids Res.</i> 33, W172-W179.
	SVMHC	Веб-сайт: <a href="http://www.bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC">www.bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC</a> "Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC." Pierre Dönnies and Arne Elofsson in: <i>BMC Bioinformatics</i> 2002 3: 25
CD4	ProPred	Веб-сайт: <a href="http://www.imtech.res.in/raghava/propred/">www.imtech.res.in/raghava/propred/</a> Singh, H. and Raghava, G.P.S.(2001) "ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites". <i>Bioinformatics</i> , 17(12), 1236-37.
	Tepitope2	Службова програма на основі: H. Bian, J. Hammer (2004) "Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE". <i>Methods</i> 34: 468-75
CD8	nHLA	Веб-сайт: <a href="http://www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/">www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/</a> Bhasin M. and Raghava G P S (2006) "A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes"; <i>J. Biosci.</i> 32:31-42
	NetCTL	Веб-сайт: <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/">www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/</a> "An integrative approach to CTL epitope prediction. A combined algorithm integrating MHC-I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions". Larsen M.V., Lundegaard C., Kasper Lamberth, Buus S., Brunak S., Lund O., and Nielsen M. <i>European Journal of Immunology</i> . 35(8): 2295-303. 2005
	EpiJen	Веб-сайт: <a href="http://www.jenner.ac.uk/EpiJen/">www.jenner.ac.uk/EpiJen/</a> Doytchinova, I. A., P. Guan, D. R. Flower. "EpiJen: a server for multi-step T cell epitope prediction". <i>BMC Bioinformatics</i> , 2006, 7, 131.
	Syfpeithi	Веб-сайт: <a href="http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm">www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm</a> Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Nikolaus Emmerich, Oskar Alexander Bachor, Stefan Stevanovic: "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs". <i>Immunogenetics</i> (1999) 50: 213-219
	PredTAP	Веб-сайт: <a href="http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predTAP/">antigen.i2r.a-star.edu.sg/predTAP/</a> Zhang, G.L., Petrovsky, N., Kwok, C.K., August, J.T. and Brusic, V. (2006) "PRED <sup>TAP</sup> : a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing". <i>Immunome Res.</i> 2(1), 3.
	PAPROC	<a href="http://www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html">http://www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html</a> C. Kuttler, A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.-G. Rammensee, H. Schild, K.P. Haderl, "An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages", <i>J. Mol. Biol.</i> 298 (2000), 417-429 A.K. Nussbaum, C. Kuttler, K.P. Haderl, H.-G. Rammensee, H. Schild, "PAPROC: A Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW", <i>Immunogenetics</i> 53 (2001), 87-94

Результати:

Таблиця 2 – Передбачені Rv3616с CD4+Т клітинні епітопи людини

Номер передбаченого епітопу CD4	Амінокислотне положення	Послідовність епітопу	SEQ ID No:	HLA - алель
1	5	FIIDPTISA	SEQ ID No: 29	DRB1_0301, DRB1_0401, DRB1_1101
2	31	ILYSSLEYF	SEQ ID No: 30	DRB1_0301
3	36	LEYFEKALE	SEQ ID No: 31	DRB1_1301
4	63	YAGKNRNHV	SEQ ID No: 32	DRB1_0801
5	87	LIHDQANAV	SEQ ID No: 33	DRB1_0301, DRB1_0401
6	111	FVRPVAVDL	SEQ ID No: 34	DRB1_0101
7	119	LTYIPVVGH	SEQ ID No: 35	DRB1_0401
8	121	YIPVVGHAL	SEQ ID No: 36	DRB1_0101
9	151	YLVVKT LIN	SEQ ID No: 37	DRB1_0401
10	152	LVVKT LIN A	SEQ ID No: 38	DRB1_1301
11	154	VKT LIN ATQ	SEQ ID No: 39	DRB1_0401
12	164	LKLLAKLAE	SEQ ID No: 40	DRB1_0301, DRB1_0801, DRB1_1101, DRB1_1301
13	173	LVAAAIADI	SEQ ID No: 41	DRB1_0301, DRB1_1101, DRB1_1301
14	181	IISDVADII	SEQ ID No: 42	DRB1_0301
15	197	WEFITNALN	SEQ ID No: 43	DRB1_0401
16	252	LFGAAGLSA	SEQ ID No: 44	DRB1_1501
17	264	LAHADSLAS	SEQ ID No: 45	DRB1_0401
18	270	LASSASLPA	SEQ ID No: 46	DRB1_0401
19	288	FGGLPSLAQ	SEQ ID No: 47	DRB1_0401

5 Таблиця 3 – Передбачені Rv3616с CD8+Т - клітинні епітопи людини

Номер передбаченого епітопу CD8	Амінокислотне положення	Послідовність епітопу	SEQ ID No:	HLA - алель
1	5	FIIDPTISA	SEQ ID No: 48	A2
2	6	IIDPTISAI	SEQ ID No: 49	A_0101, A2
3	9	PTISAI DGL	SEQ ID No: 50	A2, A_0201, B7, B8
4	10	TISAI DGL Y	SEQ ID No: 51	A1, A_0101, A3, A_0301
5	12	SAI DGL YDL	SEQ ID No: 52	A2, B_3501
6	13	AIDGL YDLL	SEQ ID No: 53	A_0101, A_0201, B44
7	17	LYDLL GIGI	SEQ ID No: 54	A24
8	25	IPNQGGILY	SEQ ID No: 55	B7, A_0101, B_3501, B51
9	30	GILYSSLEY	SEQ ID No: 56	A1, A_0101, A3, A_0301
10	33	YSSLEYFEK	SEQ ID No: 57	A1, A_0301
11	35	SLEYFEKAL	SEQ ID No: 58	A_0201, B7, Cw_0401, Cw_0602

Номер передбаченого епітопу CD8	Амінокислотне положення	Послідовність епітопу	SEQ ID No:	HLA - алель
12	38	YFEKALEEL	SEQ ID No: 59	A24, A_2402, B8, Cw_0401, Cw_0602
13	39	FEKALEELA	SEQ ID No: 60	B44, B_4403
14	69	NHVNFFQEL	SEQ ID No: 61	A24, Cw_0602
15	76	ELADLDRQL	SEQ ID No: 62	A_0201
16	77	LADLDRQLI	SEQ ID No: 63	A_0101, B51
17	79	DLDRQLISL	SEQ ID No: 64	A_0101, A_0201
18	80	LDRQLISLI	SEQ ID No: 65	A24, B7, B51
19	94	AVQTTRDIL	SEQ ID No: 66	B7
20	103	EGAKKGLEF	SEQ ID No: 67	A24, B7
21	107	KGLEFVRPV	SEQ ID No: 68	A_0201, B51
22	108	GLEFVRPVA	SEQ ID No: 69	A_0101, A_0301
23	109	LEFVRPVAV	SEQ ID No: 70	B44
24	111	FVRPVAVDL	SEQ ID No: 71	B7, B8, B_3501
25	113	RPVAVDLTY	SEQ ID No: 72	B7, A_0101, B_3501, B51
26	116	AVDLTYIPV	SEQ ID No: 73	A2, A_0201
27	120	TYIPVVGHA	SEQ ID No: 74	A24
28	121	YIPVVGHAL	SEQ ID No: 75	A_0101, A2, A_0201, B7, B8
29	129	LSAAFQAPF	SEQ ID No: 76	A1, B7, B_3501
30	130	SAAFQAPFC	SEQ ID No: 77	A_0201
31	131	AAFQAPFCA	SEQ ID No: 78	A_0301, B_3501
32	133	FQAPFCAGA	SEQ ID No: 79	A2, A_0201
33	135	APFCAGAMA	SEQ ID No: 80	B7, B_3501
34	136	PFCAGAMAV	SEQ ID No: 81	A3
35	141	AMAVVGAL	SEQ ID No: 82	A2, A_0201, A24, B7
36	143	AVVGALAY	SEQ ID No: 83	A1, A3, A_0301, B7
37	147	GALAYLVVK	SEQ ID No: 84	A3, A_0301
38	149	LAYLVVKTL	SEQ ID No: 85	B8, B44, B51
39	150	AYLVVKTLI	SEQ ID No: 86	A24
40	155	KTLINATQL	SEQ ID No: 87	A_0201, A2, A_0301, A24
41	156	TLINATQLL	SEQ ID No: 88	A2, A_0201, A3, A_0101, Cw_0401
42	158	INATQLLKL	SEQ ID No: 89	B7, B8, Cw_0602
43	159	NATQLLKLL	SEQ ID No: 90	A_2402, B7, B_3501, B44, Cw_0401, Cw_0602
44	162	QLLKLLAKL	SEQ ID No: 91	A2, A_0201, A_0301, A_2402, B8, Cw_0401, Cw_0602
45	165	KLLAKLAEL	SEQ ID No: 92	A2, A_0201, A_0301, B7, B8, Cw_0602
46	166	LLAKLAELV	SEQ ID No: 93	A2, A_0201, A_0101, B8
47	169	KLAELVAAA	SEQ ID No: 94	A2
48	170	LAELVAAAI	SEQ ID No: 95	A1, A24, B51
49	173	LVAAAIADI	SEQ ID No: 96	B7, B51

Номер передбаченого епітопу CD8	Амінокислотне положення	Послідовність епітопу	SEQ ID No:	HLA - алель
50	177	AIADIISDV	SEQ ID No: 97	A2, A_0201, Cw_0602
51	178	IADIISDVA	SEQ ID No: 98	A_0101, B_3501
52	182	ISDVADIIK	SEQ ID No: 99	A1, A_0301
53	192	TLGEVWEFI	SEQ ID No:100	A2, A_0201
54	199	FITNALNGL	SEQ ID No:101	A2
55	202	NALNGLKEL	SEQ ID No:102	B51, A_2402, B_3501, Cw_0602
56	213	KLTGWVTGL	SEQ ID No:103	A2, A_0201
57	214	LTGWVTGLF	SEQ ID No:104	A1, A_0101, A24
58	225	GWSNLESFF	SEQ ID No:105	A24
59	228	NLESFFAGV	SEQ ID No:106	A2, A_0201
60	231	SFFAGVPGL	SEQ ID No:107	A2, A_0201, A24, Cw_0401
61	238	GLTGATSGL	SEQ ID No:108	A2, A_0201
62	246	LSQVTGLFG	SEQ ID No:109	A1, B8
63	247	SQVTGLFGA	SEQ ID No:110	A2
64	258	LSASSGLAH	SEQ ID No:111	A1, A3, B7, B8
65	260	ASSGLAHAD	SEQ ID No:112	A1, A3, A_0301
66	262	SGLAHADSL	SEQ ID No:113	A_0201
67	263	GLAHADSLA	SEQ ID No:114	A_0101, A_0201, A_0301
68	269	SLASSASLP	SEQ ID No:115	A_0201, A_0301
69	271	ASSASLPAL	SEQ ID No:116	B7
70	286	SGFGGLPSL	SEQ ID No:117	A2, A_0201, B51
71	291	LPSLAQVHA	SEQ ID No:118	B7, B_3501, B51
72	298	HAASTRQAL	SEQ ID No:119	B7, B8, B_3501
73	301	STRQALRPR	SEQ ID No:120	A3, A_0301
74	307	RPRADGPVG	SEQ ID No:121	B7, B_0702, B8, B51
75	319	EQVGGQSQL	SEQ ID No:122	B7, B44
76	350	GASKGTTTK	SEQ ID No:123	A3, A_0301
77	351	ASKGTTTKK	SEQ ID No:124	A3, A_0301
78	353	KGTTTKKYS	SEQ ID No:125	A_0301, B8
79	368	TEDAERAPV	SEQ ID No:126	B44

Як можна побачити у Таблицях 2 та 3, Rv3616с містить кілька передбачених CD4+ та CD8 Т - клітинних епітопів. Крім того, ця інформація наводить на думку про те, що білок несе епітопи, які можуть бути впізнані HLA, що зустрічаються по всьому світу

5 (це - HLA від суб'єктів з Кавказу, Африки, Азії або Латинської Америки – див. веб-сайт [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net)).

Приклад 3 – ідентифікація епітопу Rv3616с.

10 Отримана серія з 30 перекриваючихся пептидів, що покривають всю довжину Rv3616с (детальніше, див. Фіг. 1 та SEQ ID Nos: 127-156) та перевірена на здатність стимулювати МКПК з чотирьох PPD+ донорів.

Дані, наведені у Фіг. 2, показують, що пептиди 1-7 та 17-30 були імуногенні для цих осіб. Ці пептиди, відповідно, знаходяться всередині послідовності модифікованого білку Rv3616с винаходу.

15 Слід відмітити, що пептиди 8-16 (амінокислотні залишки 92-215) можуть бути імуногенними у іншої особи іншого типу HLA.

Приклад 4 – гомологи Rv3616с H37Rv

Послідовності Rv3616с з декількох штамів *M. tuberculosis* та BCG ідентифікували з застосуванням програми пошуку гіпотетичних гомологів BLASTP у GenBank (референсний зразок послідовності H37Rv під номером NP\_218133.1):

20

Штам	Номер зразка	% ідентичності
CDC1551	NP_338263.1	99
F11	YP_001289574.1	99
Haarlem	ZP_02248979.1	99
C	ZP_00877472.1	99
BCG	YP_979759.1	99

Вирівнювання гомологічних послідовностей вказує на їх високий рівень ідентичності.

5 Поліпептиди можна піддати скринінгу на їх здатність до активування Т-клітин (індукування проліферації та/або продукування цитокінів) у мононуклеарних клітинах (МКПК) периферичної крові або у препаратах цільної крові з інфікованої (як то латентно інфікованої) особи. Латентно інфіковані особи звичайно визначають за допомогою шкірного тесту, що має діаметр більший, ніж 10 мм та вони не мають симптомів, не мають Mtb позитивної культури, мокротіння та уражень (як виявлено рентгеноскопією грудного відділу). На основі зразків МКПК або цілої крові можна зробити цілий ряд аналізів *in vitro*: за допомогою фарбування з CFSE/проточної цитометрії можна визначити ступень проліферації клітин після рестимулювання у присутності антигену (або його варіанту / імуногенного фрагмента по мірі необхідності) або провести кількісний аналіз отриманих цитокінів (наявних у супернатанті культивованих клітин та виміряних за допомогою ІФА або після внутрішньоклітинного фарбування CD4 та CD8 Т-клітин та проточною цитометрією). Наприклад, можна отримати зразки МКПК з цільної гепаринізованої крові за допомогою центрифугування з Ficoll-Hyraque градієнтом щільності у відповідності зі стандартними процедурами. Клітини потім можна промити та до початку досліджень зберігати у рідкому азоті (більш детально, див. у Lalvani A et al. J. Infect. Dis. 1999 180:1656-1664).

20 Специфічну імунну відповідь можна характеризувати за допомогою аналізу лімфоцитарної проліферації з застосуванням міченого тритієм тимідину. Цей спосіб оцінює розповсюдження клітин з стимулюванням антигену *in vitro*. Практично, клітинну проліферацію визначають оцінюванням включень міченого тритієм тимідину у ДНК, де цей процес тісно пов'язаний з основними змінами у кількості клітин. Більш відповідно, лімфоцитарну проліферацію можна отримати з застосуванням сукцинімідолового ефіру карбоксифлуоресцеїн діацетату (CFSE). CFSE спонтанно та необоротно приєднується до внутрішньоклітинних білків та до білків клітинної поверхні шляхом реакції з лізиновими бічними ланцюгами та іншими прийнятними аміногрупами. При діленні лімфоцитарної клітини, CFSE - мічення розподіляється порівну між клітинами, що виникли, що таким чином отримують половину флуоресцентності. В результаті, у популяції проліферуючих клітин кожне подальше покоління буде відмічено половинним падінням рівня інтенсивності клітинної флуоресценції, що можна легко виміряти за допомогою проточної цитометрії (детальніше, див. Hodgkins, PD et al J. Exp. Med. 1996 184:277-281). Практично після відтавання, РМБС можна промити та піддати фарбуванню з CFSE перед культивуванням ( $2 \times 10^5$  клітин) протягом 72 год. з 10 мкг/мл антигену у культуральному середовищі (RPMI-1640, збагаченому глютаміном, несуттєвими амінокислотами, піруватом та термоінактивованою АВ сироваткою людини). Потім клітини можна зібрати та дослідити їх фенотип за допомогою поверхневого фарбування для виявлення пам'яті CD8 та CD4+Т-клітин. 35 Потім, для ідентифікації ступеню лімфоцитарної проліферації у відповідь до кожного антигену (відсоток клітин зі зменшеною інтенсивністю CFSE у результаті стимулювання *in vitro*) можна буде застосувати проточну цитометрію.

40 Отримання IFN- $\gamma$  (або отримання інших цитокінів, як то, наприклад, IL2, TNF-альфа, IL5, IL12 тощо) можна виміряти з застосуванням твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА). На планшети для ІФА можуть бути нанесені мишачі моноклональні антитіла, спрямовані до IFN- $\gamma$  людини (PharMingen, San Diego, CA) у PBS з інкубуванням протягом чотирьох годин при кімнатній температурі. Потім, лунки блокують PBS, що містить 5 % (співвідношення ваги до обсягу) знежиреного сухого молока з інкубуванням протягом 1 години при кімнатній температурі. 45 Потім планшети промивають, наприклад, шість разів у PBS/0.2 % TWEEN-20 та зразки розводять 1:2 у культуральному середовищі у планшетах для ІФА та інкубують протягом ночі при кімнатній температурі. Потім планшети знову промивають та у кожен лунку можна буде додати поліклональну анти-людинну сироватку IFN- $\gamma$  кролів, наприклад, з розведенням 1:3000 у PBS/10 % нормальної сироватки кіз. Потім планшети інкубують протягом двох годин при кімнатній температурі, промивають та до них додають сполучену з пероксидазою хрину анти-кролячу IgG (Sigma Chemical So., St. Louis, MO), наприклад, з розведенням 1:2000 у PBS/5 % знежиреного сухого молока. Після додаткового двохгодинного інкубування при кімнатній температурі, планшети промивають та додають субстрат ТМВ. Реакцію можна зупинити 1 н. сірчаною кислотою через 20 хв. Потім можна визначити оптичну щільність при 450 нм з 50

застосуванням референтної довжини хвилі у 570 нм. Звичайно, фракції, отримані у обох реплікатів показують оптичну щільність у два рази більшу, ніж значення оптичної щільності клітин, культивованих окремо у середовищі, що може вважатися позитивним результатом.

Приклад 5 - імуногенність Rv3616с у мишей CB6F1.

5 Імуногенність антигену оцінювали у мишей CB6F1 (перше покоління від схрещування мишей BALB/с та C57BL/6).

Мишей CB6F1 тричі (у 0, 14 та 28 добу) внутрішньом'язово імунізували 0.5 мкг білкового антигену у комбінації з адьювантною системою Adjuvant System AS01E

(препарат ліпосомного адьюванту, що містить 3D-MPL та QS21).

10 План експерименту виглядав наступним чином:

Група	0 доба	14 доба	28 доба
1	0.5 мкг Rv3616с/AS01E	0.5 мкг Rv3616с/AS01E	0.5 мкг Rv3616с/AS01E

Загалом у групі протоколу застосували 24 миші.

15 Лімфоцити периферичної крові (PBL) зібрали та об'єднали у 21 добу (тобто, через 7 днів після другої імунізації) та у 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації) та антиген - специфічні CD4 & CD8 Т - клітинні відповіді (як визначено CD4 або CD8 Т – клітинами, що продукували IL-2 та/або гамма-інтерферон та/або TNF- альфа) вимірювали за допомогою проточної цитометрії після рестимулювання *in vitro* протягом ночі з пулами 15 - мерних пептидів, що охоплюють інтересуючі послідовності.

20 Визначення мишачих Т – клітин, що експресують IL-2 та/або гамма-інтерферон та/або TNF-альфа проводили з застосуванням короткотривалої керованої антигеном *in vitro* ампліфікації цитокинової експресії.

25 Стисло кажучи, розчин PharmLyse (BD-Pharmingen) додали до гепаринізованої мишачої периферичної крові для лізування еритроцитів. Отримані лімфоцити периферичної крові (PBL) промили та потім інкубували у присутності пулу 15-мерних пептидів, що перекриваються 11 амінокислотами, що охоплюють послідовність інтересуючого антигену та 1 мкг/мл антитіл до CD28 та CD49d (BD-Pharmingen). Кожного з 15-мерних пептидів застосували з кінцевою концентрацією у 1 мкг/мл. Контролі середовища також стимулювали з антитілами до CD28 та CD49d.

30 З'єднання брэфелдин-А (BD-Pharmingen), що блокує цитокинову секрецію додали через 2 год. після початку культивування при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> та клітини продовжували інкубувати ще додаткові 4 год. при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, після чого інкубували протягом ночі при +4 °C.

35 Далі клітини зібрали та пофарбували з Pacific Blue-сполученими анти-CD4 (BD - клон RM4-5, BD-Pharmingen) та з перидинін - хлорофіл А протеїн (PerCp) ціанін 5.5 (Cy5.5)-сполученими анти-CD8 альфа (клон 53-6.7, BD-Pharmingen) антитілами.

40 Потім клітини промили, зафіксували, пермеабілізували (змінювали проникність клітинних мембран за допомогою набору Cytofix-cytoperm kit, BD-Pharmingen) та пофарбували з алофкоціанін-сполученими анти-IFN-γ антитілами (клон XMG1.2, BDPharmingen), флуоресцеїн-ізотіоціанат(FITC)-сполученими анти-IL-2 антитілами (клон JES 6-5H4, Beckman Coulter) та фікоеритрин(PE)- сполученими анти-TNF альфа антитілами (клон MP6-XT22, BD-Pharmingen). Після кінцевих промивань, пофарбовані клітини аналізували на проточному цитометрі LSR II (Beckton-Dickinson). Мінімум 10,000 клітин отримано у вигляді CD8 + субпопуляція.

Додаткову довідкову інформацію див. у Walzer T et al Cell Immunol. 2000 206(1):16-25 та Maecker HT et al J. Immunol. Methods 2001 255(1-2):27-40.

45 Деякі клітини також культивували протягом ночі *in vitro* у культуральному середовищі (нестимульованому) в якості негативних контролів. Антиген - специфічні відповіді обчислювали відніманням середньої цитокинової відповіді, що продукували нестимульовані клітини від середньої цитокинової відповіді, що продукували пептид - стимульовані клітини.

50 У кожен момент часу та для кожної групи були зібрані дані з 4 пулів по 6 мишей у кожному. Наведені нижче дані презентовано у вигляді відсотка CD4 або CD8 Т - клітин, що продукують IL-2 та/або гамма-інтерферон та/або TNF-альфа. Кожен індивідуальний пул мишей був графічно зображений (трикутники), разом з середнім значенням групи (лінія).

55 Фіг. 3 показує, що на 21 добу (тобто, через 7 днів після другої імунізації), у мишей, імунізованих 0.5 мкг Rv3616с/AS01E були визначені Rv3616с- специфічні CD4 та CD8 Т - клітинні відповіді.

Фіг. 4 показує цитокиновий профіль CD4 Т - клітинної відповіді з пул-стимульованих пептидом Rv3616с лімфоцитів периферичної крові (без видалення середовища) на 21 добу (тобто, через 7 днів після другої імунізації).

Фіг. 5 показує цитокиновий профіль CD8 Т - клітинної відповіді з пул-стимульованих пептидом Rv3616с лімфоцитів периферичної крові (без видалення середовища) на 21 добу (тобто, через 7 днів після другої імунізації).

Фіг. 6 показує, що на 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації), у мишей, імунізованих 0.5 мкг Rv3616с/AS01Е були визначені Rv3616с- специфічні CD4 та CD8 Т - клітинні відповіді. Третя доза збільшила тільки CD4 Т - клітинну відповідь, але не CD8 Т - клітинну відповідь. Завдяки технічним складностям, ці дані є в наявності тільки для одиничного пулу.

Фіг. 7 показує цитокиновий профіль CD4 Т - клітинної відповіді з пул-стимульованих пептидом Rv3616с лімфоцитів периферичної крові (без видалення середовища) на 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації). Завдяки технічним складностям, ці дані є в наявності тільки для одиничного пулу.

Фіг. 8 показує цитокиновий профіль CD8 Т - клітинної відповіді з пул-стимульованих пептидом Rv3616с лімфоцитів периферичної крові (без видалення середовища) на 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації). Завдяки технічним складностям, ці дані є в наявності тільки для одиничного пулу.

Приклад 6 – імуногенність Rv3616с у мишей C57BL/6.

Була також проведена оцінка імуногенності антигену у мишей C57BL/6.

Миші C57BL/6 тричі внутрішньом'язово імунізували (у 0, 14 та 28 добу досліджень) 1 мкг білкового антигену у комбінації з адьювантною системою Adjuvant System AS01Е (ліпосомальний адьювантний препарат, що містить 3D-MPL та QS21).

План експерименту виглядав наступним чином:

Група	0 доба	14 доба	28 доба
1	1 мкг Rv3616с/AS01Е	1 мкг Rv3616с/AS01Е	1 мкг Rv3616с/AS01Е

Лімфоцити периферичної крові (PBL) зібрали та об'єднали на 21 добу (тобто, через 7 днів після другої імунізації) та на 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації) та антиген - специфічні CD4 & CD8 Т - клітинні відповіді (як визначено CD4 або CD8 Т – клітинами, що продукували IL-2 та/або гамма-інтерферон та/або TNF-альфа) виміряли за допомогою проточної цитометрії після рестимулювання *in vitro* протягом ночі з пулами 15 - мерних пептидів, що охоплювали інтересуючі послідовності. Процедура проходила, як описано вище.

Деякі клітини також культивували протягом ночі *in vitro* у культуральному середовищі (нестимульованому) у якості негативних контролів. Антиген - специфічні відповіді обчислювали відніманням середньої цитокинової відповіді, що продукували нестимульовані клітини від середньої цитокинової відповіді, що продукували пептид - стимульовані клітини.

У кожен момент часу та для кожної групи, дані збирали від 4 пулів по 6 мишей у кожному. Вказані нижче дані наведені у вигляді відсотку CD4 або CD8 Т – клітин, що продукують IL-2 та/або гамма-інтерферон та/або TNF-альфа. Кожен індивідуальний пул мишей був графічно зображений (трикутники), разом з середнім значенням групи (лінія).

Фіг. 9 показує, що на 21 добу (тобто, через 7 днів після другої імунізації), у мишей, імунізованих 1 мкг Rv3616с/AS01Е були визначені Rv3616с- специфічні CD4 та CD8 Т - клітинні відповіді, хоча антиген - специфічна CD8 Т - клітинна відповідь була дуже низькою (внаслідок цього, дані цитокинового профілю тут не наведені).

Фіг. 10 показує цитокиновий профіль CD4 Т - клітинної відповіді з пул-стимульованих пептидом Rv3616с лімфоцитів периферичної крові (без видалення середовища) на 21 добу (тобто, через 7 днів після другої імунізації).

Фіг. 11 показує, що на 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації), у мишей, імунізованих 1 мкг Rv3616с/AS01Е були визначені Rv3616с- специфічні CD4 та CD8 Т - клітинні відповіді. Третя імунізаційна доза збільшила CD4 Т - клітинні відповіді та незначно збільшила CD8 Т - клітинні відповіді.

Фіг. 12 показує цитокиновий профіль CD4 Т - клітинної відповіді з пул-стимульованих пептидом Rv3616с лімфоцитів периферичної крові (без видалення середовища) на 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації).

Фіг. 13 показує цитокиновий профіль CD8 Т - клітинної відповіді з пул-стимульованих пептидом Rv3616с лімфоцитів периферичної крові (без видалення середовища) на 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації).

Приклад 7 - Впізнання *in vitro* Rv3616с клітинами МКПК, отриманих від людей з латентною формою туберкульозу.

Експерименти проводили для оцінки периферичної Т - клітинної відповіді, специфічної до винайденого антигену у 4 здорових дорослих людей, що раніше не брали участь у подібних



експериментах (туберкулінова проба = 0 мм) та у 8 дорослих людей, що мали туберкульоз у латентній формі (туберкулінова проба =15 мм або вище) з Південної Африки.

Дані туберкулінової проби.

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

5

Клітинно-опосередковану імунну (CMI) відповідь оцінювали вимірюванням цитокінів у виділених мононуклеарних клітинах (МКПК) периферичної крові за допомогою аналізу внутрішньоклітинного фарбування цитокіну (ICS).

10 Аналіз ICS проводили у вигляді адаптації попередньо описаної методології (див. Von Eschen et al, Hum. Vaccin. 2009 5(7)). МКПК стимулювали in vitro одним пулом 15 - мерних пептидів, що перекривалися 11 амінокислотами, що охоплюють всю послідовність інтересуючого антигену. Клітини стимулювали з пептидами протягом двох годин, далі культивували протягом ночі у присутності брефелдину А, потім піддали обробці для ICS та проаналізували з застосуванням проточного цитометру. Були виміряні кількості антиген - специфічних CD3+CD4+ або

15 CD3+CD8+T – клітин, що експресують гамма-інтерферон та/або TNF-альфа та/або IL-17. Клітинні відповіді, стимульовані середовищем відняли від відповідей, отриманих у клітинах, стимульованих пептидними пулами.

ICS: антитіла

Анти - CD3 PO (Invitrogen – cat CD0330)

20 Анти - CD4 PB (BD-cat 558116)

Анти - CD8 APC-H7 (BD-cat 641400)

Анти - IFNγ AF700 (BD-Pharmingen-cat 557995)

Анти - TNF PE-Cy7 (BD-Pharmingen-cat 557647)

Анти - IL17 AF647 (BD-Pharmingen-cat 51-7178-71)

25 Результати наведені у вигляді кількості антиген - специфічних CD3+CD4+T - клітин, що експресують TNF-альфа та IFN-гамма, на мільйон CD3+CD4+T – клітин, оскільки ці клітини представляють головну популяцію антиген - специфічних CD4 T - клітин (фоновий рівень відповіді, спричинений середовищем було усунено). Антиген - специфічних CD3+CD8+T - клітин виявлено не було. Фіг. 14 показує, що антиген - специфічну CD4 T - клітинну відповідь

30 вимірювали у 6 з 8 латентно інфікованих осіб (та не у осіб під номерами 7 та 74), порівняно до неспецифічної CD4 T - клітинної відповіді, що вимірювали у осіб, які раніше не брали участь у подібних експериментах.

Приклад 8 - Отримання модифікованої послідовності Rv3616c

35 Нуклеотидну послідовність H37Rv Rv3616 *Mycobacterium tuberculosis* кодон -оптимізували для експресії у *E. coli* та генетично синтезували. Вставку, отриману після субклонування клонували у pET21b+ (Novagen) з застосуванням сайту рестрикції NdeI на N- кінці та сайту рестрикції XhoI на C - кінці. Для отримання модифікованих конструктів Rv3616c, для видалення специфічних нуклеотидних залишків у Rv3616c, провели серії ПЛР - ампліфікацій з застосуванням різних праймерів. Модифіковані вставки потім клонували у pET26b+ та/або у

40 pET19b (Novagen).

Отриманий клон	Застосовані праймери
pET26_Rv3616Δ136-183His	CAN1001/1004 CAN1003/1002
pET26_Rv3616Δ150-160His	CAN1001/1006 CAN1005/1002
pET26_Rv3616Δ136-154His	CAN1001/1008 CAN1007/1002
pET26_Rv3616Δ166-182His	CAN1001/1010 CAN1009/1002
pET19_Rv3616Δ136-183His	CAN1001/1004 CAN1003/1002
pET19_Rv3616Δ150-160His	CAN1001/1006 CAN1005/1002
pET19_Rv3616Δ136-154His	CAN1001/1008 CAN1007/1002
pET19_Rv3616Δ166-182His	CAN1001/1010 CAN1009/1002
pET26_Rv3616Δ135-139His	CAN1001/1065 CAN1064/1002
pET26_Rv3616Δ142-145His	CAN1001/1067 CAN1066/1002
pET26_Rv3616Δ145-152His	CAN1001/1069 CAN1068/1002
pET26_Rv3616Δ138-145His	CAN1001/1071 CAN1070/1002
pET26_Rv3616Δ149-154His	CAN1001/1073 CAN1072/1002

Праймер	Послідовність праймера	Сайт рестрикції
CAN1001	ggaattccatatgagccgtgcctttattattgatccgac	Nde1
CAN1002	ccg ctc gag cac cac att gcg aac cag aac	Xho1
CAN1003	ctg agc gca gca tt cag gca ccg atg tgg ccg ata tta tta aag	nil
CAN1004	ctttaataatatcgccacatcggtgcctgaaatgctgcgctcag	nil
CAN1005	gttggtgggtggtgctctgacccagctgctgaaactg	nil
CAN1006	cagtttcagcagctgggtcagagcaccacccacaac	nil
CAN1007	ctgagcgcagcatttcaggcgaaaaccctgattaatgcaac	nil
CAN1008	gttgcatataatcagggttttcgctgaaatgctgcgctcag	nil
CAN1009	gcaaccagctgctgaaatccgatgtggccgatattattaaag	nil
CAN1010	ctttaataatatcgccacatcggttcagcagctgggttc	nil
CAN1064	ctgagcgcagcatttcagggtgcaatggcagttgtg	nil
CAN1065	cacaactgccattgcaccctgaaatgctgcgctcag	nil
CAN1066	caatggcagttgtgggtggtgctaaaaccctgattaatgcaac	nil
CAN1067	gttgcatataatcagggttttagcaccaccacaactgccattg	nil
CAN1068	ccgtttgtgccggtgcaggtggtgctctggcatatc	nil
CAN1069	gatatgccagagcaccacctgcaccggcacaaaacgg	nil
CAN1070	gccggtgcaatggcagttgttgtaaaaccctgattaatg	nil
CAN1071	cattaatcagggttttcacaacaactgccattgcaccggc	nil
CAN1072	gcatttcaggcaccgttggtggtgctctggcatatc	nil
CAN1073	gatatgccagagcaccacaaacgggtgcctgaaatgc	nil

Експресія рекомбінантних білків.

- 5 Штам - хазяїн: компетентні E.coli T7 Express (New England Biolabs): посилена похідна від BL21.

Трансформацію E.coli T7 Express плазмідною ДНК проводили з застосуванням стандартних способів з клітинами, обробленими CaCl<sub>2</sub> (Hanahan D. « Plasmid transformation by Simanis. » in Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135).

10

ID рекомбінантної плазміди	Штам - хазяїн	Чашка з агаровим середовищем
pET21_Rv3616His	T7 Express <sup>A</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>B</sup>
pET26_Rv3616Δ136-183His	T7 Express <sup>A</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>C</sup>
pET26_Rv3616Δ150-160His	T7 Express <sup>A</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>C</sup>
pET26_Rv3616Δ136-154His	T7 Express <sup>A</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>C</sup>
pET26_Rv3616Δ166-182His	T7 Express <sup>A</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>C</sup>
pET19_Rv3616Δ136-	T7 Express <sup>A</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100

ID рекомбінантної плазміди	Штам - хазяїн	Чашка з агаровим середовищем
183His		мкг/мл карбеніциліну <sup>В</sup>
pET19_Rv3616Δ150-160His	T7 Express <sup>А</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл карбеніциліну <sup>В</sup>
pET19_Rv3616Δ136-154His	T7 Express <sup>А</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл карбеніциліну <sup>В</sup>
pET19_Rv3616Δ166-182His	T7 Express <sup>А</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл карбеніциліну <sup>В</sup>
pET26_Rv3616Δ135-139His	T7 Express <sup>А</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>С</sup>
pET26_Rv3616Δ142-145His	T7 Express <sup>А</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>С</sup>
pET26_Rv3616Δ145-152His	T7 Express <sup>А</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>С</sup>
pET26_Rv3616Δ138-145His	T7 Express <sup>А</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>С</sup>
pET26_Rv3616Δ149-154His	T7 Express <sup>А</sup>	Середовище Luria-Bertani Agar з фітоном та 100 мкг/мл канаміцину <sup>С</sup>

A: NEB (номер у каталозі: C2566H)

B: Teknova, CA, USA (номер у каталозі L1092)

C: Teknova, CA, USA (номер у каталозі L1096)

5 Конфлюентні чашки з агаровим середовищем, інокульовані трансформованими E. coli T7 Express + плазміда застосували для інокуляції 800 мл середовища LB broth APS+50 мкг/мл антибіотика до отримання значення O.D.<sub>600nm</sub> (оптичної щільності) у діапазоні 0.05-0.1. Культури інкубували при 37°C, 250 об/хв. до отримання значення O.D.<sub>600nm</sub> близько 0.8.

10 Експресію рекомбінантного білка індукували додаванням 1 mM кінцевої концентрації ізопропіл β-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG; EMD Chemicals Inc) до зростаючого культурального середовища. Індукування підтримували протягом 3 годин при 37 °C (або протягом ночі при 16 °C).

15 Бактеріальну культуру центрифугували 15 хв, при 4 °C та 8000g. Осад після центрифугування бактеріальної культури ресуспендували у лізуючому буфері (20 mM Tris, pH 8.0) та у суміші протеазних інгібіторів (повністю без EDTA). Бактерії лізували у системі постійного руйнування клітин (Constant Cell disruption system від Constant Systems). Розчинні (супернатант) та нерозчинні (осад) компоненти відокремили центрифугуванням при 20000g протягом 20 хв при 4 °C.

20 Нерозчинні компоненти (осад після центрифугування) повторно розчинили у 20мМ буфері HEPES, що містив 6М гуанідин HCl, 500 mM NaCl, 10 mM імідазол pH8.0. Потім супернатант завантажили у 5 мл колонку IMAC (BioRad). Після промивань, провели елювання з застосуванням а 20 мМ буфера HEPES (pH 8.0) що містив 6М гуанідин HCl, 500 mM NaCl та 250 mM імідазол.

25 Далі здійснили дві стадії діалізу з застосуванням мембрани 12-14000 MWCO (SpectraPor): перший діаліз у 8М буфері сечовини, що містив 20мМ HEPES, 150мМ NaCl при pH 8.0, а потім другий діаліз у PBS, 4М сечовині, pH7.4.

Потім зразки з неіндукованими та індукованими культурами зібрали для визначення профілю експресії та піддали аналізу SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію).

30 Стислим чином, зразки обробили буфером NUPAGE 4X LDS Sample buffer (Invitrogen), потім обробили 0.05M DTT та нагрівали 10 хв. при 70 °C. Далі зразки центрифугували на максимальній швидкості протягом 2 хвилин та завантажили у 4-12 % Bis-Tris гель NUPAGE Novex (Invitrogen). Гель-електрофорез проводили впродовж 35 хвилин при 200V у 1X буфері NUPAGE MES Running Buffer (Invitrogen) та потім гель пофарбували для візуалізації розділених

35 білків, результати якої показано у Фіг. 17-18. Порівняно з експресією H37Rv дикого типу, констракти Rv3616Δ138-145, Rv3616Δ136-154, Rv3616Δ150-160, Rv3616Δ166-182, Rv3616Δ149-154 та Rv3616Δ135-139 є значно покращеними.

Констракт Rv3616Δ136-183 містив у послідовності помилковий стоп - кодон, тому експресія послідовності не проходила таким чином, як передбачалося.

40 Приклад 9 - додаткове отримання модифікованої послідовності Rv3616с.

Відносно модифікованих констрактів Rv3616с, при застосуванні методології, аналогічній

наведений у Прикладі 8, де замість штаму T7Express застосували штам BL21 (DE3) та для інокуляції 25 мл середовища LB broth APS з антибіотиком застосували чашки з конфлюентним агаровим середовищем, було отримано три перебігу експресії (починаючи з тієї ж трансформованої чашки).

5 Продукти перебігу експресії аналізували за допомогою SDS-PAGE та зразок гелю від одного з перебігів експресії наведено у Фіг.19. Було знайдено, що Rv3616Δ138-145 надає найкращу експресію білка, після нього близько знаходяться результати від Rv3616Δ149-154 та Rv3616Δ136-154 та Rv3616Δ135-139 також показує добрий рівень експресії.

10 Кількісний аналіз смужок відповідно до цільового білка проводили з застосуванням програмного забезпечення ImageQuant TL software. Стислим чином, SDS-PAGE гелі пофарбували з застосуванням барвника InstantBlue (Novexin) та сканували системою UVP BioImaging System з отриманням файлів у форматі TIFF. Потім смужки аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageQuantTL 7.0 software від GE Healthcare. Стосовно неіндукованого Rv3616 білку, застосованого в якості контролю для негативної експресії, жодних випадків реактивності з анти - гістидиновою міткою Ab спостережено не було.

Констракт	% смужки: гель 1	% смужки: гель 2	% смужки: гель 3	Середній % смужки
Неіндукований Rv3616	9	8	7	8
Rv3616	8	8	8	8
Rv3616Δ150-160	8	10	12	10
Rv3616Δ136-154	22	28	29	26
Rv3616Δ166-182	10	10	9	10
Rv3616Δ135-139	15	16	17	16
Rv3616Δ142-145	9	9	8	9
Rv3616Δ145-152	10	9	10	10
Rv3616Δ149-154	26	28	31	28
Rv3616Δ138-145	23	25	21	23

% смужки: вимірювання обсягу смужки, розділене на загальний обсяг всіх смужок у доріжці.

20 Стосовно відсотка смужки, всі білки Rv3616Δ149-154, Rv3616Δ138-145 та Rv3616Δ136-154 показали експресію зі значно вищими рівнями порівняно до природної послідовності або до експресії відомого констракту Rv3616Δ150-160. Rv3616Δ135-139 також показав високий рівень експресії.

Приклад 10 - імуногенність Rv3616Δ138-145 у мишей CB6F1.

Імуногенність Rv3616Δ138-145 оцінювали у мишей CB6F1.

25 Мишей CB6F1 тричі внутрішньом'язово імунізували (у 0, 14 та 28 добу досліджень) з 50 мкл тестової вакцини, що містила ряд доз (8 мкг, 2 мкг та 0.5 мкг) Rv3616Δ138-145 у комбінації з адьювантною системою AS01E (ліпосомальний адьювантний препарат, що містить 3D-MPL та QS21). Препарати також містили сечовину (4М) та аргнін (500 мМ).

План експерименту виглядав наступним чином:

Група	0 доба	14 доба	28 доба
1	8 мкг Rv3616Δ138-145 /AS01E	8 мкг Rv3616Δ138-145 /AS01E	8 мкг Rv3616Δ138-145 /AS01E
2	2 мкг Rv3616Δ138-145 /AS01E	2 мкг Rv3616Δ138-145 /AS01E	2 мкг Rv3616Δ138-145 /AS01E
3	0.5 мкг Rv3616Δ138-145 /AS01E	0.5 мкг Rv3616Δ138-145 /AS01E	0.5 мкг ug Rv3616Δ138-145 /AS01E

30 Загалом, у кожній групі імунізації було застосовано 20 мишей. 10 мишей отримали фізіологічний розчин у якості групи негативного контролю (дані не наведені).

35 Лімфоцити периферичної крові (PBL) зібрали та додали у пул на 21 добу (тобто, через 7 днів після другої імунізації) та на 35 добу (тобто, через 7 днів після третьої імунізації) та антиген - специфічні CD4 & CD8 Т - клітинні відповіді (як визначено CD4 або CD8 Т - клітинами, що продукують IL-2 та/або гамма-інтерферон та/або TNF-альфа) вимірювали за допомогою проточної цитометрії після 6 годин рестимулювання in vitro з пулами 15 - мерних пептидів, що покривають повну антигенну послідовність Rv3616с. Визначення мишачих Т - клітин, що експресують IL-2 та/або гамма-інтерферон та/або TNF-альфа здійснено з застосуванням

короткочасної скерованої антигеном *in vitro* ампліфікації цитокинової експресії.

Стислим чином, розчин PharmLyse (BD-Pharmingen) додали до гепаринізованої мишачої периферичної крові для лізування червоних клітин крові. Отримані PBL (лімфоцити периферичної крові) промили та потім інкубували у присутності пулу 15-мерних пептидів, що перекривалися 11 амінокислотами, що охоплюють всю послідовність інтересуючого антигену та 1 мкг/мл антитіл до CD28 та CD49d (BD-Pharmingen). Кожний 15- мерний пептид застосували з кінцевою концентрацією у 1 мкг/мл. Контрольні лунки середовища також стимулювали з антитілами до CD28 та CD49d.

З'єднання брефелдин-А (BD-Pharmingen), що блокує цитокинову секрецію додали через 2 год. після початку культивування при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, потім клітини ще додатково інкубували 4 год. при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, після чого їх зберігали протягом ночі при +4 °C.

Потім клітини зібрали та пофарбували зі сполученими з Pacific Blue анти - CD4

(клон RM4-5, BD-Pharmingen) та зі сполученими з перидинін- хлорофіл А протеїном (PerCp) ціанін 5.5 (Cy5.5) анти - CD8 альфа (клон 53-6.7, BD-Pharmingen) антитілами.

Потім клітини, зафіксували, пермеабілізували (набір Cytofix-cytoperm kit, BD-Pharmingen) та пофарбували зі сполученими з алофікоціаніном анти- IFN- гамма антитілами (клон XMG1.2, BD-Pharmingen), зі сполученими з флуоресцеїн-ізотіоціанатом (FITC) анти IL-2 антитілами (клон JES 6-5H4, BD-Pharmingen) та зі сполученими з фікоеритрином (PE) анти - TNF альфа антитілами (клон MP6-XT22, BD-Pharmingen). Після кінцевих промивань, забарвлені клітини аналізували на проточному цитометрі LSRII (Becton-Dickinson). Мінімум 10,000 клітин отримано у вигляді CD8 + субпопуляція.

Деякі клітини також культивували протягом 6 годин *in vitro* у культуральному середовищі (нестимульованому) в якості негативних контролів. Антиген - специфічні відповіді обчислювали відніманням середньої цитокинової відповіді, що продукували нестимульовані клітини від середньої цитокинової відповіді, що продукували пептид - стимульовані клітини.

Дані у кожен момент часу та для кожної групи збирали з 4 пулів по 5 мишей у кожному та презентували у вигляді відсотку % CD4 або CD8 Т – клітин, що продукували IL-2 та/або гамма-інтерферон та/або TNF-альфа. Кожен індивідуальний пул мишей графічно зображено (замкнуті ромби) разом з медіанними значеннями груп (лінія).

Результати наведені у Фіг. 20-25.

Фіг. 20 показує, що у обидвох моментах часу (7dPII & 7dPIII), у мишах, імунізованих будь-якою дозою Rv3616 Δ138-145/AS01E, визначені Rv3616с- специфічні CD4 Т - клітинні відповіді. Рівні Rv3616с- специфічних Т - клітинних відповідей були більш вищими у момент часу 7dPIII, порівняно з моментом часу 7dPII. Цитокинові профілі CD4 Т - клітинної відповіді з PBL, стимульованих пептидним пулом Rv3616с (середовище видалено) наведені у Фіг. 21 (7dPII) та Фіг. 22 (7dPIII).

Фіг. 23 показує, що у обидвох моментах часу (7dPII & 7dPIII), у мишах, імунізованих будь-якою дозою Rv3616 Δ138-145/AS01E, визначені Rv3616с- специфічні CD8 Т - клітинні відповіді. Рівні Rv3616с- специфічних Т - клітинних відповідей були більш вищими у момент часу 7dPII, порівняно з моментом часу 7dPIII. Цитокинові профілі CD8 Т - клітинної відповіді з PBL, стимульованих пептидним пулом Rv3616с (середовище видалено) наведені у Фіг. 24 (7dPII) та Фіг. 25 (7dPIII).

На закінчення можна відмітити, що антиген Rv3616с здатен викликати імунну відповідь у обох мишей, CB6F1 та C57BL/6. Крім того, профіль продукування цитокину вказує на те, що великий відсоток антиген- специфічних Т- клітин експресує безліч асоційованих з Th1 цитокинів (тобто, виявлено поліфункціональну Т- клітинну відповідь). Важливо те, що CD4 та CD8 антиген - специфічні Т- клітини є у наявності після імунізації, а CD8 клітини можуть бути особливо важливими у сценарії латентного туберкульозу. Релевантність Rv3616с до інфекції людини підтверджено високим рівнем розпізнавання у латентно інфікованих осіб з Південної Африки та відсутності відповіді у здорових суб'єктів, що раніше не брали участь у подібних експериментах. Тому, Rv3616с може, як очікується, мати істотну цінність у запобіганні, лікуванні та діагностиці туберкульозної інфекції (головним чином, латентної туберкульозної інфекції).

Отримана кількість модифікованих білків Rv3616с ясно демонструє рівень експресії, що дорівнює або є кращим, ніж у відповідній послідовності H37Rv дикого типу або послідовності Rv3616Δ150-160, що досліджували раніше. Імуногенність Rv3616 Δ138-145/AS01E підтверджено у мишей CB6F1.

Констракти демонструють гарні характеристики експресії в той час, як підтримування імуногенності послідовності дикого типу є ключем до отримання комерційно життєздатних вакцинних продуктів. Нові модифіковані білки Rv3616с можуть являти велику цінність для комерційного отримання композицій Rv3616с, як то вакцин.

Хоча вищезазначений винахід описано в деяких деталях з ілюстративною метою та у якості прикладу для ясності розуміння, фахівцям буде очевидним, у світлі вчення цього винаходу, що деякі змінення та модифікації можуть бути застосовані без відходу від духу та обсягу доданої Формули Винаходу.

5       Всі посилання, згадані в цій заявці, в тому числі, посилання на патенти та патентні заявки, включені тут як посилання в максимально можливій мірі, як якщо б було б спеціально та індивідуально вказано, що кожна індивідуальна публікація або патентна заявка тут включена шляхом посилання.

10       У цій заявці та у доданій Формулі Винаходу, якщо контекстом не вимагається іншого, слово "містить" та варіації, як то "вміщує" та "що містить", як зрозуміло, передбачає включення постійного цілого числа, етапу, групи цілих чисел або групи етапів, але без виключення будь-якого іншого числа, етапу, групи цілих чисел або групи етапів.

Перелік послідовностей

<110> ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А.  
ГЛАКСО ГРУП ЛІМІТЕД  
Блейс Норманд  
Гелінас Анн-Марі  
Браун Джеймс  
Мюрфі Денніс  
Меттенс Паскаль

<120> модифіковані антигени

<130> VB64094PCT

<150> US61/298,710

<151> 2010-01-27

<160> 180

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 392

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> змішаний характер

<223> штам H37Rv

<400> 1

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
100 105 110

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

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

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

<210> 2  
 <211> 1179  
 <212> ДНК



<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> змішаний характер

<223> штам H37Rv

<400> 2

```

atgagcagag cgttcatcat cgatccaacg atcagtgcc ttgacggctt gtacgacctt      60
ctggggattg gaatacccaa ccaaggggggt atcctttact cctcactaga gtacttcgaa      120
aaagccctgg aggagctggc agcagcggtt ccgggtgatg gctggtagg ttcggccgcg      180
gacaaatacg ccggcaaaaa ccgcaaccac gtgaattttt tccaggaact ggcagacctc      240
gatcgtcagc tcatcagcct gatccacgac caggccaacg cgggccagac gacccgagac      300
atcctggagg gcgccaagaa aggtctcgag ttcgtgcgcc cgggtggctgt ggacctgacc      360
tacatcccgg tcgtcgggca cgccctatcg gccgccttcc aggcgccgtt ttgcgcgggc      420
gcgatggccg tagtgggagg cgcgcttgcc tacttggtcg tgaaaacgct gatcaacgcg      480
actcaactcc tcaaattgct tgccaaattg gcggagtggg tcgcggccgc cattgaggac      540
atcatttcgg atgtggcgga catcatcaag ggcaccctcg gagaagtgtg ggagttcatc      600
acaaacgcgc tcaacggcct gaaagagctt tgggacaagc tcacgggggtg ggtgaccgga      660
ctgttctctc gagggtggtc gaacctggag tccttctttg cgggcgtccc cggcttgacc      720
ggcgcgacca gcggcttggt gcaagtgact ggcttggtcg gtgcggccgg tctgtccgca      780
tcgtcgggct tggctcacgc ggatagcctg gcgagctcag ccagcttgcc cgccctggcc      840
ggcattgggg gcgggtccgg ttttgggggc ttgccgagcc tggctcaggt ccatgccgcc      900
tcaactcggc aggcgctacg gccccgagct gatggcccgg tcggcgccgc tgccgagcag      960
gtcggcgggc agtcgcagct ggtctccgcg cagggttccc aaggatatgg cggaccgta      1020
ggcatgggcg gcatgcaccc ctcttcgggg gcgtcgaaag ggacgacgac gaagaagtac      1080
tcggaaggcg cggcgggcgg cactgaagac gccgagcgcg cgccagtcga agctgacgcg      1140
ggcgggtggc aaaaggtgct ggtacgaaac gtcgtctaa      1179

```

<210> 3

<211> 392

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> змішаний характер

<223> штам CDC1551

<400> 3

```

Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly
1           5           10           15
Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu
20           25           30

```

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

Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln  
305 310 315 320

Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met  
325 330 335

Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser  
340 345 350

Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr  
355 360 365

Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln  
370 375 380

Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val  
385 390

<210> 4  
<211> 392  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>  
<221> змішаний характер  
<223> штам F11

<400> 4

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
100 105 110

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

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

<210> 5  
 <211> 392  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>  
 <221> змішаний характер  
 <223> штам Haarlem A

<400> 5

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
 20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
 35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
 50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
 85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
 100 105 110

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

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

Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala  
 145 150 155 160

Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala  
 165 170 175

Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Ile  
 180 185 190

Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys  
 195 200 205

Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg  
 210 215 220

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

Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala  
245 250 255

Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser  
260 265 270

Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe  
275 280 285

Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln  
290 295 300

Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln  
305 310 315 320

Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met  
325 330 335

Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser  
340 345 350

Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr  
355 360 365

Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln  
370 375 380

Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val  
385 390

<210> 6  
<211> 392  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>  
<221> змішаний характер  
<223> штам C

<400> 6

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45



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

Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met  
325 330 335

Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser  
340 345 350

Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr  
355 360 365

Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln  
370 375 380

Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val  
385 390

<210> 7  
<211> 392  
<212> білок  
<213> Mycobacterium bovis

<220>  
<221> змішаний характер  
<223> штам BCG

<400> 7

Met Ser Arg Val Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly  
1 5 10 15

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
100 105 110

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

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



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

<210> 8  
 <211> 110  
 <212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> зрілий пептид

<222> (29)..(110)

<400> 8

Met Arg Leu Ser Leu Thr Ala Leu Ser Ala Gly Val Gly Ala Val Ala  
-25 -20 -15

Met Ser Leu Thr Val Gly Ala Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Val Asp  
-10 -5 -1 1

Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val Val Ala Ala Leu  
5 10 15 20

Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala Gln Phe Asn Ala Ser Pro Val  
25 30 35

Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu Ala Ala Pro Pro Pro Gln Arg  
40 45 50

Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala Val Pro Gly Ala Ala Gln Tyr  
55 60 65

Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly Ser Cys Asn Asn Tyr  
70 75 80

<210> 9

<211> 97

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu Val Ala Ser Gln Ser  
1 5 10 15

Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His Thr Ile Gly Gln Ala  
20 25 30

Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His Gln Gly Glu Ser Ser  
35 40 45

Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val Ala Ala Ala Ala Lys  
50 55 60

Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn Leu Gly Glu Ala Ala  
65 70 75 80

Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala Ser Thr Tyr Thr Gly  
85 90 95

Phe

<210> 10  
 <211> 94  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 10

Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met  
 1 5 10 15

Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val  
 20 25 30

Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Val  
 35 40 45

Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile  
 50 55 60

Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn  
 65 70 75 80

Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala  
 85 90

<210> 11  
 <211> 132  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 11

Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe  
 1 5 10 15

Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser  
 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly  
 35 40 45

Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val  
 50 55 60

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

Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala  
 85 90 95

Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp  
 100 105 110

Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu  
 115 120 125

Gly Pro Pro Ala  
 130

<210> 12  
 <211> 195  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 12

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
 1 5 10 15

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val  
 20 25 30

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr  
 35 40 45

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val  
 50 55 60

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

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala  
 85 90 95

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly  
 100 105 110

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly  
 115 120 125

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu  
 130 135 140

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

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser  
 165 170 175

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr  
 180 185 190

Ala Ala Ser  
 195

<210> 13  
 <211> 391  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr  
 165 170 175

Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser  
 180 185 190

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

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

Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn  
 225 230 235 240

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

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

Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala  
275 280 285

Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly  
290 295 300

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

Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg  
325 330 335

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

Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly  
355 360 365

Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met  
370 375 380

Pro His Ser Pro Ala Ala Gly  
385 390

<210> 14  
<211> 423  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 14

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

Ser Gly Pro Gly Pro Glu Ser Met Leu Ala Ala Ala Ala Ala Trp Asp  
20 25 30

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

Val Ser Thr Leu Ile Val Glu Pro Trp Met Gly Pro Ala Ala Ala Ala  
50 55 60

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

Ala Leu Ala Lys Glu Thr Ala Thr Gln Ala Arg Ala Ala Ala Glu Ala



85					90					95				
Phe	Gly	Thr	Ala 100	Phe	Ala	Met	Thr	Val 105	Pro	Pro	Ser	Leu	Val 110	Ala Ala
Asn	Arg	Ser 115	Arg	Leu	Met	Ser	Leu 120	Val	Ala	Ala	Asn	Ile 125	Leu	Gly Gln
Asn	Ser 130	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala 135	Thr	Gln	Ala	Glu	Tyr 140	Ala	Glu	Met Trp
Ala 145	Gln	Asp	Ala	Ala	Val 150	Met	Tyr	Ser	Tyr	Glu 155	Gly	Ala	Ser	Ala Ala
Ala	Ser	Ala	Leu	Pro 165	Pro	Phe	Thr	Pro	Pro 170	Val	Gln	Gly	Thr	Gly Pro
Ala	Gly	Pro	Ala 180	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala 185	Thr	Gln	Ala	Ala	Gly 190	Ala Gly
Ala	Val	Ala 195	Asp	Ala	Gln	Ala	Thr 200	Leu	Ala	Gln	Leu	Pro 205	Pro	Gly Ile
Leu	Ser 210	Asp	Ile	Leu	Ser	Ala 215	Leu	Ala	Ala	Asn	Ala 220	Asp	Pro	Leu Thr
Ser 225	Gly	Leu	Leu	Gly	Ile 230	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn 235	Pro	Gln	Val	Gly Ser
Ala	Gln	Pro	Ile	Val 245	Ile	Pro	Thr	Pro	Ile 250	Gly	Glu	Leu	Asp	Val Ile
Ala	Leu	Tyr	Ile 260	Ala	Ser	Ile	Ala	Thr 265	Gly	Ser	Ile	Ala	Leu 270	Ala Ile
Thr	Asn	Thr 275	Ala	Arg	Pro	Trp	His 280	Ile	Gly	Leu	Tyr	Gly 285	Asn	Ala Gly
Gly	Leu 290	Gly	Pro	Thr	Gln	Gly 295	His	Pro	Leu	Ser	Ser 300	Ala	Thr	Asp Glu
Pro 305	Glu	Pro	His	Trp	Gly 310	Pro	Phe	Gly	Gly	Ala 315	Ala	Pro	Val	Ser Ala
Gly	Val	Gly	His	Ala 325	Ala	Leu	Val	Gly	Ala 330	Leu	Ser	Val	Pro	His Ser
Trp	Thr	Thr	Ala 340	Ala	Pro	Glu	Ile	Gln 345	Leu	Ala	Val	Gln	Ala 350	Thr Pro
Thr	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Ala	Asp	Pro	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly Met

355                                      360                                      365  
 Pro Ala Gly Leu Leu Ser Gly Met Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg  
       370                                      375                                      380  
 Gly Thr Thr Gly Gly Gly Gly Thr Arg Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly  
       385                                      390                                      395                                      400  
 Gln Glu Asp Gly Arg Lys Pro Pro Val Val Val Ile Arg Glu Gln Pro  
    405                                      410                                      415  
 Pro Pro Gly Asn Pro Pro Arg  
    420

<210> 15  
 <211> 95  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>  
 <221> метіоніновий ініціатор  
 <222> (1)..(1)

<220>  
 <221> зрілий пептид  
 <222> (2)..(95)

<400> 15

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

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

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

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

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

Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala  
       80                                      85                                      90

<210> 16  
 <211> 338  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>  
 <221> зрілий пептид  
 <222> (43)..(338)



<400> 16

Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg  
-40 -35 -30

Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val  
-25 -20 -15

Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly  
-10 -5 -1 1 5

Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp  
10 15 20

Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr  
25 30 35

Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile  
40 45 50

Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val  
55 60 65 70

Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro  
75 80 85

Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu  
90 95 100

Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro  
105 110 115

Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu  
120 125 130

Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met  
135 140 145 150

Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly  
155 160 165

Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly  
170 175 180

Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val  
185 190 195

Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn  
200 205 210

Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu

215 220 225 230

Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn  
235 240 245

Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr  
250 255 260

His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp  
265 270 275

Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln  
280 285 290

Gly Ala  
295

```
<210> 17
<211> 325
<212> білок
<213> Mycobacterium tuberculosis
```

<220>  
<221> зрілий пептид  
<222> (41)..(325)

<400> 17

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met  
-40 -35 -30 -25

Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala  
-20 -15 -10

Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val  
-5 -1 1 5

Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val  
10 15 20

Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp  
25 30 35 40

Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro  
45 50 55

Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val  
60 65 70

Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Ser Pro Ala Cys Gly  
75 80 85

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

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

<210> 18  
 <211> 144  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>  
 <221> метіоніновий ініціатор  
 <222> (1)..(1)

<220>  
 <221> зрілий пептид  
 <222> (2)..(144)

<400> 18

Met Ala Thr Thr Leu Pro Val Gln Arg His Pro Arg Ser Leu Phe Pro

```

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

<210>  19
<211>  228
<212>  білок
<213>  Mycobacterium tuberculosis

<220>
<221>  зрілий пептид
<222>  (24)..(228)

<400>  19
Met Arg Ile Lys Ile Phe Met Leu Val Thr Ala Val Val Leu Leu Cys
      -20      -15      -10

Cys Ser Gly Val Ala Thr Ala Ala Pro Lys Thr Tyr Cys Glu Glu Leu
      -5      -1      1      5

Lys Gly Thr Asp Thr Gly Gln Ala Cys Gln Ile Gln Met Ser Asp Pro
      10      15      20      25

Ala Tyr Asn Ile Asn Ile Ser Leu Pro Ser Tyr Tyr Pro Asp Gln Lys
      30      35      40

Ser Leu Glu Asn Tyr Ile Ala Gln Thr Arg Asp Lys Phe Leu Ser Ala
      45      50      55

Ala Thr Ser Ser Thr Pro Arg Glu Ala Pro Tyr Glu Leu Asn Ile Thr

```

60 65 70  
 Ser Ala Thr Tyr Gln Ser Ala Ile Pro Pro Arg Gly Thr Gln Ala Val  
 75 80 85  
 Val Leu Lys Val Tyr Gln Asn Ala Gly Gly Thr His Pro Thr Thr Thr  
 90 95 100 105  
 Tyr Lys Ala Phe Asp Trp Asp Gln Ala Tyr Arg Lys Pro Ile Thr Tyr  
 110 115 120  
 Asp Thr Leu Trp Gln Ala Asp Thr Asp Pro Leu Pro Val Val Phe Pro  
 125 130 135  
 Ile Val Gln Gly Glu Leu Ser Lys Gln Thr Gly Gln Gln Val Ser Ile  
 140 145 150  
 Ala Pro Asn Ala Gly Leu Asp Pro Val Asn Tyr Gln Asn Phe Ala Val  
 155 160 165  
 Thr Asn Asp Gly Val Ile Phe Phe Phe Asn Pro Gly Glu Leu Leu Pro  
 170 175 180 185  
 Glu Ala Ala Gly Pro Thr Gln Val Leu Val Pro Arg Ser Ala Ile Asp  
 190 195 200  
 Ser Met Leu Ala  
 205

<210> 20  
 <211> 355  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>  
 <221> зрілий пептид  
 <222> (33)..(355)

<400> 20

Met Ser Asn Ser Arg Arg Arg Ser Leu Arg Trp Ser Trp Leu Leu Ser  
 -30 -25 -20  
 Val Leu Ala Ala Val Gly Leu Gly Leu Ala Thr Ala Pro Ala Gln Ala  
 -15 -10 -5 -1  
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val  
 20 25 30  
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr

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



305 310 315 320

Pro Pro Ala

<210> 21  
 <211> 323  
 <212> білок  
 <213> синтетична послідовність

<220>  
 <223> Ser/Ala мутант зрілої послідовності Mtb32A

<400> 21

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
 1 5 10 15

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val  
 20 25 30

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr  
 35 40 45

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val  
 50 55 60

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

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala  
 85 90 95

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly  
 100 105 110

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly  
 115 120 125

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu  
 130 135 140

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

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala  
 165 170 175

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr  
 180 185 190

Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala  
 195 200 205

Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly  
 210 215 220

Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu  
 225 230 235 240

Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val  
 245 250 255

Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile  
 260 265 270

Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp  
 275 280 285

Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln  
 290 295 300

Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly  
 305 310 315 320

Pro Pro Ala

<210> 22  
 <211> 96  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 22

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> 23  
 <211> 723  
 <212> білок  
 <213> синтетична послідовність



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Mtb72f

&lt;400&gt; 23

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu  
35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg  
50 55 60

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

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met  
85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr  
100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala  
115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro  
130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu  
145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser  
165 170 175

Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser  
180 185 190

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr  
195 200 205

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala  
210 215 220

Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu  
245 250 255

Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn  
 260 265 270  
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe  
 275 280 285  
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe  
 290 295 300  
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met  
 325 330 335  
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly  
 340 345 350  
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro  
 355 360 365  
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met  
 370 375 380  
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met  
 385 390 395 400  
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala  
 405 410 415  
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly  
 420 425 430  
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala  
 435 440 445  
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln  
 450 455 460  
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly  
 485 490 495  
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val  
 500 505 510  
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile  
 515 520 525

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
530 535 540

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val  
545 550 555 560

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr  
565 570 575

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val  
580 585 590

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln  
595 600 605

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala  
610 615 620

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly  
625 630 635 640

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly  
645 650 655

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu  
660 665 670

Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr  
675 680 685

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser  
690 695 700

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr  
705 710 715 720

Ala Ala Ser

<210> 24  
<211> 723  
<212> білок  
<213> синтетична послідовність

<220>  
<223> M72

<400> 24

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly  
1 5 10 15

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

Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe  
 290 295 300  
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met  
 325 330 335  
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly  
 340 345 350  
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro  
 355 360 365  
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met  
 370 375 380  
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met  
 385 390 395 400  
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala  
 405 410 415  
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly  
 420 425 430  
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala  
 435 440 445  
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln  
 450 455 460  
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly  
 485 490 495  
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val  
 500 505 510  
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile  
 515 520 525  
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
 530 535 540  
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val  
 545 550 555 560

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr  
 565 570 575  
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val  
 580 585 590  
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln  
 595 600 605  
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala  
 610 615 620  
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly  
 625 630 635 640  
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly  
 645 650 655  
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu  
 660 665 670  
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr  
 675 680 685  
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala  
 690 695 700  
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr  
 705 710 715 720  
 Ala Ala Ser

<210> 25  
 <211> 702  
 <212> білок  
 <213> синтетична послідовність

<220>  
 <223> Mtb71f

<400> 25

Asp Pro Val Asp Ala Val Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val  
 1 5 10 15  
 Val Ala Ala Leu Asn Ala Thr Asp Pro Gly Ala Ala Ala Gln Phe Asn  
 20 25 30  
 Ala Ser Pro Val Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Asn Phe Leu Ala Ala Pro  
 35 40 45  
 Pro Pro Gln Arg Ala Ala Met Ala Ala Gln Leu Gln Ala Val Pro Gly  
 50 55 60



Ala Ala Gln Tyr Ile Gly Leu Val Glu Ser Val Ala Gly Ser Cys Asn  
65 70 75 80

Asn Tyr Glu Leu Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala  
85 90 95

His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu His  
100 105 110

Gln Ala Ile Val Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly  
115 120 125

Ala Gly Ser Val Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn  
130 135 140

Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln  
145 150 155 160

Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser  
165 170 175

Trp Ala Thr Ser Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu Val  
180 185 190

Ala Ser Gln Ser Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His Thr  
195 200 205

Ile Gly Gln Ala Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His Gln  
210 215 220

Gly Glu Ser Ser Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val Ala  
225 230 235 240

Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn Leu  
245 250 255

Gly Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala Ser  
260 265 270

Thr Tyr Thr Gly Phe Asp Ile Met Asp Phe Gly Leu Leu Pro Pro Glu  
275 280 285

Val Asn Ser Ser Arg Met Tyr Ser Gly Pro Gly Pro Glu Ser Met Leu  
290 295 300

Ala Ala Ala Ala Ala Trp Asp Gly Val Ala Ala Glu Leu Thr Ser Ala  
305 310 315 320

Ala Val Ser Tyr Gly Ser Val Val Ser Thr Leu Ile Val Glu Pro Trp  
325 330 335

Met Gly Pro Ala Ala Ala Ala Met Ala Ala Ala Ala Thr Pro Tyr Val  
 340 345 350  
 Gly Trp Leu Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Lys Glu Thr Ala Thr Gln  
 355 360 365  
 Ala Arg Ala Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Ala Phe Ala Met Thr Val  
 370 375 380  
 Pro Pro Ser Leu Val Ala Ala Asn Arg Ser Arg Leu Met Ser Leu Val  
 385 390 395 400  
 Ala Ala Asn Ile Leu Gly Gln Asn Ser Ala Ala Ile Ala Ala Thr Gln  
 405 410 415  
 Ala Glu Tyr Ala Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Val Met Tyr Ser  
 420 425 430  
 Tyr Glu Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Leu Pro Pro Phe Thr Pro  
 435 440 445  
 Pro Val Gln Gly Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 450 455 460  
 Thr Gln Ala Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Asp Ala Gln Ala Thr Leu  
 465 470 475 480  
 Ala Gln Leu Pro Pro Gly Ile Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala  
 485 490 495  
 Ala Asn Ala Asp Pro Leu Thr Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr  
 500 505 510  
 Leu Asn Pro Gln Val Gly Ser Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro  
 515 520 525  
 Ile Gly Glu Leu Asp Val Ile Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr  
 530 535 540  
 Gly Ser Ile Ala Leu Ala Ile Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile  
 545 550 555 560  
 Gly Leu Tyr Gly Asn Ala Gly Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro  
 565 570 575  
 Leu Ser Ser Ala Thr Asp Glu Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly  
 580 585 590  
 Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val Gly  
 595 600 605



Ala Leu Ser Val Pro His Ser Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu Ile Gln  
610 615 620

Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro Thr Phe Ser Ser Ser Ala Gly Ala Asp  
625 630 635 640

Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met Pro Ala Gly Leu Leu Ser Gly Met Ala  
645 650 655

Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Gly Thr Thr Gly Gly Gly Gly Thr Arg  
660 665 670

Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly Gln Glu Asp Gly Arg Lys Pro Pro Val  
675 680 685

Val Val Ile Arg Glu Gln Pro Pro Pro Gly Asn Pro Pro Arg  
690 695 700

<210> 26  
<211> 920  
<212> білок  
<213> синтетична послідовність

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

<400> 26

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu  
35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg  
50 55 60

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

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met  
85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr  
100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala  
115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro  
 130 135 140  
 Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser  
 165 170 175  
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser  
 180 185 190  
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr  
 195 200 205  
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala  
 210 215 220  
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu  
 245 250 255  
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn  
 260 265 270  
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe  
 275 280 285  
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe  
 290 295 300  
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met  
 325 330 335  
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly  
 340 345 350  
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro  
 355 360 365  
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met  
 370 375 380  
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met  
 385 390 395 400

Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala  
 405 410 415  
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly  
 420 425 430  
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala  
 435 440 445  
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln  
 450 455 460  
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly  
 485 490 495  
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val  
 500 505 510  
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile  
 515 520 525  
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
 530 535 540  
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val  
 545 550 555  
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr  
 565 570 575  
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val  
 580 585 590  
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln  
 595 600 605  
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala  
 610 615 620  
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly  
 625 630 635 640  
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly  
 645 650 655  
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu  
 660 665 670

Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr  
 675 680 685  
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala  
 690 695 700  
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr  
 705 710 715 720  
 Ala Ala Ser Ser Thr Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp  
 725 730 735  
 Ala His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Ala Ser Leu Glu Ala Glu  
 740 745 750  
 His Gln Ala Ile Val Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly  
 755 760 765  
 Gly Ala Gly Ser Val Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg  
 770 775 780  
 Asn Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val  
 785 790 795 800  
 Gln Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser  
 805 810 815  
 Ser Trp Ala Thr Ser Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu  
 820 825 830  
 Val Ala Ser Gln Ser Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His  
 835 840 845  
 Thr Ile Gly Gln Ala Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His  
 850 855 860  
 Gln Gly Glu Ser Ser Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val  
 865 870 875 880  
 Ala Ala Ala Ala Lys Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn  
 885 890 895  
 Leu Gly Glu Ala Ala Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ala  
 900 905 910  
 Ser Thr Tyr Thr Gly Phe Pro Trp  
 915 920  
 <210> 27  
 <211> 1010  
 <212> білок  
 <213> синтетична послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; M103

&lt;400&gt; 27

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu  
35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg  
50 55 60

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

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met  
85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr  
100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala  
115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro  
130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu  
145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser  
165 170 175

Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser  
180 185 190

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr  
195 200 205

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala  
210 215 220

Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu  
245 250 255

Ile Ala Thr Asn<sub>260</sub> Leu Leu Gly Gln Asn<sub>265</sub> Thr Pro Ala Ile Ala<sub>270</sub> Val Asn  
 Glu Ala Glu<sub>275</sub> Tyr Gly Glu Met Trp<sub>280</sub> Ala Gln Asp Ala Ala<sub>285</sub> Ala Met Phe  
 Gly Tyr<sub>290</sub> Ala Ala Ala Thr Ala<sub>295</sub> Thr Ala Thr Ala Thr<sub>300</sub> Leu Leu Pro Phe  
 Glu<sub>305</sub> Glu Ala Pro Glu<sub>310</sub> Met Thr Ser Ala Gly Gly<sub>315</sub> Leu Leu Glu Gln Ala<sub>320</sub>  
 Ala Ala Val Glu<sub>325</sub> Glu Ala Ser Asp Thr Ala<sub>330</sub> Ala Ala Asn Gln Leu<sub>335</sub> Met  
 Asn Asn Val Pro<sub>340</sub> Gln Ala Leu Gln Gln<sub>345</sub> Leu Ala Gln Pro Thr<sub>350</sub> Gln Gly  
 Thr Thr Pro<sub>355</sub> Ser Ser Lys Leu Gly<sub>360</sub> Gly Leu Trp Lys Thr<sub>365</sub> Val Ser Pro  
 His Arg<sub>370</sub> Ser Pro Ile Ser Asn<sub>375</sub> Met Val Ser Met Ala<sub>380</sub> Asn Asn His Met  
 Ser Met Thr Asn Ser Gly<sub>390</sub> Val Ser Met Thr Asn<sub>395</sub> Thr Leu Ser Ser Met<sub>400</sub>  
 Leu Lys Gly Phe Ala<sub>405</sub> Pro Ala Ala Ala Ala<sub>410</sub> Gln Ala Val Gln Thr<sub>415</sub> Ala  
 Ala Gln Asn Gly<sub>420</sub> Val Arg Ala Met Ser<sub>425</sub> Ser Leu Gly Ser Ser<sub>430</sub> Leu Gly  
 Ser Ser Gly<sub>435</sub> Leu Gly Gly Gly Val<sub>440</sub> Ala Ala Asn Leu Gly<sub>445</sub> Arg Ala Ala  
 Ser Val<sub>450</sub> Gly Ser Leu Ser Val<sub>455</sub> Pro Gln Ala Trp Ala<sub>460</sub> Ala Ala Asn Gln  
 Ala Val Thr Pro Ala Ala<sub>470</sub> Arg Ala Leu Pro Leu<sub>475</sub> Thr Ser Leu Thr Ser<sub>480</sub>  
 Ala Ala Glu Arg Gly<sub>485</sub> Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val<sub>495</sub> Gly  
 Gln met Gly Ala<sub>500</sub> Arg Ala Gly Gly Gly<sub>505</sub> Leu Ser Gly Val Leu<sub>510</sub> Arg Val  
 Pro Pro Arg<sub>515</sub> Pro Tyr Val Met Pro<sub>520</sub> His Ser Pro Ala Ala<sub>525</sub> Gly Asp Ile



Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
530 535 540

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val  
545 550 555 560

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr  
565 570 575

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val  
580 585 590

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln  
595 600 605

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala  
610 615 620

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly  
625 630 635 640

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly  
645 650 655

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu  
660 665 670

Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr  
675 680 685

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala  
690 695 700

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr  
705 710 715 720

Ala Ala Ser Ser Gly Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu  
725 730 735

Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln  
740 745 750

Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg  
755 760 765

Ala Gln Asp Asp Tyr Asn Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu  
770 775 780

Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val Met Pro Val Gly Gly Gln  
785 790 795 800

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

<210> 28  
 <211> 1148  
 <212> білок  
 <213> синтетична послідовність  
 <220>  
 <223> M114  
 <400> 28



Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly  
1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg  
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu  
35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg  
50 55 60

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

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met  
85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr  
100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala  
115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro  
130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu  
145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser  
165 170 175

Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser  
180 185 190

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr  
195 200 205

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala  
210 215 220

Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr  
225 230 235 240

Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu  
245 250 255

Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn  
260 265 270

Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe  
 275 280 285

Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe  
 290 295 300

Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala  
 305 310 315 320

Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met  
 325 330 335

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly  
 340 345 350

Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro  
 355 360 365

His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met  
 370 375 380

Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met  
 385 390 395 400

Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala  
 405 410 415

Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly  
 420 425 430

Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala  
 435 440 445

Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln  
 450 455 460

Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser  
 465 470 475 480

Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly  
 485 490 495

Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val  
 500 505 510

Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile  
 515 520 525

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu  
 530 535 540

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

Ala Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Ala Phe Ala Met Thr Val Pro Pro  
820 825 830

Ser Leu Val Ala Ala Asn Arg Ser Arg Leu Met Ser Leu Val Ala Ala  
835 840 845

Asn Ile Leu Gly Gln Asn Ser Ala Ala Ile Ala Ala Thr Gln Ala Glu  
850 855 860

Tyr Ala Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Val Met Tyr Ser Tyr Glu  
865 870 875 880

Gly Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Leu Pro Pro Phe Thr Pro Pro Val  
885 890 895

Gln Gly Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gln  
900 905 910

Ala Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Asp Ala Gln Ala Thr Leu Ala Gln  
915 920 925

Leu Pro Pro Gly Ile Leu Ser Asp Ile Leu Ser Ala Leu Ala Ala Asn  
930 935 940

Ala Asp Pro Leu Thr Ser Gly Leu Leu Gly Ile Ala Ser Thr Leu Asn  
945 950 955 960

Pro Gln Val Gly Ser Ala Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Pro Ile Gly  
965 970 975

Glu Leu Asp Val Ile Ala Leu Tyr Ile Ala Ser Ile Ala Thr Gly Ser  
980 985 990

Ile Ala Leu Ala Ile Thr Asn Thr Ala Arg Pro Trp His Ile Gly Leu  
995 1000 1005

Tyr Gly Asn Ala Gly Gly Leu Gly Pro Thr Gln Gly His Pro Leu  
1010 1015 1020

Ser Ser Ala Thr Asp Glu Pro Glu Pro His Trp Gly Pro Phe Gly  
1025 1030 1035

Gly Ala Ala Pro Val Ser Ala Gly Val Gly His Ala Ala Leu Val  
1040 1045 1050

Gly Ala Leu Ser Val Pro His Ser Trp Thr Thr Ala Ala Pro Glu  
1055 1060 1065

Ile Gln Leu Ala Val Gln Ala Thr Pro Thr Phe Ser Ser Ser Ala  
1070 1075 1080

Gly Ala Asp Pro Thr Ala Leu Asn Gly Met Pro Ala Gly Leu Leu  
1085 1090 1095

Ser Gly Met Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Gly Thr Thr Gly  
1100 1105 1110

Gly Gly Gly Thr Arg Ser Gly Thr Ser Thr Asp Gly Gln Glu Asp  
1115 1120 1125

Gly Arg Lys Pro Pro Val Val Val Ile Arg Glu Gln Pro Pro Pro  
1130 1135 1140

Gly Asn Pro Pro Arg  
1145

<210> 29  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 29

Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala  
1 5

<210> 30  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 30

Ile Leu Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe  
1 5

<210> 31  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 31

Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu  
1 5

<210> 32  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 32

Tyr Ala Gly Lys Asn Arg Asn His Val  
1 5

<210> 33  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33

Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val  
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 34

Phe Val Arg Pro Val Ala Val Asp Leu  
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 35

Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His  
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 36

Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala Leu  
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 37

Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn  
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 38

Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala  
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 39

Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln  
1 5

<210> 40  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 40

Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu  
1 5

<210> 41  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 41

Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala Asp Ile  
1 5

<210> 42  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 42

Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile  
1 5

<210> 43  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 43

Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn  
1 5

<210> 44  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 44

Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Ser Ala  
1 5

<210> 45  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 45

Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser



1 5

<210> 46  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 46

Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Ala  
 1 5

<210> 47  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 47

Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln  
 1 5

<210> 48  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 48

Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala  
 1 5

<210> 49  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 49

Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile  
 1 5

<210> 50  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 50

Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly Leu  
 1 5

<210> 51  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 51

Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly Leu Tyr  
 1 5



<210> 52  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 52  
 Ser Ala Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Leu  
 1 5

<210> 53  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 53  
 Ala Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Leu Leu  
 1 5

<210> 54  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 54  
 Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile  
 1 5

<210> 55  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 55  
 Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu Tyr  
 1 5

<210> 56  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 56  
 Gly Ile Leu Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr  
 1 5

<210> 57  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 57  
 Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys  
 1 5

<210> 58

<211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 58

Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu  
 1 5

<210> 59  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 59

Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu  
 1 5

<210> 60  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 60

Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala  
 1 5

<210> 61  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 61

Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu  
 1 5

<210> 62  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 62

Glu Leu Ala Asp Leu Asp Arg Gln Leu  
 1 5

<210> 63  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 63

Leu Ala Asp Leu Asp Arg Gln Leu Ile  
 1 5

<210> 64  
 <211> 9  
 <212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 64

Asp Leu Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu  
1 5

<210> 65

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 65

Leu Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile  
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 66

Ala Val Gln Thr Thr Arg Asp Ile Leu  
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 67

Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe  
1 5

<210> 68

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 68

Lys Gly Leu Glu Phe Val Arg Pro Val  
1 5

<210> 69

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 69

Gly Leu Glu Phe Val Arg Pro Val Ala  
1 5

<210> 70

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 70

Leu Glu Phe Val Arg Pro Val Ala Val  
1 5

<210> 71

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 71

Phe Val Arg Pro Val Ala Val Asp Leu  
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 72

Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr  
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 73

Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val  
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 74

Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala  
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 75

Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala Leu  
1 5

<210> 76

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 76

Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe  
1 5

<210> 77  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 77

Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 78

Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala  
1 5

<210> 79  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 79

Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala  
1 5

<210> 80  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 80

Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala  
1 5

<210> 81  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 81

Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val  
1 5

<210> 82  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
<400> 82

Ala Met Ala Val Val Gly Gly Ala Leu  
1 5

<210> 83  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 83

Ala Val Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr  
 1 5

<210> 84  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 84

Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys  
 1 5

<210> 85  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 85

Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu  
 1 5

<210> 86  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 86

Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile  
 1 5

<210> 87  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 87

Lys Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu  
 1 5

<210> 88  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 88

Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu Leu  
 1 5

<210> 89  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 89

Ile Asn Ala Thr Gln Leu Leu Lys Leu  
 1 5

<210> 90  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 90

Asn Ala Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu  
 1 5

<210> 91  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 91

Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu  
 1 5

<210> 92  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 92

Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu  
 1 5

<210> 93  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 93

Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val  
 1 5

<210> 94  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 94

Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala  
 1 5

<210> 95  
 <211> 9

<212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 95  
 Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala Ile  
 1 5

<210> 96  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 96  
 Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala Asp Ile  
 1 5

<210> 97  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 97  
 Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val  
 1 5

<210> 98  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 98  
 Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala  
 1 5

<210> 99  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 99  
 Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys  
 1 5

<210> 100  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 100  
 Thr Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile  
 1 5

<210> 101  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis



<400> 101

Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu  
1 5

<210> 102

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 102

Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys Glu Leu  
1 5

<210> 103

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 103

Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu  
1 5

<210> 104

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 104

Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe  
1 5

<210> 105

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 105

Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe  
1 5

<210> 106

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 106

Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val  
1 5

<210> 107

<211> 9

<212> білок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 107

Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu  
1 5

<210> 108  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
  
<400> 108

Gly Leu Thr Gly Ala Thr Ser Gly Leu  
1 5

<210> 109  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
  
<400> 109

Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly  
1 5

<210> 110  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
  
<400> 110

Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala  
1 5

<210> 111  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
  
<400> 111

Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His  
1 5

<210> 112  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
  
<400> 112

Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp  
1 5

<210> 113  
<211> 9  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis  
  
<400> 113

Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu

1 5

<210> 114  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 114

Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala  
 1 5

<210> 115  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 115

Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro  
 1 5

<210> 116  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 116

Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu  
 1 5

<210> 117  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 117

Ser Gly Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu  
 1 5

<210> 118  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 118

Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala  
 1 5

<210> 119  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 119

His Ala Ala Ser Thr Arg Gln Ala Leu  
 1 5

<210> 120  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 120  
 Ser Thr Arg Gln Ala Leu Arg Pro Arg  
 1 5

<210> 121  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 121  
 Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly  
 1 5

<210> 122  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 122  
 Glu Gln Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu  
 1 5

<210> 123  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 123  
 Gly Ala Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys  
 1 5

<210> 124  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 124  
 Ala Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys  
 1 5

<210> 125  
 <211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 125  
 Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser  
 1 5

<210> 126

<211> 9  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 126

Thr Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val  
 1 5

<210> 127  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 127

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

Leu Tyr Asp Leu  
 20

<210> 128  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 128

Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly  
 1 5 10 15

Gly Ile Leu Tyr  
 20

<210> 129  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 129

Asn Gln Gly Gly Ile Leu Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala  
 1 5 10 15

Leu Glu Glu Leu  
 20

<210> 130  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 130

Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp  
 1 5 10 15

Leu Gly Ser Ala  
 20

<210> 131  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 131

Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala Gly Lys Asn Arg  
 1 5 10 15

Asn His Val Asn  
 20

<210> 132  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 132

Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu Asp  
 1 5 10 15

Arg Gln Leu Ile  
 20

<210> 133  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 133

Asp Leu Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala  
 1 5 10 15

Val Gln Thr Thr  
 20

<210> 134  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 134

Ala Asn Ala Val Gln Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys  
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Phe  
 20

<210> 135  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 135

Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr  
1 5 10 15

Tyr Ile Pro Val  
20

<210> 136  
<211> 27  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 136

Phe Val Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly  
1 5 10 15

His Ala Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe  
20 25

<210> 137  
<211> 20  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 137

Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Cys Ala Gly Ala Met Ala Val Val Gly  
1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala  
20

<210> 138  
<211> 20  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 138

Val Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn  
1 5 10 15

Ala Thr Gln Leu  
20

<210> 139  
<211> 20  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 139

Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu  
1 5 10 15

Leu Val Ala Ala  
20

<210> 140  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 140

Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val  
 1 5 10 15

Ala Asp Ile Ile  
 20

<210> 141  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 141

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

Phe Ile Thr Asn  
 20

<210> 142  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 142

Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys Glu Leu Trp  
 1 5 10 15

Asp Lys Leu Thr  
 20

<210> 143  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 143

Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg  
 1 5 10 15

Gly Trp Ser Asn  
 20

<210> 144  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 144



Phe Ser Arg Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro  
1 5 10 15

Gly Leu Thr Gly  
20

<210> 145  
<211> 20  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 145

Gly Val Pro Gly Leu Thr Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr  
1 5 10 15

Gly Leu Phe Gly  
20

<210> 146  
<211> 20  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 146

Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly  
1 5 10 15

Leu Ala His Ala  
20

<210> 147  
<211> 20  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 147

Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu  
1 5 10 15

Pro Ala Leu Ala  
20

<210> 148  
<211> 20  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 148

Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe Gly  
1 5 10 15

Gly Leu Pro Ser  
20

<210> 149  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 149

Gly Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr  
 1 5 10 15

Arg Gln Ala Leu  
 20

<210> 150  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 150

Ala Ser Thr Arg Gln Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly  
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu  
 20

<210> 151  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 151

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

Ser Ala Gln Gly  
 20

<210> 152  
 <211> 19  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 152

Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met Gly Gly Pro Val Gly  
 1 5 10 15

Met Gly Gly

<210> 153  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 153

Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Thr Thr Lys  
20

<210> 154  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 154

Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly  
1 5 10 15

Thr Glu Asp Ala  
20

<210> 155  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 155

Ala Ala Gly Thr Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gln  
20

<210> 156  
 <211> 20  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 156

Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Lys Val Leu Val  
1 5 10 15

Arg Asn Val Val  
20

<210> 157  
 <211> 1053  
 <212> білок  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 157

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

Ala Gly Ala Gly Pro Glu Pro Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Trp Asp  
20 25 30

Gly Leu Ala Met Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Gly Ser Val

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

305					310					315				320	
Phe	Gly	Leu	Phe	Asn 325	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn 330	Val	Gly	Phe	Phe	Asn 335	Ser
Gly	Asn	Gly	Asn 340	Phe	Gly	Ile	Gly	Asn 345	Ser	Gly	Asn	Phe	Asn 350	Thr	Gly
Gly	Trp	Asn 355	Ser	Gly	His	Gly	Asn 360	Thr	Gly	Phe	Phe	Asn 365	Ala	Gly	Ser
Phe	Asn 370	Thr	Gly	Met	Leu	Asp 375	Val	Gly	Asn	Ala	Asn 380	Thr	Gly	Ser	Leu
Asn 385	Thr	Gly	Ser	Tyr	Asn 390	Met	Gly	Asp	Phe	Asn 395	Pro	Gly	Ser	Ser	Asn 400
Thr	Gly	Thr	Phe	Asn 405	Thr	Gly	Asn	Ala	Asn 410	Thr	Gly	Phe	Leu	Asn 415	Ala
Gly	Asn	Ile	Asn 420	Thr	Gly	Val	Phe	Asn 425	Ile	Gly	His	Met	Asn 430	Asn	Gly
Leu	Phe	Asn 435	Thr	Gly	Asp	Met	Asn 440	Asn	Gly	Val	Phe	Tyr 445	Arg	Gly	Val
Gly	Gln 450	Gly	Ser	Leu	Gln	Phe 455	Ser	Ile	Thr	Thr	Pro 460	Asp	Leu	Thr	Leu
Pro 465	Pro	Leu	Gln	Ile	Pro 470	Gly	Ile	Ser	Val	Pro 475	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro 480
Ala	Ile	Thr	Leu	Pro 485	Ser	Leu	Asn	Ile	Pro 490	Ala	Ala	Thr	Thr	Pro 495	Ala
Asn	Ile	Thr	Val 500	Gly	Ala	Phe	Ser	Leu 505	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu 510	Pro	Ser
Leu	Asn	Ile 515	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr 520	Pro	Ala	Asn	Ile	Thr 525	Val	Gly	Ala
Phe	Ser 530	Leu	Pro	Gly	Leu	Thr 535	Leu	Pro	Ser	Leu	Asn 540	Ile	Pro	Ala	Ala
Thr 545	Thr	Pro	Ala	Asn	Ile 550	Thr	Val	Gly	Ala	Phe 555	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu 560
Thr	Leu	Pro	Ser	Leu 565	Asn	Ile	Pro	Ala	Ala 570	Thr	Thr	Pro	Ala	Asn 575	Ile
Thr	Val	Gly	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Asn

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

850 855 860

Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln  
865 870 875 880

Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr Thr Pro Pro Leu Thr Ile Asp Pro Ile  
885 890 895

Asn Leu Thr Gly Phe Thr Leu Pro Gln Ile Thr Thr Pro Pro Ile Thr  
900 905 910

Thr Pro Pro Leu Thr Ile Glu Pro Ile Gly Val Gly Gly Phe Thr Thr  
915 920 925

Pro Pro Leu Thr Val Pro Gly Ile His Leu Pro Ser Thr Thr Ile Gly  
930 935 940

Ala Phe Ala Ile Pro Gly Gly Pro Gly Tyr Phe Asn Ser Ser Thr Ala  
945 950 955 960

Pro Ser Ser Gly Phe Phe Asn Ser Gly Ala Gly Gly Asn Ser Gly Phe  
965 970 975

Gly Asn Asn Gly Ser Gly Leu Ser Gly Trp Phe Asn Thr Asn Pro Ala  
980 985 990

Gly Leu Leu Gly Gly Ser Gly Tyr Gln Asn Phe Gly Gly Leu Ser Ser  
995 1000 1005

Gly Phe Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Ser Gly Phe Ala Asn Arg  
1010 1015 1020

Gly Ile Leu Pro Phe Ser Val Ala Ser Val Val Ser Gly Phe Ala  
1025 1030 1035

Asn Ile Gly Thr Asn Leu Ala Gly Phe Phe Gln Gly Thr Thr Ser  
1040 1045 1050

<210> 158  
<211> 450  
<212> білок  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 158

Met Ser Glu Leu Ser Val Ala Thr Gly Ala Val Ser Thr Ala Ser Ser  
1 5 10 15

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

Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Ser Val Asp Glu Asp Tyr Leu Leu Tyr  
35 40 45



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



Ile Asp Phe Met Thr Val Arg Glu Arg Gly Ser Val Gln His Leu Gly  
325 330 335

Ser Thr Ile Arg Ala Arg Leu Asp Pro Ser Ser Asp Arg Met Ala Ala  
340 345 350

Leu Glu Ala Leu Phe Pro Ala Val Thr Ala Ser Gly Ile Pro Lys Ala  
355 360 365

Ala Gly Val Glu Ala Ile Phe Arg Leu Asp Glu Cys Pro Arg Gly Leu  
370 375 380

Tyr Ser Gly Ala Val Val Met Leu Ser Ala Asp Gly Gly Leu Asp Ala  
385 390 395 400

Ala Leu Thr Leu Arg Ala Ala Tyr Gln Val Gly Gly Arg Thr Trp Leu  
405 410 415

Arg Ala Gly Ala Gly Ile Ile Glu Glu Ser Glu Pro Glu Arg Glu Phe  
420 425 430

Glu Glu Thr Cys Glu Lys Leu Ser Thr Leu Thr Pro Tyr Leu Val Ala  
435 440 445

Arg Gln  
450

<210> 159  
<211> 324  
<212> 61000  
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 159

Met Ser Asp Gln Val Pro Lys Pro His Arg His His Ile Trp Arg Ile  
1 5 10 15

Thr Arg Arg Thr Leu Ser Lys Ser Trp Asp Asp Ser Ile Phe Ser Glu  
20 25 30

Ser Ala Gln Ala Ala Phe Trp Ser Ala Leu Ser Leu Pro Pro Leu Leu  
35 40 45

Leu Gly Met Leu Gly Ser Leu Ala Tyr Val Ala Pro Leu Phe Gly Pro  
50 55 60

Asp Thr Leu Pro Ala Ile Glu Lys Ser Ala Leu Ser Thr Ala His Ser  
65 70 75 80

Phe Phe Ser Pro Ser Val Val Asn Glu Ile Ile Glu Pro Thr Ile Gly  
85 90 95

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

<210> 160  
 <211> 1176  
 <212> ДНК  
 <213> синтетична послідовність  
 <220>  
 <223> E.coli кодон - оптимізований полінуклеотид R3616с H37Rv

<400> 160  
 atgagccgtg cctttattat tgatccgacc attagcgcaa ttgatggctct gtatgatctg 60  
 ctgggtattg gtattccgaa tcaggggtgg attctgtata gcagcctgga atattttgaa 120  
 aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca 180  
 gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaattttt ttcaggaaact ggccgatctg 240  
 gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaatg cagttcagac caccctgat 300  
 attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cggtggcagt tgatctgacc 360  
 tatattccgg ttgttggtca tgcactgagc gcagcatttc aggcaccgtt ttgtgccggg 420  
 gcaatggcag ttgtgggtgg tgctctggca tatctggttg tgaaaaccct gattaatgca 480  
 acccagctgc tgaaactgct ggcaaaactg gcagaactgg ttgcagcagc aattgcagat 540  
 attatttccg atgtggccga tattattaa ggcaccctgg gcgaagttag ggaatttatt 600  
 accaatgccc tgaatggtct gaaagaactg tgggataaac tgaccggttg ggttaccggt 660  
 ctgttttagcc gtggttgag caatctggaa tctttttttg ccggtgttcc ggtctgacc 720  
 ggtgcaacca gcggtctgag ccaggtgaca ggtctgtttg gagcagctgg tctgagtgt 780  
 agtagcggtc tggctcatgc agatagcctg gcaagcagcg catctctgcc tgactggca 840  
 ggcattggtg gtggatccgg ttttggtggt ctgccgagcc tggcacaggt tcatgcagca 900  
 agcaccctgc aggcactgcg tccgcgtgca gatggaccgg ttggagcagc agcagaacag 960  
 gttggtggtc agagccagct ggtagcgca cagggtagcc agggtaggg tggtccggtg 1020  
 ggcattggtg gtatgcatcc gagcagcggg gcaagcaaag gcaccaccac caaaaaatat 1080  
 agcgaaggag cagctgctgg caccgaagat gcagaacgtg caccggttga agcagatgcc 1140  
 ggtggaggtc agaaagtctt ggttcgcaat gtggtg 1176

<210> 161  
 <211> 344  
 <212> білок  
 <213> синтетична послідовність

<220>  
 <223> RV3616с H37RV з видаленими залишками 136-183

<400> 161

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
 20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
 35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
 50 55 60

Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
 85 90 95  
 Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
 100 105 110  
 Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala  
 115 120 125  
 Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr  
 130 135 140  
 Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg  
 165 170 175  
 Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr  
 180 185 190  
 Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala  
 195 200 205  
 Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser  
 210 215 220  
 Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln  
 245 250 255  
 Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln  
 260 265 270  
 Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met  
 275 280 285  
 Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser  
 290 295 300  
 Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr  
 305 310 315 320  
 Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln  
 325 330 335

Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val  
340

<210> 162  
<211> 381  
<212> білок  
<213> синтетична послідовність

<220>  
<223> Rv3616c H37Rv з видаленими залишками 150-160

<400> 162

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
100 105 110

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

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

Val Gly Gly Ala Leu Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala  
145 150 155 160

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp  
165 170 175

Ile Ile Lys Gly Thr Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala  
180 185 190

Leu Asn Gly Leu Lys Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr  
195 200 205

Gly Leu Phe Ser Arg Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly

210	215	220
Val Pro Gly Leu Thr Gly 225	Ala Thr Ser Gly Leu 230	Ser Gln Val Thr Gly 235
Leu Phe Gly Ala Ala Gly 245	Leu Ser Ala Ser Ser 250	Gly Leu Ala His Ala 255
Asp Ser Leu Ala Ser Ser 260	Ala Ser Leu Pro Ala 265	Leu Ala Gly Ile Gly 270
Gly Gly Ser Gly Phe Gly 275	Gly Leu Pro Ser Leu 280	Ala Gln Val His Ala 285
Ala Ser Thr Arg Gln Ala 290	Leu Arg Pro Arg Ala 295	Asp Gly Pro Val Gly 300
Ala Ala Ala Glu Gln Val 305	Gly Gly Gln Ser Gln 310	Leu Val Ser Ala Gln 315
Gly Ser Gln Gly Met Gly 325	Gly Gly Pro Val Gly 330	Met Gly Gly Met His 335
Ser Ser Gly Ala Ser Lys 340	Gly Thr Thr Thr Lys 345	Lys Tyr Ser Glu Gly 350
Ala Ala Ala Gly Thr Glu 355	Asp Ala Glu Arg Ala 360	Pro Val Glu Ala Asp 365
Ala Gly Gly Gly Gln Lys 370	Val Leu Val Arg Asn 375	Val Val 380
<210> 163		
<211> 373		
<212> білок		
<213> синтетична послідовність		
<220>		
<223> RV3616с H37RV з видаленими залишками 136-154		
<400> 163		
Met Ser Arg Ala Phe Ile 1	Ile Asp Pro Thr Ile 5	Ser Ala Ile Asp Gly 10
Leu Tyr Asp Leu Leu Gly 20	Ile Gly Ile Pro Asn 25	Gln Gly Gly Ile Leu 30
Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr 35	Phe Glu Lys Ala Leu 40	Glu Glu Leu Ala Ala 45
Ala Phe Pro Gly Asp Gly 50	Trp Leu Gly Ser Ala 55	Ala Asp Lys Tyr Ala 60



Gly Lys Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
 85 90 95  
 Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
 100 105 110  
 Arg Pro Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala  
 115 120 125  
 Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Lys Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu  
 130 135 140  
 Leu Lys Leu Leu Ala Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Asp Ile Ile Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr Leu Gly Glu  
 165 170 175  
 Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys Glu Leu Trp  
 180 185 190  
 Asp Lys Leu Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg Gly Trp Ser  
 195 200 205  
 Asn Leu Glu Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr Gly Ala Thr  
 210 215 220  
 Ser Gly Leu Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Ala Ser Ser Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser  
 245 250 255  
 Leu Pro Ala Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu  
 260 265 270  
 Pro Ser Leu Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln Ala Leu Arg  
 275 280 285  
 Pro Arg Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln Val Gly Gly  
 290 295 300  
 Gln Ser Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met Gly Gly Pro  
 305 310 315 320  
 Val Gly Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Gly Thr  
 325 330 335

Thr Thr Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr Glu Asp Ala  
340 345 350

Glu Arg Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Lys Val Leu  
355 360 365

Val Arg Asn Val Val  
370

<210> 164  
<211> 375  
<212> білок  
<213> синтетична послідовність

<220>  
<223> Rv3616с H37Rv з видаленими залишками 166-182  
<400> 164

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
100 105 110

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

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

Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala  
145 150 155 160

Thr Gln Leu Leu Lys Ser Asp Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr Leu  
165 170 175

Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys Glu



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

<210> 165  
 <211> 387  
 <212> білок  
 <213> синтетична послідовність

<220>  
 <223> RV3616с H37RV з видаленими залишками 135-139  
 <400> 165

Met Ser Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
 20 25 30

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

Ala Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln Val Gly Gly Gln Ser  
305 310 315 320

Gln Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met Gly Gly Pro Val Gly  
325 330 335

Met Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Gly Thr Thr Thr  
340 345 350

Lys Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr Glu Asp Ala Glu Arg  
355 360 365

Ala Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Lys Val Leu Val Arg  
370 375 380

Asn Val Val  
385

<210> 166  
<211> 388  
<212> білок  
<213> синтетична послідовність

<220>  
<223> RV3616с H37Rv з видаленими залишками 142-145

<400> 166

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
100 105 110

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

130	135	140
Leu Ala Tyr Leu Val 145	Val Lys Thr Leu Ile 150	Asn Ala Thr Gln Leu Leu 155 160
Lys Leu Leu Ala 165	Lys Leu Ala Glu Leu Val 170	Ala Ala Ala Ile Ala Asp 175
Ile Ile Ser Asp 180	Val Ala Asp Ile Ile 185	Lys Gly Thr Leu Gly Glu Val 190
Trp Glu Phe Ile Thr 195	Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys 200	Glu Leu Trp Asp 205
Lys Leu Thr Gly Trp Val 210	Thr Gly Leu Phe Ser 215	Arg Gly Trp Ser Asn 220
Leu Glu Ser Phe Phe 225	Ala Gly Val Pro Gly 230	Leu Thr Gly Ala Thr Ser 235 240
Gly Leu Ser Gln Val 245	Thr Gly Leu Phe Gly 250	Ala Ala Gly Leu Ser Ala 255
Ser Ser Gly Leu Ala 260	His Ala Asp Ser 265	Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu 270
Pro Ala Leu Ala Gly Ile 275	Gly Gly Gly Ser Gly 280	Phe Gly Gly Leu Pro 285
Ser Leu Ala Gln Val 290	His Ala Ala Ser Thr 295	Arg Gln Ala Leu Arg Pro 300
Arg Ala Asp Gly Pro 305	Val Gly Ala Ala Ala 310	Glu Gln Val Gly Gly Gln 315 320
Ser Gln Leu Val 325	Ser Ala Gln Gly Ser 330	Gln Gly Met Gly Gly Pro Val 335
Gly Met Gly Gly Met 340	His Pro Ser Ser 345	Gly Ala Ser Lys Gly Thr Thr 350
Thr Lys Lys Tyr Ser 355	Glu Gly Ala Ala Ala 360	Gly Thr Glu Asp Ala Glu 365
Arg Ala Pro Val 370	Glu Ala Asp Ala Gly 375	Gly Gly Gly Gln Lys Val Leu Val 380
Arg Asn Val Val 385		
<210>	167	

<211> 384  
 <212> білок  
 <213> синтетична послідовність  
 <220>  
 <223> RV3616с H37RV з видаленими залишками 138-145  
 <400> 167

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
 20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
 35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
 50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln  
 85 90 95

Thr Thr Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val  
 100 105 110

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

Leu Ser Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu  
 130 135 140

Val Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

Lys Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp  
 165 170 175

Val Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile  
 180 185 190

Thr Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly  
 195 200 205

Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe  
 210 215 220

Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln  
 225 230 235 240

Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu  
245 250 255

Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala  
260 265 270

Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln  
275 280 285

Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly  
290 295 300

Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val  
305 310 315 320

Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly  
325 330 335

Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr  
340 345 350

Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val  
355 360 365

Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val  
370 375 380

<210> 168  
<211> 384  
<212> білок  
<213> синтетична послідовність

<220>  
<223> RV3616C H37RV з видаленими залишками 145-152  
<400> 168

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

Leu Tyr Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu  
20 25 30

Tyr Ser Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala  
35 40 45

Ala Phe Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala  
50 55 60

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

Asp Arg Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln



85										90										95									
Thr	Thr	Arg	Asp 100	Ile	Leu	Glu	Gly	Ala 105	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu 110	Phe	Val														
Arg	Pro	Val 115	Ala	Val	Asp	Leu	Thr 120	Tyr	Ile	Pro	Val	Val 125	Gly	His	Ala														
Leu	Ser 130	Ala	Ala	Phe	Gln 135	Ala	Pro	Phe	Cys	Ala	Gly 140	Ala	Met	Ala	Val														
Val 145	Val	Lys	Thr	Leu	Ile 150	Asn	Ala	Thr	Gln	Leu 155	Leu	Lys	Leu	Leu	Ala														
Lys	Leu	Ala	Glu	Leu 165	Val	Ala	Ala	Ala	Ile 170	Ala	Asp	Ile	Ile	Ser	Asp 175														
Val	Ala	Asp	Ile 180	Ile	Lys	Gly	Thr	Leu 185	Gly	Glu	Val	Trp	Glu 190	Phe	Ile														
Thr	Asn	Ala 195	Leu	Asn	Gly	Leu	Lys 200	Glu	Leu	Trp	Asp	Lys 205	Leu	Thr	Gly														
Trp	Val 210	Thr	Gly	Leu	Phe	Ser 215	Arg	Gly	Trp	Ser	Asn 220	Leu	Glu	Ser	Phe														
Phe 225	Ala	Gly	Val	Pro	Gly 230	Leu	Thr	Gly	Ala	Thr 235	Ser	Gly	Leu	Ser	Gln 240														
Val	Thr	Gly	Leu	Phe 245	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu 250	Ser	Ala	Ser	Ser	Gly 255	Leu														
Ala	His	Ala	Asp 260	Ser	Leu	Ala	Ser	Ser 265	Ala	Ser	Leu	Pro	Ala 270	Leu	Ala														
Gly	Ile	Gly 275	Gly	Gly	Ser	Gly	Phe 280	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser 285	Leu	Ala	Gln														
Val 290	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Arg 295	Gln	Ala	Leu	Arg	Pro 300	Arg	Ala	Asp	Gly														
Pro 305	Val	Gly	Ala	Ala	Ala 310	Glu	Gln	Val	Gly	Gly 315	Gln	Ser	Gln	Leu	Val 320														
Ser	Ala	Gln	Gly	Ser 325	Gln	Gly	Met	Gly	Gly 330	Pro	Val	Gly	Met	Gly 335	Gly														
Met	His	Pro	Ser 340	Ser	Gly	Ala	Ser	Lys 345	Gly	Thr	Thr	Thr	Lys 350	Lys	Tyr														
Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Glu	Asp	Ala	Glu	Arg	Ala	Pro	Val														

	355		360		365										
Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Gly	Gln	Lys	Val	Leu	Val	Arg	Asn	Val	Val
	370					375					380				
<210>	169														
<211>	386														
<212>	білок														
<213>	синтетична послідовність														
<220>															
<223>	Rv3616c H37Rv з видаленими залишками	149-154													
<400>	169														
Met	Ser	Arg	Ala	Phe	Ile	Ile	Asp	Pro	Thr	Ile	Ser	Ala	Ile	Asp	Gly
1				5					10					15	
Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Gly	Ile	Pro	Asn	Gln	Gly	Gly	Ile	Leu
			20					25					30		
Tyr	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr	Phe	Glu	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala
			35				40					45			
Ala	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Trp	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Asp	Lys	Tyr	Ala
	50					55					60				
Gly	Lys	Asn	Arg	Asn	His	Val	Asn	Phe	Phe	Gln	Glu	Leu	Ala	Asp	Leu
65					70					75					80
Asp	Arg	Gln	Leu	Ile	Ser	Leu	Ile	His	Asp	Gln	Ala	Asn	Ala	Val	Gln
				85					90					95	
Thr	Thr	Arg	Asp	Ile	Leu	Glu	Gly	Ala	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val
			100					105					110		
Arg	Pro	Val	Ala	Val	Asp	Leu	Thr	Tyr	Ile	Pro	Val	Val	Gly	His	Ala
		115					120					125			
Leu	Ser	Ala	Ala	Phe	Gln	Ala	Pro	Phe	Cys	Ala	Gly	Ala	Met	Ala	Val
	130					135					140				
Val	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Leu	Ile	Asn	Ala	Thr	Gln	Leu	Leu	Lys	Leu
145					150					155					160
Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Glu	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Asp	Ile	Ile
				165					170					175	
Ser	Asp	Val	Ala	Asp	Ile	Ile	Lys	Gly	Thr	Leu	Gly	Glu	Val	Trp	Glu
			180					185					190		
Phe	Ile	Thr	Asn	Ala	Leu	Asn	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Trp	Asp	Lys	Leu
		195					200					205			



Thr Gly Trp Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg Gly Trp Ser Asn Leu Glu  
 210 215 220

Ser Phe Phe Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr Gly Ala Thr Ser Gly Leu  
 225 230 235 240

Ser Gln Val Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Ser Ala Ser Ser  
 245 250 255

Gly Leu Ala His Ala Asp Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Ala  
 260 265 270

Leu Ala Gly Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu  
 275 280 285

Ala Gln Val His Ala Ala Ser Thr Arg Gln Ala Leu Arg Pro Arg Ala  
 290 295 300

Asp Gly Pro Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln Val Gly Gly Gln Ser Gln  
 305 310 315 320

Leu Val Ser Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met Gly Gly Pro Val Gly Met  
 325 330 335

Gly Gly Met His Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys  
 340 345 350

Lys Tyr Ser Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr Glu Asp Ala Glu Arg Ala  
 355 360 365

Pro Val Glu Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Lys Val Leu Val Arg Asn  
 370 375 380

Val Val  
 385

<210> 170  
 <211> 1032  
 <212> ДНК  
 <213> синтетична послідовність

<220>  
 <223> H37RV RV3616C з видаленими кодонами для залишків 136-183

<400> 170  
 atgagccgtg cctttattat tgatccgacc attagcgcaa ttgatggtct gtatgatctg 60  
 ctgggtattg gtattccgaa tcagggtggt attctgtata gcagcctgga atattttgaa 120  
 aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca 180  
 gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaattttt ttcaggaact ggccgatctg 240  
 gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaattg cagttcagac caccctgat 300

attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc	360
tatattccgg ttgttggtca tgcactgagc gcagcatttc aggcagatgt ggccgatatt	420
attaaaggca ccctgggcga agtttgggaa tttattacca atgccctgaa tgggtctgaaa	480
gaactgtggg ataaactgac cggttgggtt accggtctgt ttagccgtgg ttggagcaat	540
ctggaatctt tttttgccgg tgttccgggt ctgaccggtg caaccagcgg tctgagccag	600
gtgacaggtc tgtttgagc agctgggtctg agtgctagta gcgggtctggc tcatgcagat	660
agcctggcaa gcagcgcac tctgcctgca ctggcaggca ttggtggtgg atccggtttt	720
ggtggtctgc cgagcctggc acaggttcat gcagcaagca cccgtcaggc actgcgtccg	780
cgtgcagatg gaccggttgg agcagcagca gaacaggttg gtggtcagag ccagctggtt	840
agcgcacagg gtagccaggg tatgggtggt ccggtgggca tgggtggtat gcatccgagc	900
agcgggtcaa gcaaaggcac caccacaaa aaatatagcg aaggagcagc tgctggcacc	960
gaagatgcag aacgtgcacc ggttgaagca gatgccggtg gaggtcagaa agttctggtt	1020
cgcaatgtgg tg	1032

<210> 171

<211> 1143

<212> ДНК

<213> синтетична послідовність

<220>

<223> H37RV RV3616C з видаленими кодонами для залишків 150-160

<400> 171

atgagccgtg cttttattat tgatccgacc attagcgcaa ttgatggtct gtatgatctg	60
ctgggtattg gtattccgaa tcagggtggt attctgtata gcagcctgga atattttgaa	120
aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca	180
gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaattttt ttcaggaact ggccgatctg	240
gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaattg cagttcagac caccctgat	300
attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc	360
tatattccgg ttgttggtca tgcactgagc gcagcatttc aggcaccgtt ttgtgccggt	420
gcaatggcag ttgtgggtgg tgctctgacc cagctgctga aactgctggc aaaactggca	480
gaactggttg cagcagcaat tgcagatatt atttccgatg tggccgatat tattaaggc	540
accctgggcg aagtttggga atttattacc aatgccctga atggtctgaa agaactgtgg	600
gataaactga ccggttgggt taccggtctg tttagccgtg gttggagcaa tctggaatct	660
ttttttgccg gtgttcggg tctgaccggt gcaaccagcg gtctgagcca ggtgacaggt	720
ctgtttggag cagctggtct gagtgctagt agcgggtctgg ctcatgcaga tagcctggca	780
agcagcgcac ctctgcctgc actggcaggc attggtggtg gatccggttt tgggtggtctg	840
ccgagcctgg cacaggttca tgcagcaagc acccgtcagg cactgcgtcc gcgtgcagat	900
ggaccggttg gagcagcagc agaacagggtt ggtggtcaga gccagctggt tagcgcacag	960

ggtagccagg gtatgggtgg tccggtgggc atgggtggta tgcattccgag cagcgggtgca 1020  
agcaaaggca ccaccaccaa aaaatatagc gaaggagcag ctgctggcac cgaagatgca 1080  
gaacgtgcac cggttgaagc agatgccggt ggaggtcaga aagttctggt tcgcaatgtg 1140  
gtg 1143

<210> 172

<211> 1119

<212> ДНК

<213> синтетична послідовність

<220>

<223> H37Rv Rv3616c з видаленими кодонами для залишків 136-154

<400> 172

atgagccgtg cctttattat tgatccgacc attagcgcaa ttgatggctct gtatgatctg 60  
ctgggtattg gtattccgaa tcagggtgggt attctgtata gcagcctgga atattttgaa 120  
aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca 180  
gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaattttt ttcaggaact ggccgatctg 240  
gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaattg cagttcagac caccctgatg 300  
attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc 360  
tatattccgg ttgttggta tgactgagc gcagcatttc aggcaaaaac cctgattaat 420  
gcaaccagc tgctgaaact gctggcaaaa ctggcagaac tggttgcagc agcaattgca 480  
gatattattt ccgatgtggc cgatattatt aaaggcacc cgggcgaagt ttgggaattt 540  
attaccaatg ccctgaatgg tctgaaagaa ctgtgggata aactgaccgg ttgggttacc 600  
ggctctgtta gccgtgggtg gagcaatctg gaatcttttt ttgccggtgt tccgggtctg 660  
accggtgcaa ccagcggctc gagccagggtg acaggctctgt ttggagcagc tggctctgagt 720  
gctagtagcg gtctggctca tgcatagc ctggcaagca gcgcatctct gcctgactg 780  
gcaggcattg gtggtggatc cggttttgggt ggtctgccga gcctggcaca ggttcattgca 840  
gcaagcacc ctcaggcact gcgtccgcgt gcagatggac cggttggagc agcagcagaa 900  
caggttgggtg gtcagagcca gctgggttagc gcacagggtg gccagggtat ggggtggctcg 960  
gtgggcatgg gtggtatgca tccgagcagc ggtgcaagca aaggcaccac caccaaaaaa 1020  
tatagcgaag gagcagctgc tggcaccgaa gatgcagaac gtgcaccggt tgaagcagat 1080  
gccggtggag gtcagaaaagt tctggttcgc aatgtggtg 1119

<210> 173

<211> 1125

<212> ДНК

<213> синтетична послідовність

<220>

<223> H37Rv Rv3616c з видаленими кодонами для залишків 166-182

<400> 173

atgagccgtg cctttattat tgatccgacc attagcgcaa ttgatggctct gtatgatctg 60

ctgggtattg gtattccgaa tcaggggtggt attctgtata gcagcctgga atattttgaa	120
aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca	180
gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaatTTTT ttcaggaact ggccgatctg	240
gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaatg cagttcagac caccctgat	300
attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc	360
tatattccgg ttgttggtca tgactgagc gcagcatttc aggcaccgtt ttgtgccggt	420
gcaatggcag ttgtgggtgg tgctctggca tatctggttg tgaaaaccct gattaatgca	480
accagctgc tgaaatccga tgtggccgat attattaaag gcaccctggg cgaagtttg	540
gaatttatta ccaatgccct gaatggtctg aaagaactgt gggataaact gaccgggttg	600
gttaccggtc tgttttagccg tggttggagc aatctggaat ctttttttgc cgggtgtccg	660
ggtctgaccg gtgcaaccag cggctctgagc cagggtgacag gtctgttttg agcagctggt	720
ctgagtgcta gtagcggctt ggctcatgca gatagcctgg caagcagcgc atctctgcct	780
gcactggcag gcattgggtg tggatccggt tttggtggtc tgccgagcct ggcacaggtt	840
catgcagcaa gcaccctga ggcactgcgt ccgcgtgcag atggaccggt tggagcagca	900
gcagaacagg ttggtggtca gagccagctg gttagcgcac agggtagcca gggtatgggt	960
ggtccggttg gcatgggtgg tatgcatccg agcagcgggt caagcaaagg caccaccacc	1020
aaaaaatata gcgaaggagc agctgctggc accgaagatg cagaacgtgc accggttgaa	1080
gcagatgccg gtggagggtca gaaagtctct gttcgcaatg tgggtg	1125

<210> 174

<211> 1161

<212> ДНК

<213> синтетична послідовність

<220>

<223> H37RV RV3616с з видаленими кодонами для залишків 135-139

<400> 174

atgagccgtg cttttattat tgatccgacc attagcgcga ttgatggtct gtatgatctg	60
ctgggtattg gtattccgaa tcaggggtggt attctgtata gcagcctgga atattttgaa	120
aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca	180
gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaatTTTT ttcaggaact ggccgatctg	240
gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaatg cagttcagac caccctgat	300
attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc	360
tatattccgg ttgttggtca tgactgagc gcagcatttc aggggtgcaat ggcagttgtg	420
ggtggtgctc tggcatatct ggttgtgaaa accctgatta atgcaacca gctgctgaaa	480
ctgctggcaa aactggcaga actggttgca gcagcaattg cagatattat ttccgatgtg	540
gccgatatta ttaaaggcac cctgggcgaa gtttggaat ttattaccaa tgccctgaat	600
ggtctgaaag aactgtggga taaactgacc ggttgggtta ccggtctgtt tagccgtggt	660



tggagcaatc tggaatcttt ttttgccggt gttccgggtc tgaccgggtgc aaccagcggg	720
ctgagccagg tgacagggtct gtttggagca gctgggtctga gtgctagtag cgggtctggct	780
catgcagata gcctggcaag cagcgcattct ctgcctgcac tggcaggcat tgggtggtgga	840
tccgggttttg gtgggtctgcc gagcctggca cagggttcatg cagcaagcac ccgtcaggca	900
ctgcgtccgc gtgcagatgg accgggttga gcagcagcag aacagggttgg tggtcagagc	960
cagctgggta gcgcacaggg tagccagggt atgggtgggtc cgggtggcat ggggtggatg	1020
catccgagca gcgggtgcaag caaaggcacc accacaaaaa aatatagcga aggagcagct	1080
gctggcaccg aagatgcaga acgtgcaccg gttgaagcag atgccgggtgg aggtcagaaa	1140
gttctgggtc gcaatgtggt g	1161

&lt;210&gt; 175

&lt;211&gt; 1164

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; синтетична послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; H37Rv Rv3616c з видаленими кодонами для залишків 142-145

&lt;400&gt; 175

atgagccgtg cctttattat tgatccgacc attagcgcaa ttgatgggtct gtatgatctg	60
ctgggtattg gtattccgaa tcagggtgggt attctgtata gcagcctgga atattttgaa	120
aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttgggtggg tagcgcagca	180
gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaattttt ttcaggaact ggccgatctg	240
gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaattg cagttcagac caccctgat	300
attctggaag gtgcaaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc	360
tatattccgg ttgttggtca tgactgagc gcagcatttc aggcaccgtt ttgtgccggt	420
gcagggtggg ctctggcata tctggttggtg aaaaccctga ttaatgcaac ccagctgctg	480
aaactgctgg caaaactggc agaactggtt gcagcagcaa ttgcagatat tatttccgat	540
gtggccgata ttattaaagg caccctgggc gaagtttggg aatttattac caatgccctg	600
aatgggtctga aagaactgtg ggataaactg accgggtggg ttaccgggtct gtttagccgt	660
gggtggagca atctggaatc tttttttgcc ggtgttcagg gtctgaccgg tgcaaccagc	720
gggtctgagcc aggtgacagg tctgtttgga gcagctgggtc tgagtgctag tagcgggtctg	780
gctcatgcag atagcctggc aagcagcgca tctctgcctg cactggcagg cattgggtggt	840
ggatccgggt ttggtgggtct gccgagcctg gcacagggtc atgcagcaag caccctcag	900
gcactgcgtc cgctgcaga tggaccgggt ggagcagcag cagaacagggt tgggtggtcag	960
agccagctgg ttagcgcaca gggtagccag ggtatgggtg gtccgggtggg catgggtggt	1020
atgcattccga gcagcgggtc aagcaaaggc accaccacca aaaaatatag cgaaggagca	1080
gctgctggca ccgaagatgc agaacgtgca ccggttgaag cagatgccgg tggagggtcag	1140
aaagttctgg ttcgcaatgt ggtg	1164

<210> 176  
 <211> 1152  
 <212> ДНК  
 <213> синтетична послідовність

<220>  
 <223> H37Rv Rv3616c з видаленими кодонами для залишків 138-145

<400> 176  
 atgagccgtg cctttattat tgatccgacc attagcgcaa ttgatggctct gtatgatctg 60  
 ctgggtattg gtattccgaa tcaggggtgg attctgtata gcagcctgga atattttgaa 120  
 aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca 180  
 gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaattttt ttcaggaact ggccgatctg 240  
 gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaatg cagttcagac caccctgtgat 300  
 attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc 360  
 tatattccgg ttgttgggtca tgcactgagc gcagcatttc aggcaccgtt tgggtgggtct 420  
 ctggcatatc tggttgtgaa aaccctgatt aatgcaacc agctgctgaa actgctggca 480  
 aaactggcag aactggttgc agcagcaatt gcagatatta tttccgatgt ggccgatatt 540  
 attaaaggca ccctggggcga agtttgggaa tttattacca atgccctgaa tgggtctgaaa 600  
 gaactgtggg ataaactgac cggttgggtt accggtctgt ttagccgtgg ttggagcaat 660  
 ctggaatctt tttttgccgg tgttccgggt ctgaccggtg caaccagcgg tctgagccag 720  
 gtgacagggtc tgtttggagc agctgggtctg agtgctagta gcggtctggc tcatgcagat 780  
 agcctggcaa gcagcgcatc tctgcctgca ctggcaggca ttgggtgggtg atccggtttt 840  
 ggtgggtctgc cgagcctggc acaggttcat gcagcaagca cccgtcaggc actgctgccg 900  
 cgtgcagatg gaccggttgg agcagcagca gaacagggtt gtgggtcagag ccagctgggtt 960  
 agcgcacagg gtagccaggg tatgggtgggt ccgggtgggca tgggtgggtat gcatccgagc 1020  
 agcggtgcaa gcaaaggcac caccacaaa aaatatagcg aaggagcagc tgctggcacc 1080  
 gaagatgcag aacgtgcacc ggttgaagca gatgccggtg gaggtcagaa agttctgggtt 1140  
 cgcaatgtgg tg 1152

<210> 177  
 <211> 1152  
 <212> ДНК  
 <213> синтетична послідовність

<220>  
 <223> H37Rv Rv3616c з видаленими кодонами для залишків 145-152

<400> 177  
 atgagccgtg cctttattat tgatccgacc attagcgcaa ttgatggctct gtatgatctg 60  
 ctgggtattg gtattccgaa tcaggggtgg attctgtata gcagcctgga atattttgaa 120  
 aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca 180  
 gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaattttt ttcaggaact ggccgatctg 240

```

gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaatg cagttcagac caccctgat 300
attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc 360
tatattccgg ttgttgggtca tgcactgagc gcagcatttc aggcaccgtt ttgtgccggt 420
gcaatggcag ttgttgtgaa aaccctgatt aatgcaacc agctgctgaa actgctggca 480
aaactggcag aactgggttc agcagcaatt gcagatatta tttccgatgt ggccgatatt 540
attaaaggca ccctgggcga agtttgggaa tttattacca atgccctgaa tggctctgaaa 600
gaactgtggg ataaactgac cgggtgggtt accggtctgt ttagccgtgg ttggagcaat 660
ctggaatctt tttttgccgg tgttccgggt ctgaccggtg caaccagcgg tctgagccag 720
gtgacaggtc tgtttggagc agctggtctg agtgctagta gcggtctggc tcatgcagat 780
agcctggcaa gcagcgcac tctgcctgca ctggcaggca ttggtggtgg atccggtttt 840
ggtggtctgc cgagcctggc acaggttcat gcagcaagca cccgtcaggc actgctgccg 900
cgtgcagatg gaccggttgg agcagcagca gaacagggtg gtggtcagag ccagctgggt 960
agcgcacagg gtagccaggg tatgggtggg ccggtgggca tgggtggtat gcattccgagc 1020
agcggtgcaa gcaaaggcac caccaccaa aaatatagcg aaggagcagc tgctggcacc 1080
gaagatgcag aacgtgcacc ggttgaagca gatgccggtg gaggtcagaa agttctgggt 1140
cgcaatgtgg tg 1152

```

<210> 178

<211> 1158

<212> ДНК

<213> синтетична послідовність

<220>

<223> H37Rv Rv3616c з видаленими кодонами для залишків 149-154

<400> 178

```

atgagccgtg cttttattat tgatccgacc attagcgaat ttgatggtct gtatgatctg 60
ctgggtattg gtattccgaa tcagggtggg attctgtata gcagcctgga atattttgaa 120
aaagccctgg aagaactggc agcagcattt ccgggtgatg gttggctggg tagcgcagca 180
gataaatatg ccggtaaaaa tcgcaatcat gtgaattttt ttcaggaact ggccgatctg 240
gatcgtcagc tgattagcct gattcatgac caggcaaatg cagttcagac caccctgat 300
attctggaag gtgccaaaaa aggtctggaa tttgttcgtc cgggtggcagt tgatctgacc 360
tatattccgg ttgttgggtca tgcactgagc gcagcatttc aggcaccgtt ttgtgccggt 420
gcaatggcag ttgtgggtgg tgctaaaacc ctgattaatg caaccagct gctgaaactg 480
ctggcaaaac tggcagaact ggttgcagca gcaattgcag atattatttc cgatgtggcc 540
gatattatta aaggcaccct gggcgaagt ttgggaattta ttaccaatgc cctgaatggt 600
ctgaaagaac tgtgggataa actgaccggt tgggttaccg gtctgtttag ccgtgggtgg 660
agcaatctgg aatctttttt tgccggtgtt ccgggtctga ccggtgcaac cagcgggtctg 720
agccagggtg caggctctgt ttggagcagct ggtctgagtg ctagtagcgg tctggctcat 780

```

gcagatagcc tggcaagcag cgcattctctg cctgcactgg caggcattgg tggatggatcc 840  
 ggtttttggtg gtctgccgag cctggcacag gttcatgcag caagcacccg tcaggcactg 900  
 cgtccgcgtg cagatggacc ggttggagca gcagcagaac aggttgggtg tcagagccag 960  
 ctgggttagcg cacagggtag ccaggggtatg ggtgggtccgg tgggcatggg tggtatgcat 1020  
 ccgagcagcg gtgcaagcaa aggcaccacc accaaaaaat atagcgaagg agcagctgct 1080  
 ggcaccgaag atgcagaacg tgcaccggtt gaagcagatg ccggtggagg tcagaaagtt 1140  
 ctggttcgca atgtggtg 1158

<210> 179

<211> 391

<212> білок

<213> синтетична послідовність

<220>

<223> перебудова навколо залишків 137-139 з штаму M. tuberculosis H37Rv, в тому числі видалення Cys138

<400> 179

Met Ala Gly Ala Met Ala Val Val Gly Gly Ala Leu Ala Tyr Leu Val  
 1 5 10 15

Val Lys Thr Leu Ile Asn Ala Thr Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ala Lys  
 20 25 30

Leu Ala Glu Leu Val Ala Ala Ala Ile Ala Asp Ile Ile Ser Asp Val  
 35 40 45

Ala Asp Ile Ile Lys Gly Thr Leu Gly Glu Val Trp Glu Phe Ile Thr  
 50 55 60

Asn Ala Leu Asn Gly Leu Lys Glu Leu Trp Asp Lys Leu Thr Gly Trp  
 65 70 75 80

Val Thr Gly Leu Phe Ser Arg Gly Trp Ser Asn Leu Glu Ser Phe Phe  
 85 90 95

Ala Gly Val Pro Gly Leu Thr Gly Ala Thr Ser Gly Leu Ser Gln Val  
 100 105 110

Thr Gly Leu Phe Gly Ala Ala Gly Leu Ser Ala Ser Ser Gly Leu Ala  
 115 120 125

His Ala Asp Ser Leu Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Ala Gly  
 130 135 140

Ile Gly Gly Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Pro Ser Leu Ala Gln Val  
 145 150 155 160

His Ala Ala Ser Thr Arg Gln Ala Leu Arg Pro Arg Ala Asp Gly Pro  
 165 170 175



Val Gly Ala Ala Ala Glu Gln Val Gly Gly Gln Ser Gln Leu Val Ser  
 180 185 190

Ala Gln Gly Ser Gln Gly Met Gly Gly Pro Val Gly Met Gly Gly Met  
 195 200 205

His Pro Ser Ser Gly Ala Ser Lys Gly Thr Thr Thr Lys Lys Tyr Ser  
 210 215 220

Glu Gly Ala Ala Ala Gly Thr Glu Asp Ala Glu Arg Ala Pro Val Glu  
 225 230 235 240

Ala Asp Ala Gly Gly Gly Gln Lys Val Leu Val Arg Asn Val Val Ser  
 245 250 255

Arg Ala Phe Ile Ile Asp Pro Thr Ile Ser Ala Ile Asp Gly Leu Tyr  
 260 265 270

Asp Leu Leu Gly Ile Gly Ile Pro Asn Gln Gly Gly Ile Leu Tyr Ser  
 275 280 285

Ser Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala Ala Phe  
 290 295 300

Pro Gly Asp Gly Trp Leu Gly Ser Ala Ala Asp Lys Tyr Ala Gly Lys  
 305 310 315 320

Asn Arg Asn His Val Asn Phe Phe Gln Glu Leu Ala Asp Leu Asp Arg  
 325 330 335

Gln Leu Ile Ser Leu Ile His Asp Gln Ala Asn Ala Val Gln Thr Thr  
 340 345 350

Arg Asp Ile Leu Glu Gly Ala Lys Lys Gly Leu Glu Phe Val Arg Pro  
 355 360 365

Val Ala Val Asp Leu Thr Tyr Ile Pro Val Val Gly His Ala Leu Ser  
 370 375 380

Ala Ala Phe Gln Ala Pro Phe  
 385 390

<210> 180

<211> 392

<212> білок

<213> синтетична послідовність

<220>

<223> перебудова навколо залишків 152-153 зі штаму H37Rv M. tub

<400> 180

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

Tyr	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr	Phe	Glu	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala	
		275					280					285				
Ala	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Trp	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Asp	Lys	Tyr	Ala	
	290					295					300					
Gly	Lys	Asn	Arg	Asn	His	Val	Asn	Phe	Phe	Gln	Glu	Leu	Ala	Asp	Leu	
305					310					315					320	
Asp	Arg	Gln	Leu	Ile	Ser	Leu	Ile	His	Asp	Gln	Ala	Asn	Ala	Val	Gln	
				325					330					335		
Thr	Thr	Arg	Asp	Ile	Leu	Glu	Gly	Ala	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val	
			340					345					350			
Arg	Pro	Val	Ala	Val	Asp	Leu	Thr	Tyr	Ile	Pro	Val	Val	Gly	His	Ala	
		355					360					365				
Leu	Ser	Ala	Ala	Phe	Gln	Ala	Pro	Phe	Cys	Ala	Gly	Ala	Met	Ala	Val	
	370					375					380					
Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Tyr	Leu									
385					390											

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Модифікований білок Rv3616с, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 163.
2. Модифікований білок Rv3616с згідно з пунктом 1, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 163.
3. Модифікований білок Rv3616с, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 164.
- 10 4. Модифікований білок Rv3616с згідно з пунктом 3, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 164.
5. Модифікований білок Rv3616с, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 165.
6. Модифікований білок Rv3616с згідно з пунктом 5, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 165.
7. Модифікований білок Rv3616с, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 166.
- 15 8. Модифікований білок Rv3616с згідно з пунктом 7, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 166.
9. Модифікований білок Rv3616с, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 167.
10. Модифікований білок Rv3616с згідно з пунктом 9, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 167.
- 20 11. Модифікований білок Rv3616с, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 168.
12. Модифікований білок Rv3616с згідно з пунктом 11, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 168.
13. Модифікований білок Rv3616с, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 169.
14. Модифікований білок Rv3616с згідно з пунктом 13, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 169.
- 25 15. Модифікований білок Rv3616с згідно з будь-яким з пунктів 1-14, де вказаний білок має менше, ніж 500 амінокислотних залишків у довжину.
16. Модифікований білок Rv3616с згідно з пунктом 15, де вказаний білок має менше, ніж 400 амінокислотних залишків у довжину.
- 30 17. Модифікований білок Rv3616с за будь-яким з пп. 1-16, який є представленим у вигляді фармацевтичної композиції, що додатково включає фармацевтично прийнятний носій або наповнювач.

18. Модифікований білок Rv3616с за будь-яким з пп. 1-16, який є представленим у вигляді фармацевтичної композиції, що додатково включає енхансер неспецифічної імунної відповіді.
19. Модифікований білок Rv3616с за будь-яким з пп. 1-16, який є представленим у вигляді гібридного білка, що додатково включає додатковий гетерологічний поліпептид.
- 5 20. Спосіб лікування, поліпшення стану або запобігання туберкульозу, що полягає у введенні ефективної кількості модифікованого білка Rv3616с згідно з будь-яким з пп. 1-16 суб'єкту, який цього потребує, де вказаний поліпептид викликає імунну відповідь.
21. Спосіб за п. 20 для запобігання реактивації туберкульозу.
22. Спосіб за п. 20 для затримування реактивації туберкульозу.
- 10 23. Спосіб за п. 20 для лікування латентного туберкульозу.
24. Спосіб за п. 20 для запобігання латентному туберкульозу.
25. Спосіб за п. 20 для лікування туберкульозу.
26. Спосіб за п. 20 для запобігання туберкульозу.
27. Полінуклеотид, що включає послідовність, яка кодує модифікований білок Rv3616с за будь-яким з пп. 1-16.
- 15 28. Полінуклеотид за п. 27, що включає послідовність, яка кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 163.
29. Полінуклеотид за п. 27, що включає послідовність, що кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 164.
- 20 30. Полінуклеотид за п. 27, що включає послідовність, що кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 165.
31. Полінуклеотид за п. 27, що включає послідовність, що кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 166.
32. Полінуклеотид за п. 27, що включає послідовність, що кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 167.
- 25 33. Полінуклеотид за п. 27, що включає послідовність, що кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 168.
34. Полінуклеотид за п. 27, що включає послідовність, що кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 169.
- 30 35. Полінуклеотид за будь-яким з пп. 27-34, який є представленим у формі фармацевтичної композиції, що додатково включає фармацевтично прийнятний носій або наповнювач.
36. Полінуклеотид за будь-яким з пп. 27-34, який включає послідовність, що кодує гібридний білок відповідно за п. 19.
37. Спосіб лікування, поліпшення стану або запобігання туберкульозу, що полягає у введенні ефективної кількості полінуклеотиду за будь-яким з пп. 27-34 суб'єкту, який цього потребує, де вказаний поліпептид індукує імунну відповідь.
- 35 38. Спосіб за п. 37 для запобігання або реактивації туберкульозу.
39. Спосіб за п. 37 для затримування реактивації туберкульозу.
40. Спосіб за п. 37 для лікування латентного туберкульозу.
- 40 41. Спосіб за п. 37 для запобігання латентного туберкульозу.
42. Спосіб за п. 37 для лікування туберкульозу.
43. Спосіб за п. 37 для запобігання туберкульозу.

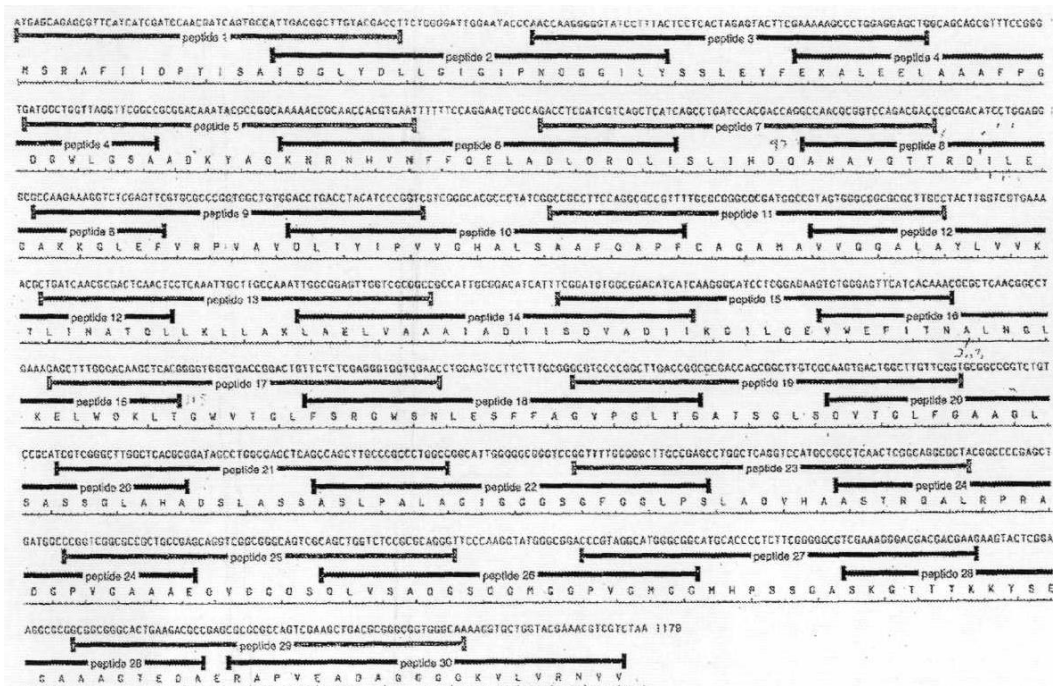


Fig. 1

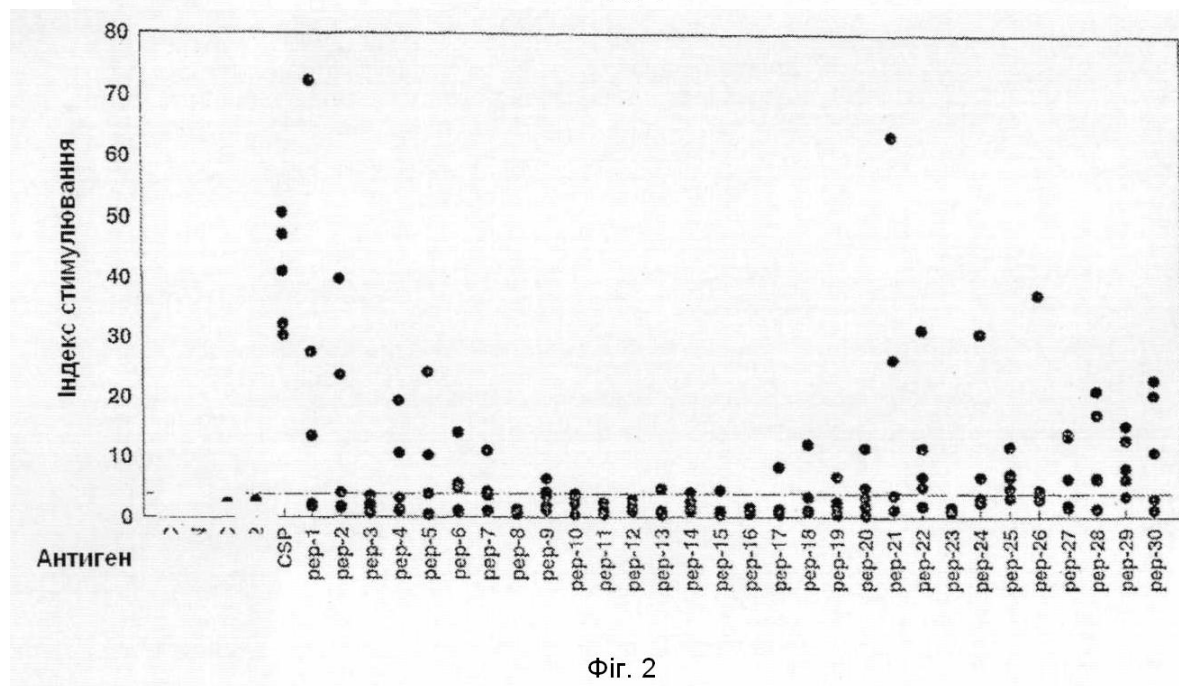
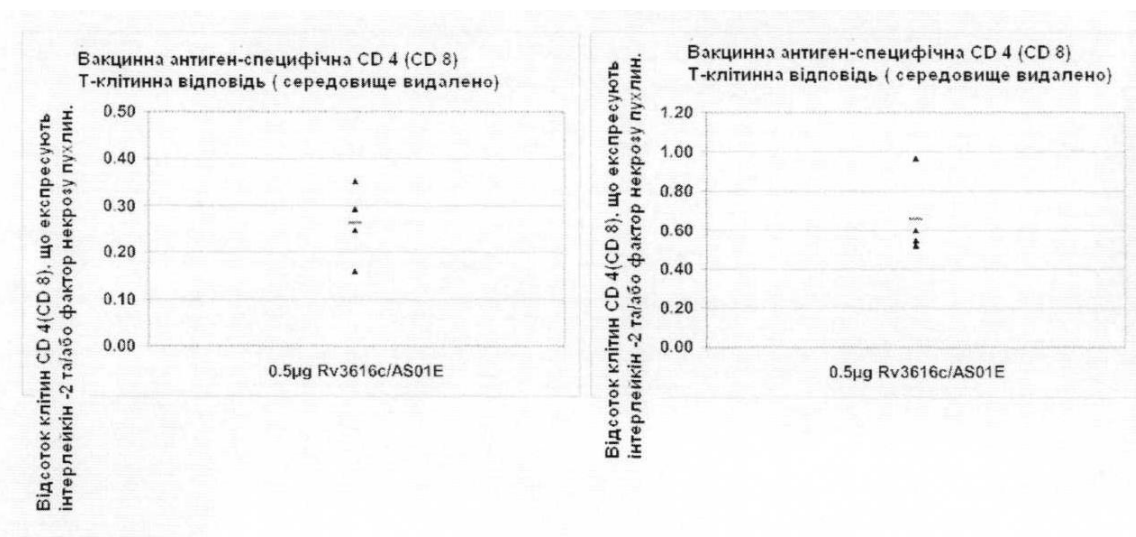
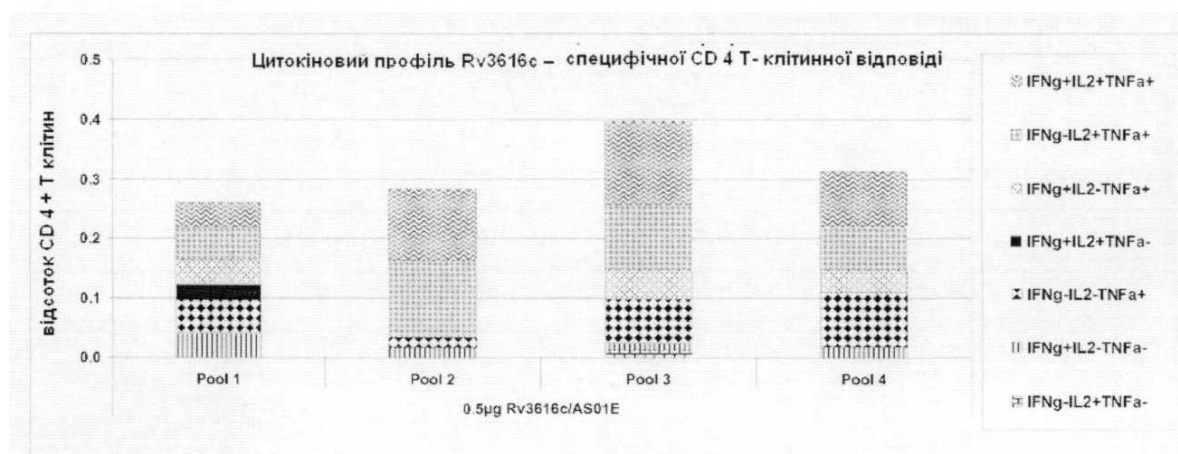


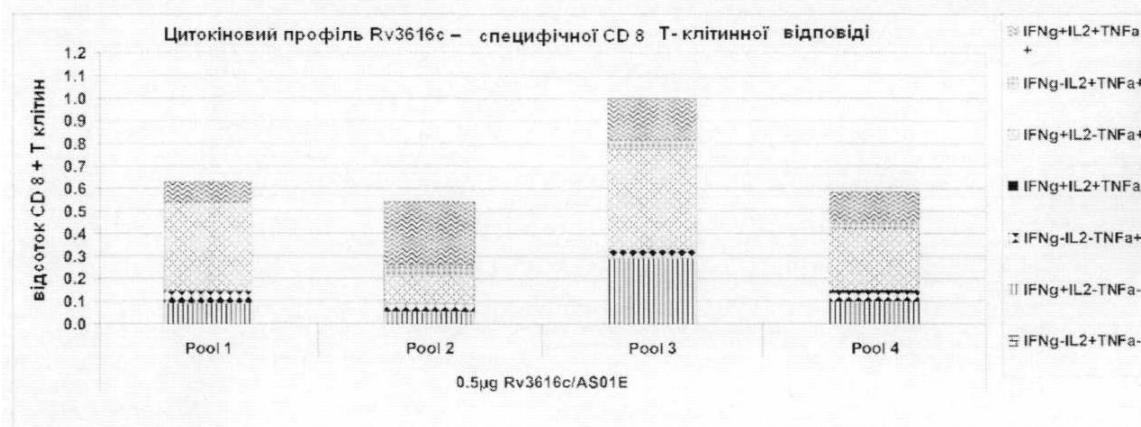
Fig. 2



Фіг. 3

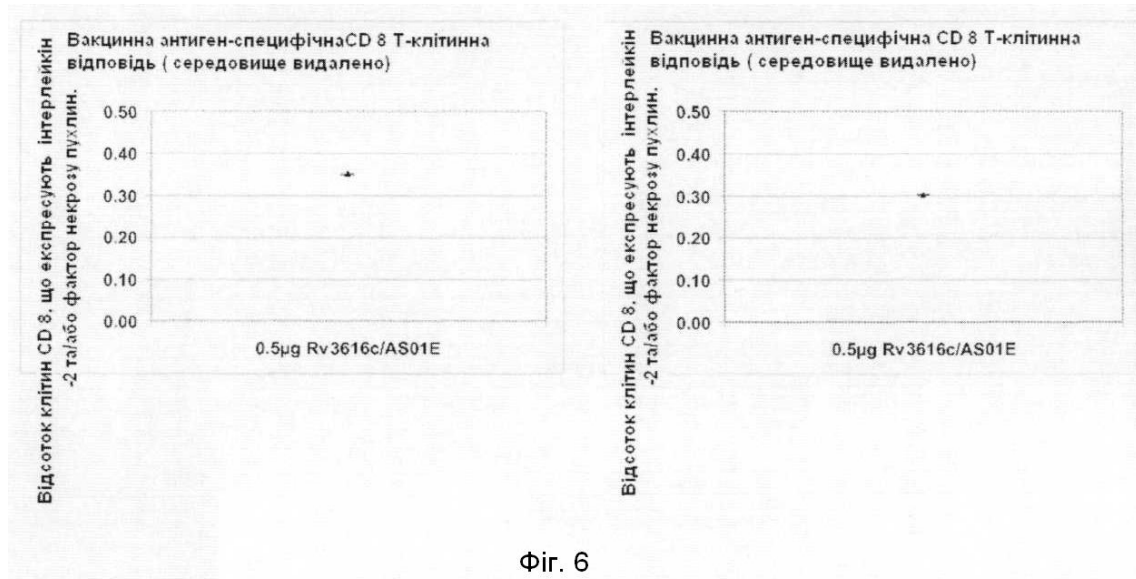


Фіг. 4

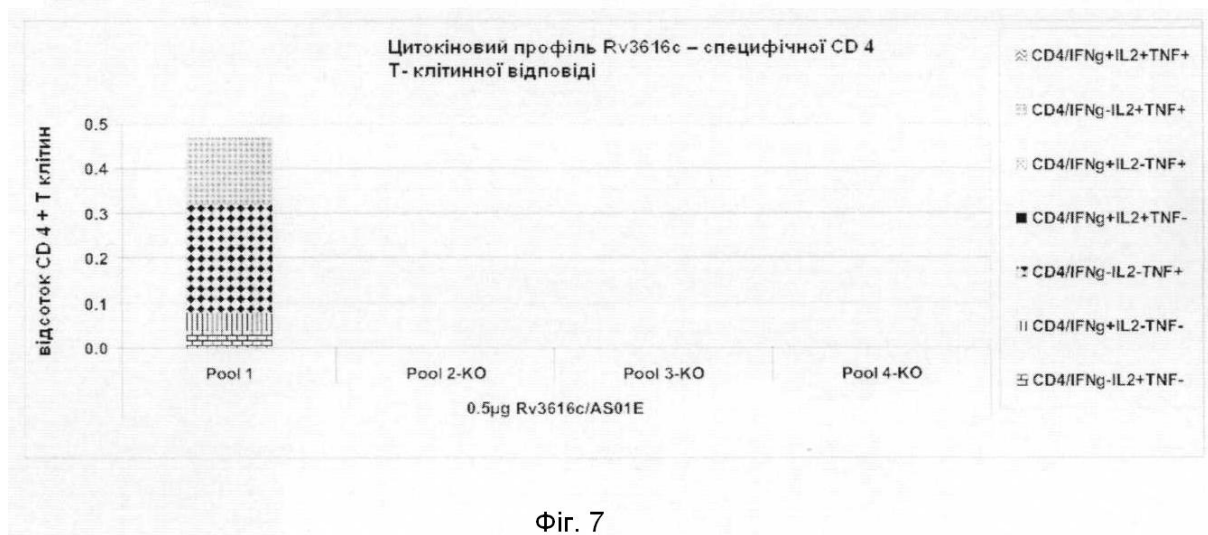


Фіг. 5

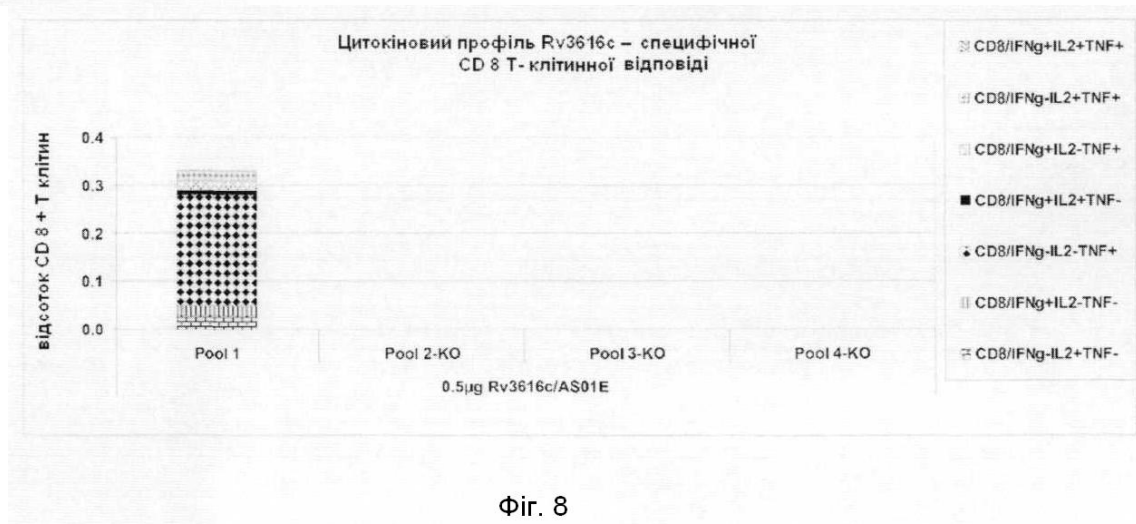




Фіг. 6

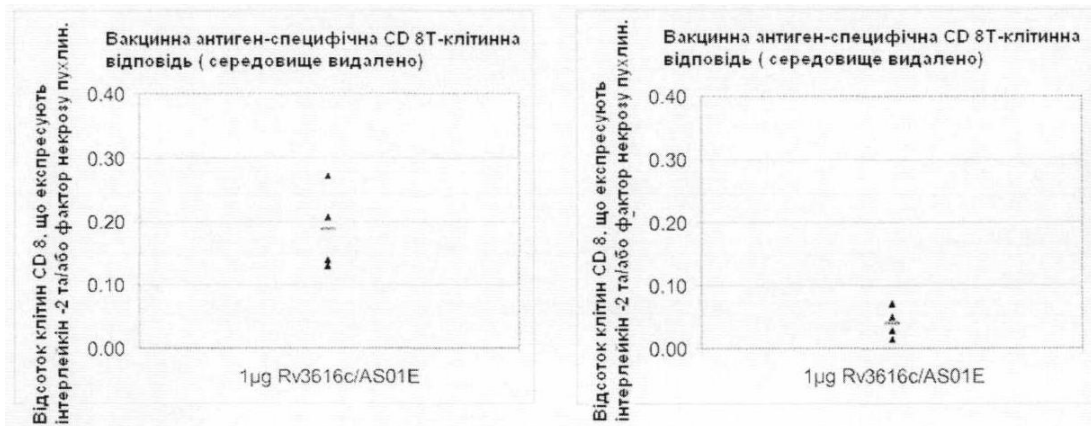


Фіг. 7

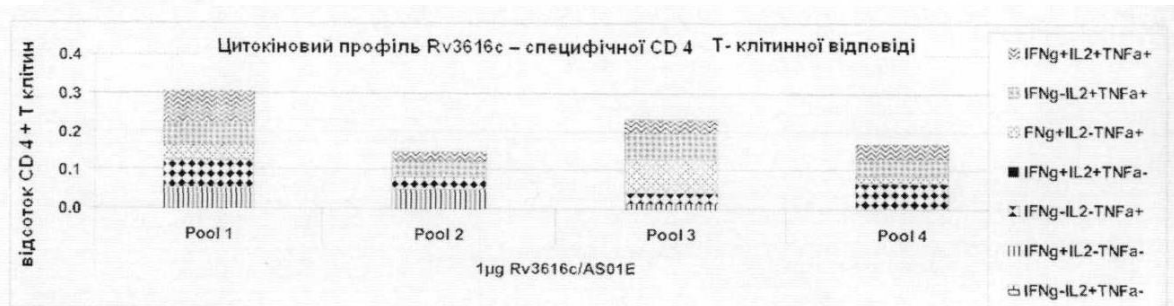


Фіг. 8

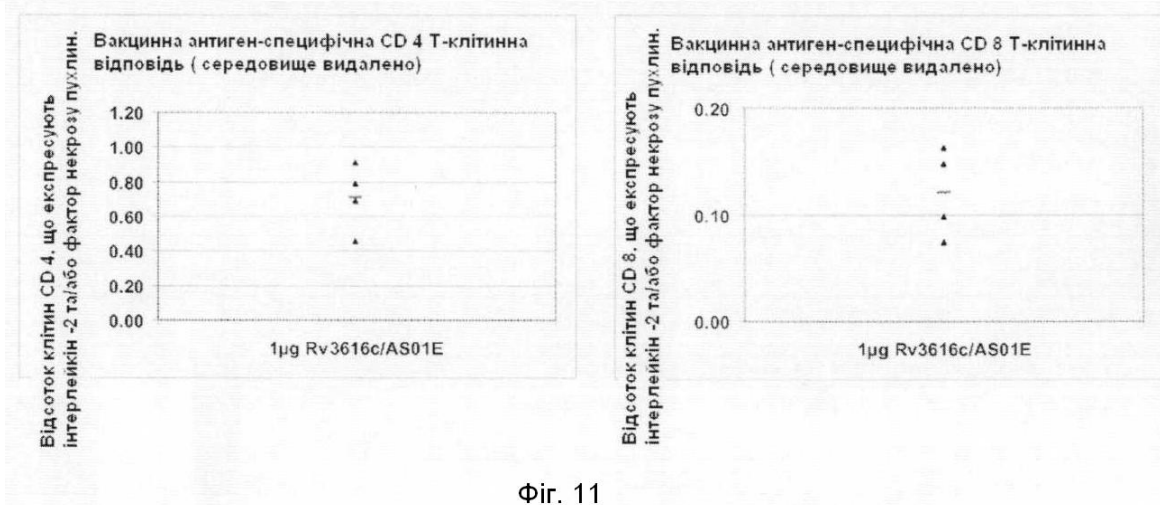




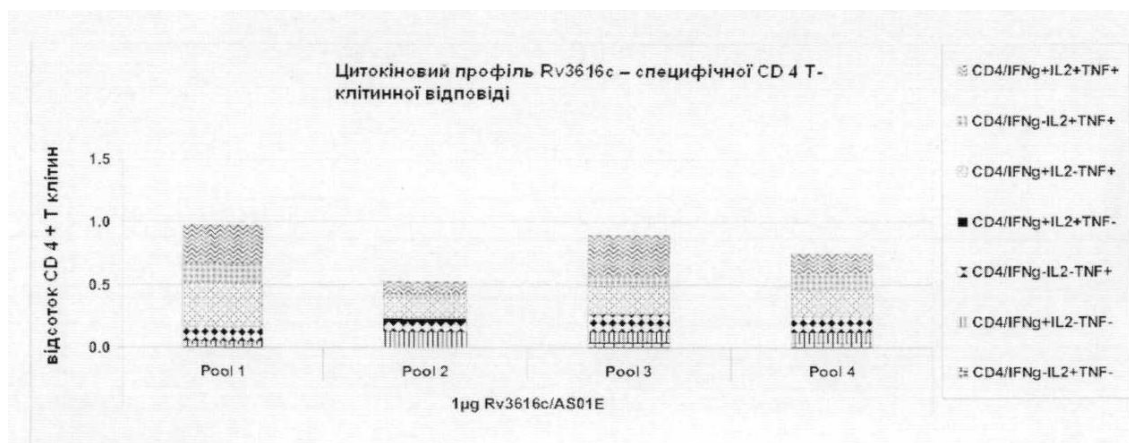
Фіг. 9



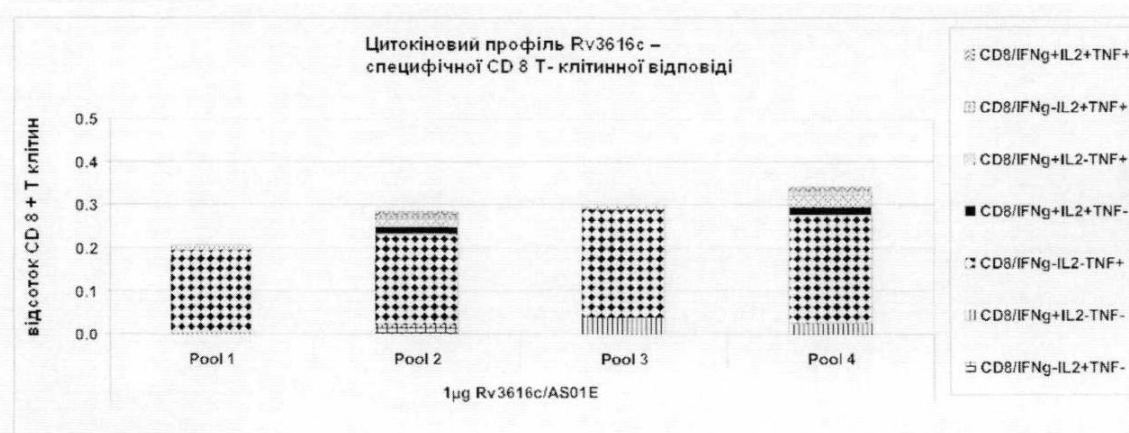
Фіг. 10



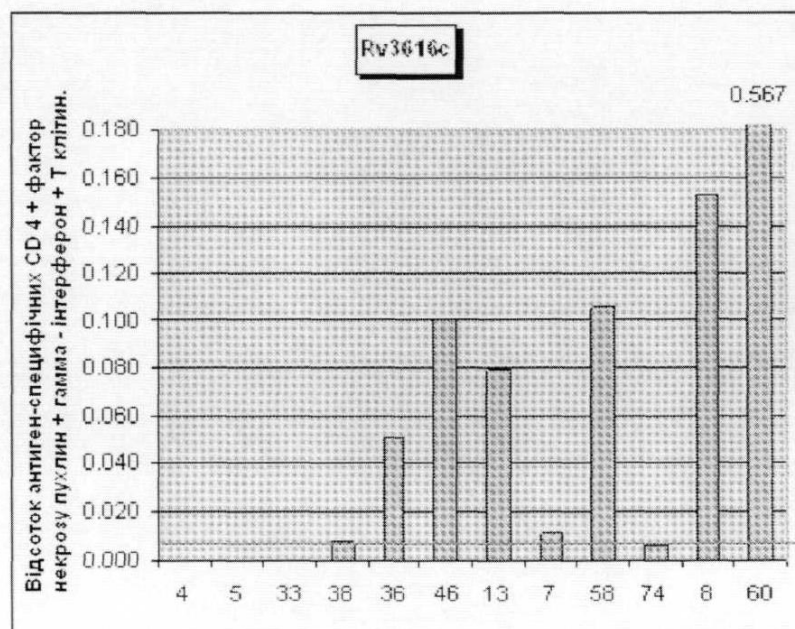
Фіг. 11



Фіг. 12



Фіг. 13



Фіг. 14

H37Rv	1	MSRAFIIDPTISAIIDGLYDLLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGLGSAA
CDC1551	1	MSRAFIIDPTISAIIDGLYDLLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGLGSAA
F11	1	MSRAFIIDPTISAIIDGLYDLLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGLGSAA
Haarlem	1	MSRAFIIDPTISAIIDGLYDLLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGLGSAA
StrainC	1	MSRAFIIDPTISAIIDGLYDLLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGLGSAA
BCG	1	MSRVEIIDPTISAIIDGLYDLLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGLGSAA
H37Rv	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDRDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
CDC1551	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDRDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
F11	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDRDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
Haarlem	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDRDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
StrainC	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDRDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
BCG	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDRDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
H37Rv	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGALAYLVVKTLINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
CDC1551	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGALAYLVVKTLINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
F11	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGALAYLVVKTLINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
Haarlem	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGALAYLVVKTLINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
StrainC	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGALAYLVVKTLINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
BCG	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGALAYLVVKTLINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
H37Rv	181	IISDVADI IKGTLGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
CDC1551	181	IISDVADI IKGTLGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
F11	181	IISDVADI IKGTLGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
Haarlem	181	IISDVADI IKGTLGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
StrainC	181	IISDVADI IKGTLGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
BCG	181	IISDVADI IKGTLGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
H37Rv	241	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGSGFGGLPSLAQVHAA
CDC1551	241	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGSGFGGLPSLAQVHAA
F11	241	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGSGFGGLPSLAQVHAA
Haarlem	241	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGSGFGGLPSLAQVHAA
StrainC	241	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGSGFGGLPSLAQVHAA
BCG	241	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGSGFGGLPSLAQVHAA
H37Rv	301	STRQALRPRADGFPVGAAAEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
CDC1551	301	STRQALRPRADGFPVGAAAEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
F11	301	STRQALRPRADGFPVGAAAEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
Haarlem	301	STRQALRPRADGFPVGAAAEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
StrainC	301	STRQALRPRADGFPVGAAAEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
BCG	301	STRQALRPRADGFPVGAAAEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
H37Rv	361	SEGAAAGTEDAERAPVEADAGGGQKVLVRNVV
CDC1551	361	SEGAAAGTEDAERAPVEADAGGGQKVLVRNVV
F11	361	SEGAAAGTEDAERAPVEADAGGGQKVLVRNVV
Haarlem	361	SEGAAAGTEDAERAPVEADAGGGQKVLVRNVV
StrainC	361	SEGAAAGTEDAERAPVEADAGGGQKVLVRNVV
BCG	361	SEGAAAGTEDAERAPVEADAGGGQKVLVRNVV

Fig. 15

Rv3616_wt	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d136-183	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d150-160	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d136-154	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d166-182	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d135-139	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d142-145	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d138-145	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d145-152	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
d149-154	1	MSRAFIIDPTISAIDGLYDLGIGIPNQGGILYSSLEYFEKALEELAAAFPGDGWLGSA
Rv3616_wt	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d136-183	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d150-160	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d136-154	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d166-182	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d135-139	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d142-145	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d138-145	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d145-152	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
d149-154	61	DKYAGKRNHVNFFQELADLDRQLISLIHDQANAVQTTDILEGAKKGLEFVRPVAVDLT
Rv3616_wt	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGALAYLVVKT LINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
d136-183	121	YIPVVGHALSAAFQA-----
d150-160	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGAL-----TQLLKLLAKLAELVAAAIA
d136-154	121	YIPVVGHALSAAFQA-----KT LINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
d166-182	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGGALAYLVVKT LINATQLLK-----
d135-139	121	YIPVVGHALSAAFQ----GAMAVVGGALAYLVVKT LINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
d142-145	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAG----GGALAYLVVKT LINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
d138-145	121	YIPVVGHALSAAFQAPF-----GGALAYLVVKT LINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
d145-152	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAV-----VVKT LINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
d149-154	121	YIPVVGHALSAAFQAPFCAGAMAVVGA-----KT LINATQLLKLLAKLAELVAAAIA
Rv3616_wt	181	IISDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d136-183	136	---DVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d150-160	170	IISDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d136-154	162	IISDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d166-182	166	--SDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d135-139	176	IISDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d142-145	177	IISDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d138-145	173	IISDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d145-152	173	IISDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT
d149-154	175	IISDVADI IKGT LGEVWEFITNALNGLKELWDKLTGWVTGLFSRGWSNLESFFAGVPGLT

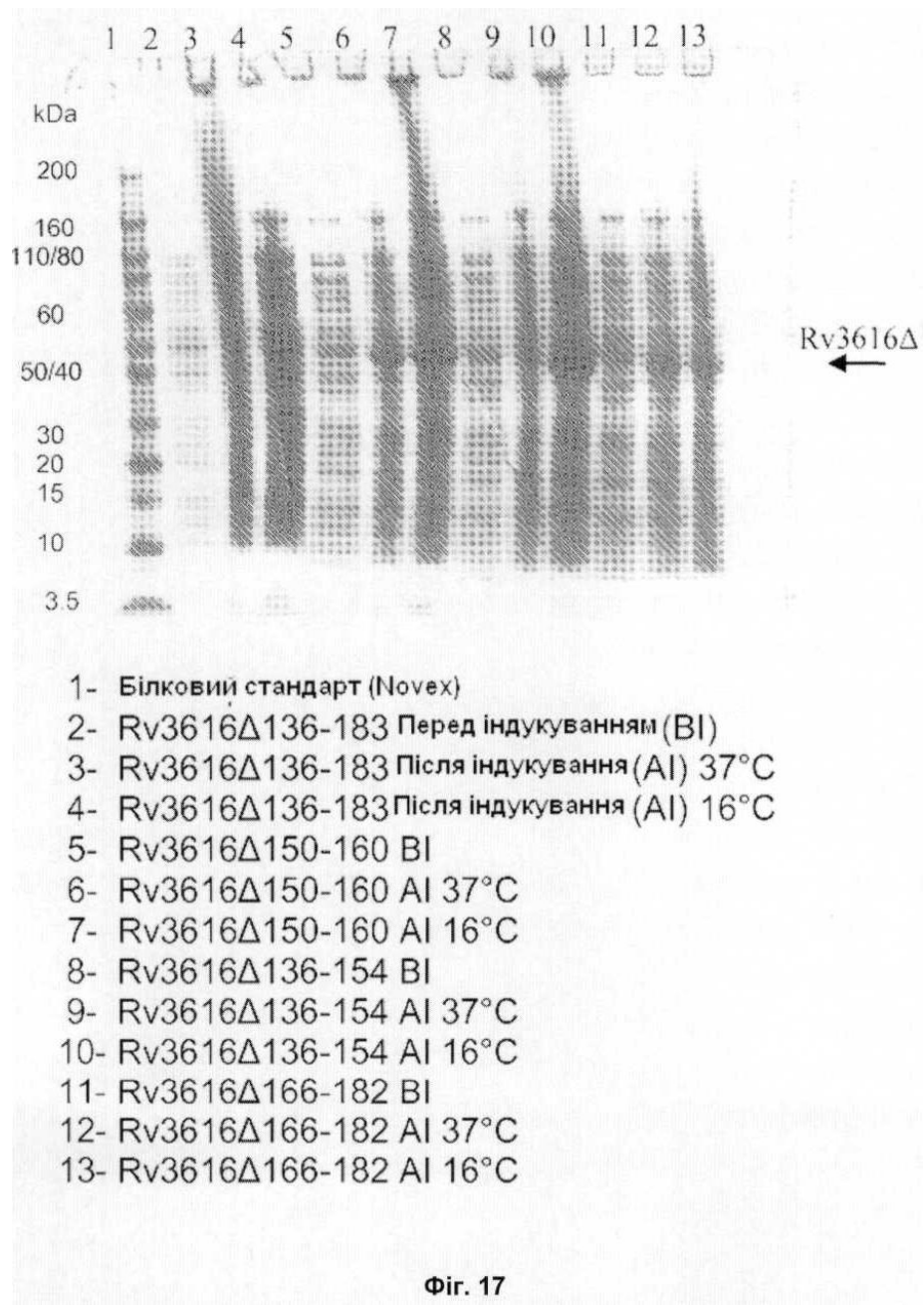
Fig. 16A

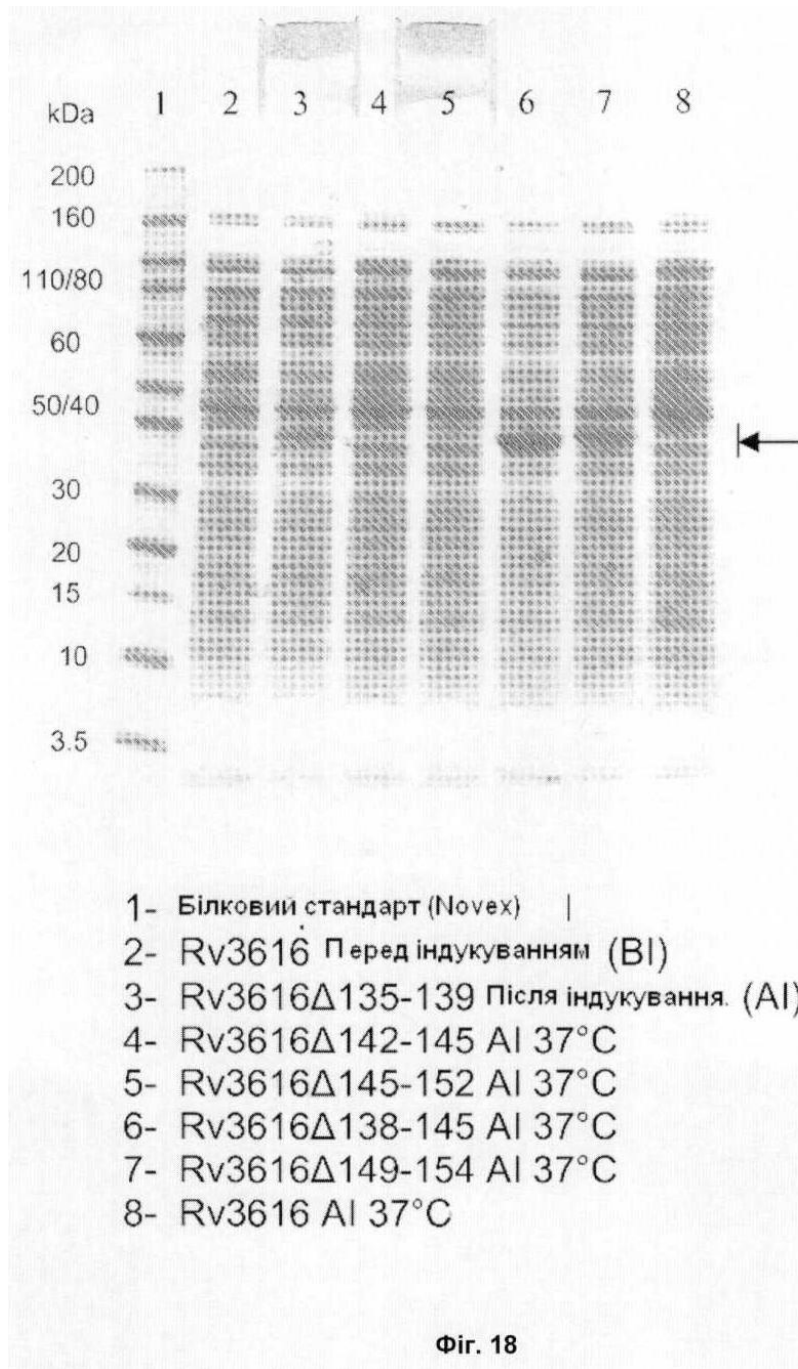


Rv3616_wt	241	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d136-183	193	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d150-160	230	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d136-154	222	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d166-182	224	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d135-139	236	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d142-145	237	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d138-145	233	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d145-152	233	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA
d149-154	235	GATSGLSQVTGLFGAAGLSASSGLAHADSLASSASLPALAGIGGGSGFGGLPSLAQVHAA

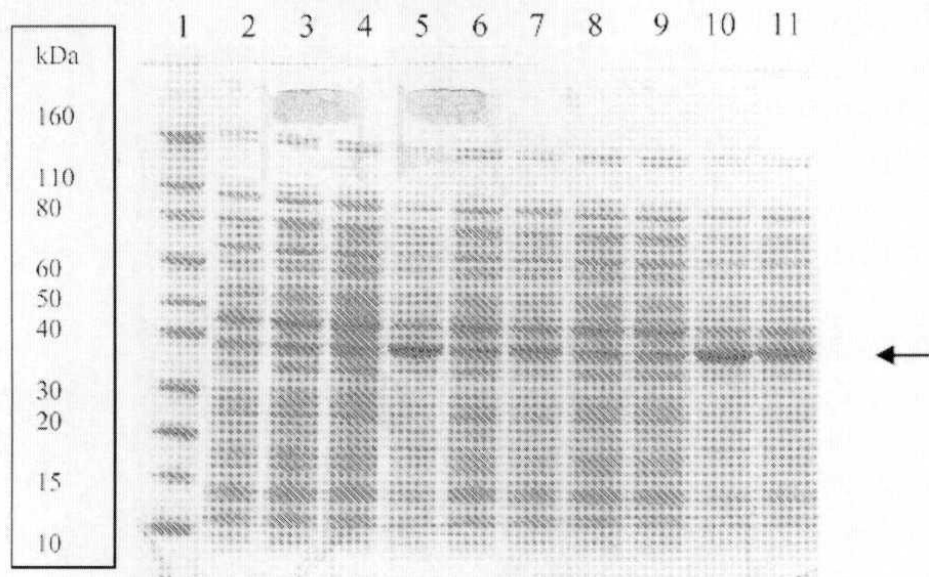
Rv3616_wt	301	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d136-183	253	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d150-160	290	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d136-154	282	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d166-182	284	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d135-139	296	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d142-145	297	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d138-145	293	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d145-152	293	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY
d149-154	295	STRQALRPRADGFPVGAABEQVGGQSQLVSAQGSQGMGGPVMGGMHPSSGASKGTTTKKY

Dir. 16B



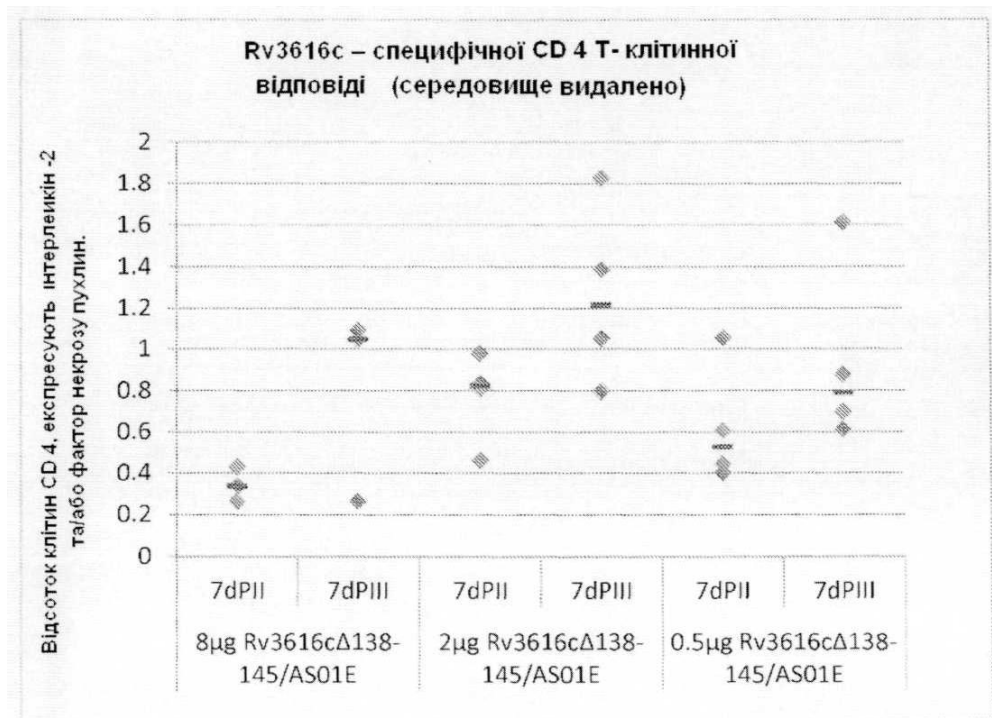




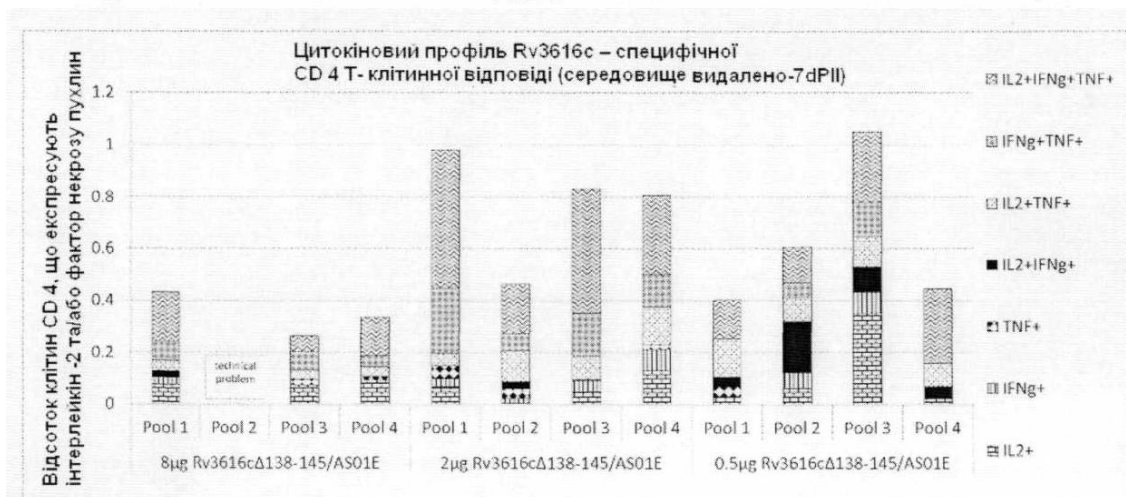


- 1- Білковий стандарт (Novex)
- 2- Rv3616 Перед індукуванням (BI)
- 3- Rv3616 Після індукування (AI)
- 4- Rv3616 $\Delta$ 150-160 AI
- 5- Rv3616 $\Delta$ 136-154 AI
- 6- Rv3616 $\Delta$ 166-182 AI
- 7- Rv3616 $\Delta$ 135-139 AI
- 8- Rv3616 $\Delta$ 142-145 AI
- 9- Rv3616 $\Delta$ 145-152 AI
- 10- Rv3616 $\Delta$ 138-145 AI
- 11- Rv3616 $\Delta$ 149-154 AI

Fig. 19



Фіг. 20



Фіг. 21

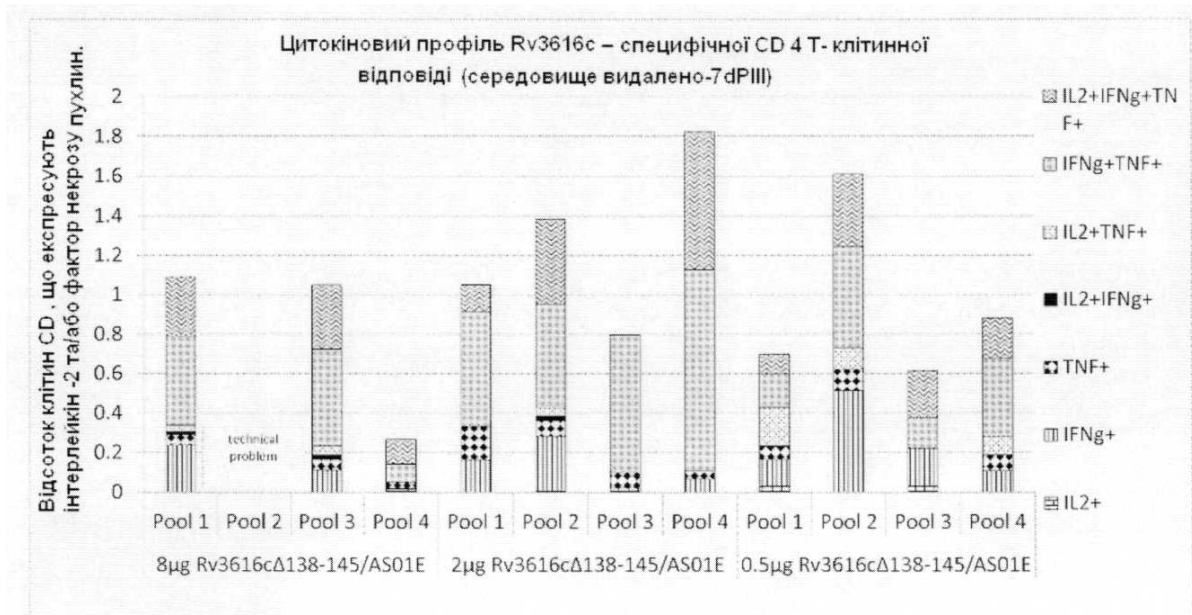


Fig. 22

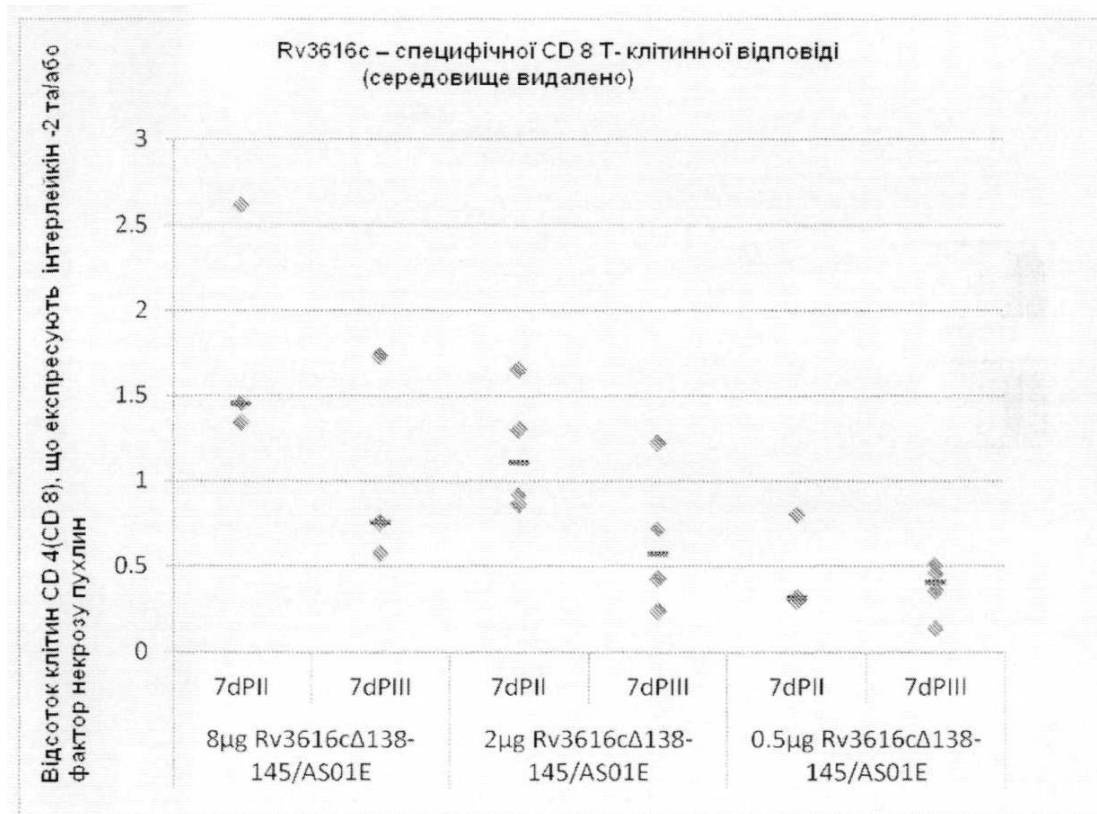


Fig. 23

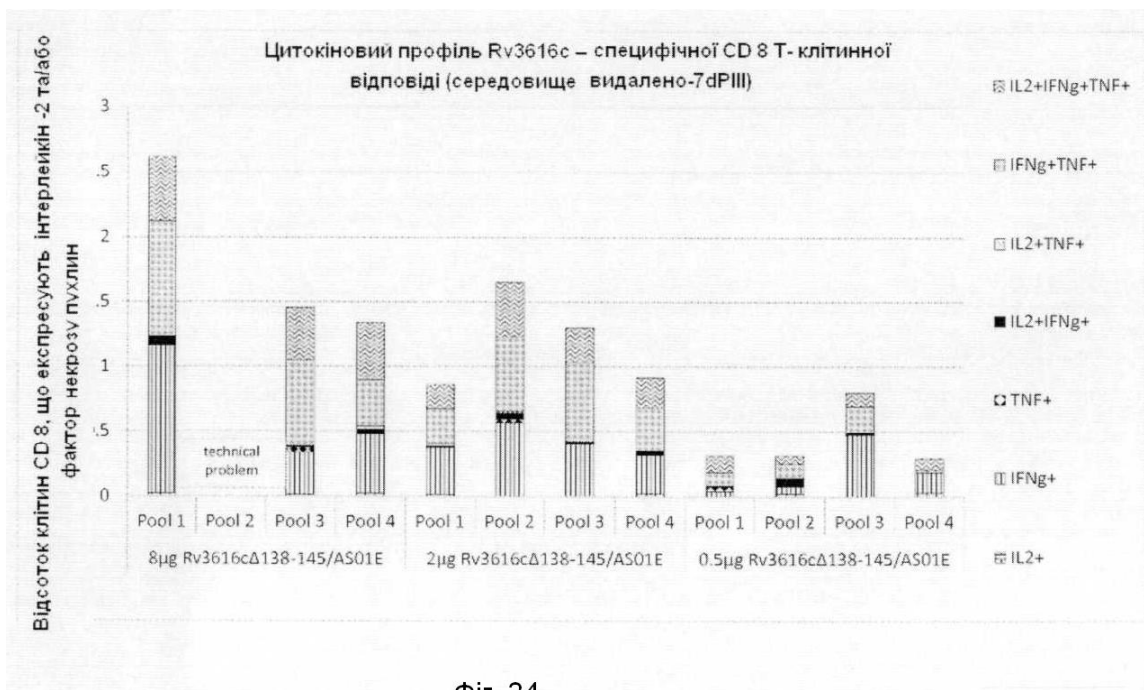


Fig. 24

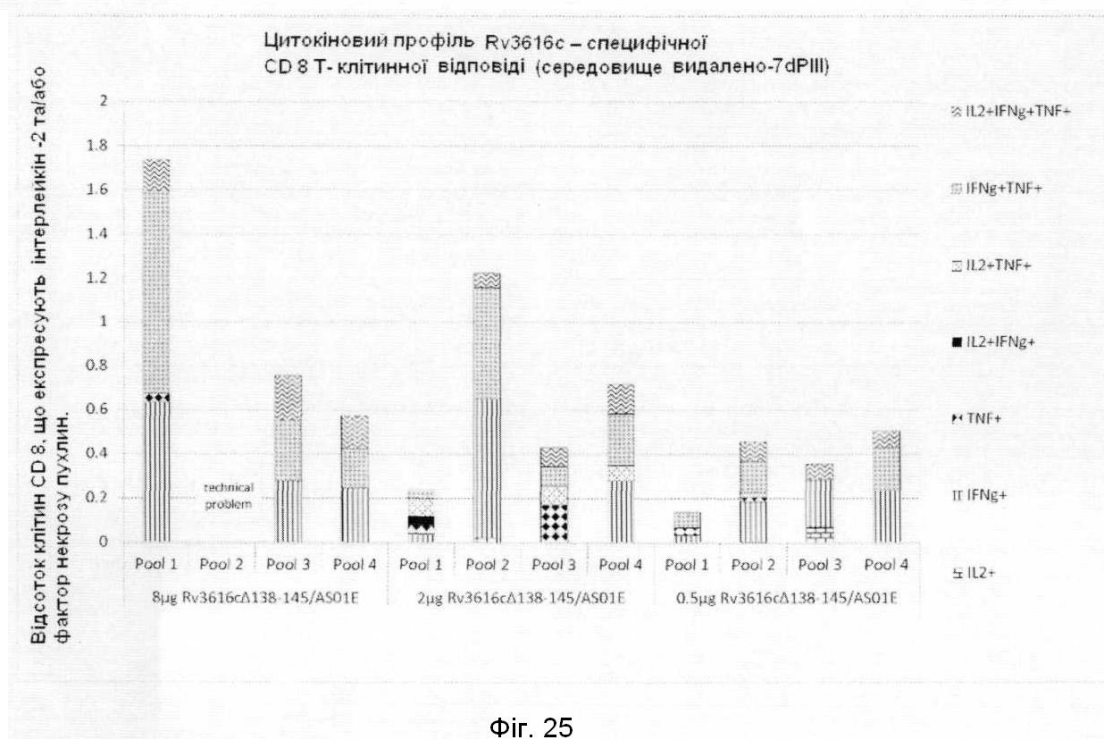


Fig. 25

Комп'ютерна верстка О. Рябо

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601