



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 110118

(13) C2

(51) МПК

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 06355	(72) Винахідник(и):	Годарт Стефан Андре Георгес (BE), Ланан Аміна (BE), Лемоін Домінік Інґрід (BE)
(22) Дата подання заявки:	14.12.2011	(73) Власник(и):	ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium (BE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.11.2015	(74) Представник:	Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/422,723	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 6869607 B1, 22.03.2005
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	14.12.2010		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.09.2013, Бюл.№ 17		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.11.2015, Бюл.№ 22		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2011/072816, 14.12.2011		

(54) МІКОБАКТЕРІАЛЬНА АНТИГЕННА КОМПОЗИЦІЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується імуногенної композиції, яка містить антиген, споріднений з M72, де антиген, споріднений з M72, включає послідовність, що має принаймні 90 % ідентичності з послідовністю SEQ ID NO: 1, та рН вказаної композиції лежить в інтервалі від 7,0 до 9,0, а електропровідність композиції складає 5 мСм/см або менше.

UA 110118 C2

Заявлений винахід стосується імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком M72 та мають низьку іонну силу. Також заявлений винахід стосується таких імуногенних композицій, що додатково містять один або декілька імуностимуляторів. Також передбачені способи отримання таких імуногенних композицій та пов'язаних з ними наборів.

5 Туберкульоз (ТВ) є хронічною інфекційною хворобою, спричиненою інфекцією *Mycobacterium tuberculosis* та іншими видами *Mycobacterium*. Він є важливою хворобою в країнах, що розвиваються, а також стає все більш серйозною проблемою у розвинених районах світу. Вважається, що більш, ніж два мільярди людей є інфікованими туберкульозною бацилою разом зі щорічною появою приблизно 9.4 мільйонів нових випадків захворювання на туберкульоз та 1.7 мільйонів випадків смерті через цю хворобу. У 10 % цих інфікованих туберкульозною бацилою осіб буде розвиватися активний туберкульоз та кожна особа з цією активною формою інфікує в середньому 10-15 інших осіб протягом року. У той час, як річні показники захворюваності в усьому світі досягли свого піку, кількість смертей та випадків захворювання продовжує зростати у зв'язку зі зростанням чисельності населення (Всесвітня організація охорони здоров'я; Tuberculosis Facts 2010).

Білкові антигени Mtb72f та M72 (описані, наприклад, у міжнародній патентній заявці WO2006/117240) або їх фрагменти або похідні є білковими антигенами, потенційно корисними для лікування або запобігання туберкульозу.

Отримання білкових антигенів є надзвичайно важливим для забезпечення підтримання імуногенності. Іноді імуностимулятори застосовують для посилення зростання імунної відповіді до будь-якого вибраного антигену. Однак, включення ад'ювантів до імуногенної композиції підвищує складність отримання компонентів, а також складність отримання та розповсюдження композиції. Отримання кожного з ад'ювантних компонентів, а також антигенного компоненту повинно бути розглянуто виробниками. Зокрема, повинна бути розглянута сумісність антигенного компоненту з ад'ювантним компонентом, особливо у випадках, коли ліофілізовані антигени або антигенні препарати призначені для відновлення з ад'ювантним препаратом. У таких обставинах важливо, щоб буфер ад'ювантного препарату був прийнятним для антигену та щоб ад'ювант не впливав на імуногенність або розчинність антигену.

Винахідники спочатку визначили, що антигени, споріднені з білком M72 є особливо чутливими до наявності солей. Не обмежуючись теоретичним матеріалом, вважається, що антигени, споріднені з білком M72 зазнають негативного впливу певного явища, відомого як "висолювання", яке може бути визначено у вигляді осідання білку зі свого розчину шляхом взаємодії з солями, як-то з хлоридом натрію. Винахідники відкрили, що ці антигени утворюють агрегати та осаджуються при концентрації хлориду натрію, що є не меншою, ніж 150 мМ. Отже, стійкість імуногенних композицій, що містять антигени, споріднені з білком M72 може несподівано бути збільшеною шляхом зменшення концентрації хлориду натрію.

Відповідно, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком M72, де провідність композиції дорівнює 13 мСм/см або менше.

На додачу до цього передбачено імуногенну композицію, що містить антиген, споріднений з білком M72, де концентрація солей у вказаній композиції дорівнює 130 мМ або менше.

Заявлений винахід також стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком M72, де концентрація хлориду натрію у вказаній композиції дорівнює 130 мМ або менше.

Стислий опис креслення.

Фіг. 1. Крива літичної активності QS21.

Фіг. 2. Відсоток кожного конгенера 3D-MPL у різних препаратах ASA.

Фіг.3. DLS імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 4. Нефелометрія імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 5. Антигенна стійкість імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl, виміряна після зберігання.

Фіг. 6a-6d. Ексклюзійний ВЕРХ - аналіз імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 7. Антигенність імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 8. Провідність стандартних розчинів NaCl.

Фіг. 9. Викликання CD4 Т-клітинних відповідей у мишей з застосуванням імуногенних композицій винаходу.

Фіг. 10. Викликання CD8 Т-клітинних відповідей у мишей з застосуванням імуногенних композицій винаходу.

Фіг. 11. Нефелометрія імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 12. DLS імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 13. Антигенність імуногенних композицій з різними концентраціями NaCl після зберігання.

Стислий опис ідентифікаційних номерів послідовностей.

SEQ ID No: 1 Амінокислотна послідовність білка M72.

SEQ ID No: 2 Нуклеотидна послідовність, що кодує білок M72.

SEQ ID No: 3 Амінокислотна послідовність білка M72 з двома N-кінцевими His - залишками.

SEQ ID No: 4 Нуклеотидна послідовність, що кодує M72 білок з двома N-кінцевими His - залишками.

SEQ ID No: 5 Амінокислотна послідовність білка Mtb72f.

SEQ ID No: 6 Нуклеотидна послідовність, що кодує білок Mtb72f.

SEQ ID No: 7 Амінокислотна послідовність білка Mtb72f з шістьма N-кінцевими His - залишками.

SEQ ID No: 8 Нуклеотидна послідовність, що кодує білок Mtb72f з шістьма N-кінцевими His - залишками.

SEQ ID No: 9 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 1 (CpG 1826).

SEQ ID No: 10 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 2 (CpG 1758).

SEQ ID No: 11. Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 3.

SEQ ID No: 12 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 4 (CpG 2006).

SEQ ID No: 13 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 5 (CpG 1686).

У першому аспекті, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком M72, де провідність композиції дорівнює 13 мСм/см або менше. Зокрема, заявленим винаходом передбачені імуногенні композиції, що містять антиген, споріднений з білком M72, де провідність імуногенної композиції дорівнює 12 мСм/см або менше, наприклад 10 мСм/см або менше, 8 мСм/см або менше, 6 мСм/см або менше, 5 мСм/см або менше, 4 мСм/см або менше або 3 мСм/см або менше. У окремому втіленні, провідність імуногенної композиції дорівнює 2.5 мСм/см або менше, як-то 2.25 мСм/см або менше або 2.0 мСм/см або менше. У додатковому особливому втіленні, провідність імуногенної композиції дорівнює 1.5-2.5 мСм/см.

У другому аспекті, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком M72, де концентрація солей у вказаній композиції дорівнює 130 мМ або менше. Зокрема, заявленим винаходом передбачені імуногенні композиції, що містять антиген, споріднений з білком M72, де концентрація солей у вказаній композиції дорівнює 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація солей у вказаній композиції дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше або 25 мМ або менше. У додатковому особливому втіленні, концентрація солей у вказаній композиції дорівнює 20-40 мМ, як-то 25-35 мМ.

У третьому аспекті, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком M72, де концентрація хлориду натрію дорівнює 130 мМ або менше. Зокрема, заявленим винаходом передбачені імуногенні композиції, що містять антиген, споріднений з білком, де концентрація хлориду натрію дорівнює 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше, 40 мМ або менше, 30 мМ або менше, 20 мМ або менше або 15 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація хлориду натрію у імуногенній композиції дорівнює 10 мМ або менше, як-то 7.5 мМ або менше. Відповідно, концентрація хлориду натрію у імуногенній композиції може або дорівнювати або бути нижчою, ніж 5 мМ. У додатковому окремому втіленні, імуногенна композиція є істотно вільною від хлориду натрію. Під "істотно вільною" мається на увазі, що концентрація хлориду натрію дорівнює або дуже наближується до 0 мМ (як-то 3 мМ або менше, 2 мМ або менше або 1 мМ або менше).

Відповідно, концентрація CaCl_2 у імуногенній композиції може дорівнювати 40 мМ або менше, 30 мМ або менше, 20 мМ або менше, 15 мМ або менше або 10 мМ або менше.

Відповідно, концентрація MgSO_4 у імуногенній композиції може дорівнювати 80 мМ або менше, 60 мМ або менше, 40 мМ або менше, 30 мМ або менше, 20 мМ або менше або 10 мМ або менше.

Відповідно, загальна концентрація іонів NH_4^+ , Mg^{2+} та Ca^{2+} у імуногенній композиції може дорівнювати 80 мМ або менше, 60 мМ або менше, 40 мМ або менше, 30 мМ або менше, 20 мМ або менше або 10 мМ або менше.

Імуногенні композиції винаходу знаходяться у вигляді водних препаратів.

Провідність імуногенної композиції винаходу можна виміряти з застосуванням відомих у цій галузі технічних засобів, наприклад, за допомогою спеціальних датчиків вимірювання провідності або інших інструментів, здатних вимірювати провідність. Одним таким прийнятним інструментом є прилад Zetasizer Nano ZS від Malvern Instruments (UK).

Досвідчений фахівець може легко здійснити перевірку концентрацій натрій (Na^+) та хлорид (Cl^-) іонів за допомогою відомих способів та наборів. Наприклад, натрій можна визначити за допомогою набору Sodium Enzymatic Assay Kit (Catalogue Number: BQ011EAEL) від Biosupply. Хлорид - іони можна визначити за допомогою набору Chloride Enzymatic Assay Kit (Catalogue Number: BQ006EAEL) від Biosupply.

Mycobacterium tuberculosis заражає людей через дихальні шляхи. Альвеолярні макрофаги поглинають ці бактерії, але вони здатні виживати та розмножуватися шляхом інгібування злиття фагосоми з кислими лізосомами. Комплексна імунна відповідь охоплює CD4^+ та CD8^+ Т - клітинні відповіді, що в кінцевому рахунку ведуть до утворення гранульоми. Головним успіхом *Mycobacterium tuberculosis*, як патогену, є той факт, що ізолювана, але не знищена бактерія може зберігатися протягом тривалих періодів часу, залишаючи особу уразливою для подальшого розвитку активного туберкульозу.

У менш, ніж 5 % інфікованих осіб спостерігається розвиток активної форми туберкульозу у перші роки після зараження. Гранульома може зберігатися протягом десятиліть та, як вважається, вона містить живі бактерії *Mycobacterium tuberculosis* у стані спокою, позбавлені кисню та поживних речовин. Однак, нещодавно було припущено, що більшість бактерій у стані спокою знаходяться у розповсюджених по тілу відмінних від макрофагів типах клітин (Locht et al, Expert Opin. Biol. Ther. 2007 7(11):1665-1677). Розвиток активного ТВ виникає при змінненні балансу між природним імунітетом хазяїна та патогеном, наприклад, в результаті імуносупресивної події (Anderson P Trends in Microbiology 2007 15(1):7-13; Ehlers S Infection 2009 37(2):87-95).

Динамічна гіпотеза, що описує баланс між латентною та активною формами ТВ також запропонована у (Cardana P-J Inflammation & Allergy - Drug Targets 2006 6:27-39; Cardana P-J Infection 2009 37(2):80-86).

Хоча впродовж тривалого періоду часу ця інфекція може протікати безсимптомно, активна форма захворювання найчастіше проявляється у вигляді гострого запалення легенів, що призводить до втоми, втрати ваги, лихоманці та кашлю. При відсутності лікування, звичайними результатами є серйозні ускладнення та смерть.

Туберкульоз звичайно можна контролювати з застосуванням тривалого антибіотичного лікування, хоча таке лікування не є успішним відносно запобігання поширення захворювання. Особи, що мають активну форму хвороби, тривалий період часу можуть не мати її симптомів, але бути заразними. На додачу, хоча дотримання режиму лікування є критичним фактором, поведінку пацієнта дуже важко перевірити. Деякі пацієнти не повністю проходять курс лікування, що призводить до неефективного лікування та розвитку стійкості до ліків.

Форма туберкульозу, що має стійкість до багатьох ліків (MDR-TB) є такою формою, що не дає відповіді на лікування медичними препаратами першої лінії. Зі всіх щорічних випадків захворювань на туберкульоз, 3 % являють собою випадки MDR-TB, що оцінюється приблизно, як 440,000 нових щорічних випадків захворювання на MDR-TB. Туберкульоз з екстенсивною стійкістю до ліків (XDR-TB) виникає, коли на піці стійкості до медичних препаратів першої лінії розвивається стійкість до медичних препаратів другої лінії. Фактично невилікований XDR-TB був підтверджений у 58 країнах (Всесвітня організація охорони здоров'я Tuberculosis Facts 2010).

Навіть при закінченні повного курсу лікування антибіотиками, інфекція *M. tuberculosis* у заражених осіб може залишатися невикорінною та зберігатися у них у вигляді латентної інфекції, яка знов може перейти у активну фазу. Для контролю поширення туберкульозу, першорядне значення мають ефективна програма вакцинації та точна рання діагностика захворювання.

На даний час, найбільш широко застосованим способом викликання захисного імунітету є вакцинація з живими бактеріями. Найбільш часто для цієї мети застосовують вид *Mycobacterium*, що має назву *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), який є авірулентним штамом *M. bovis*, розроблений вперше більш, ніж 60 років назад. Однак, безпечність та ефективність BCG є джерелом суперечок – разом з забезпеченням захисту проти тяжких проявів хвороби у дітей, BCG не запобігає утворенню латентного ТВ або реактивуванню легеневого захворювання у дорослому віці. На додачу до цього, деякі країни, як-то Сполучені Штати, не вакцинують основну частину населення цим агентом.

Було показано, що деякі білки з сильними рівнями експресії протягом ранніх стадій інфекції *Mycobacterium* надають тваринним моделям вакцинації потужну захисну ефективність. Однак, вакцинація з антигенами, що мають сильні рівні експресії протягом ранніх стадій інфекції може не надати оптимальної імунної відповіді, прийнятної на пізніх стадіях інфекції. Адекватний контроль протягом латентної інфекції може вимагати присутності специфічних до певного антигену Т - клітин, які повинні експресуватися на цьому етапі. У захисті проти реактивування ТВ можуть допомогти вакцини для застосування після зараження, що безпосередньо спрямовані до стійких бактерій у сплячому стані та тим самим підвищують контроль над туберкульозом або навіть дозволяючи викоринити інфекцію. Отже, вакцини, що спрямовані до лікування латентного ТВ можуть значно та економічно скоротити глобальні показники ТВ інфекції.

Субодиничні вакцини на основі антигенів пізньої стадії також можна застосувати у комбінації з антигенами ранньої стадії для отримання мультифазової вакцини. Альтернативно, антигени ранньої та/або пізньої стадії можуть бути застосовані для доповнення та посилення BCG вакцинації (або шляхом бустингу BCG - відповіді або шляхом розвитку удосконалених рекомбінантних штамів BCG).

Білкові антигени Mtb72f та M72 є потенційно корисними для лікування або запобігання туберкульозу. Як було показано, Mtb72f надає захист численним тваринним моделям (див., наприклад: Brandt et al. Infect. Immun. 2004 72(11):6622-6632; Skeiky et al. J. Immunol. 2004 172:7618-7628; Tsenova et al. Infect. Immun. 2006 74(4):2392-2401; Reed et al. PNAS 2009 106(7):2301-2306). Mtb72f також був предметом клінічних досліджень (Von Eschen et al. 2009 Human Vaccines 5(7):475-482). M72 є покращеним антигеном, що має порівняно з Mtb72f одиничну мутацію заміщення серину на аланін, яка приводить до покращених характеристик стійкості. Також була доведена корисність M72 - споріднених антигенів у моделі латентного туберкульозу (міжнародна патентна заявка WO2006/117240).

Як тут застосовано, термін "антиген, споріднений з білком M72" має відношення до білка M72, наведеного у послідовності SEQ ID No: 1 або його імуногенної похідної. Як тут застосовано, термін "похідна" має відношення до антигену, модифікованого відносно референсної послідовності. Імуногенні похідні є істотно подібними до референсної послідовності, зберігаючи імуногенні властивості референсної послідовності та залишаючись здатними забезпечувати зростання імунної відповіді по відношенню до референсної послідовності. Похідна може, наприклад, містити модифіковану версію референсної послідовності або, альтернативно, може складатися з модифікованої версії референсної послідовності.

Антиген, споріднений з білком M72 може, наприклад, містити менш, ніж 1500 амінокислотних залишків, як-то менш, ніж 1200 амінокислотних залишків, зокрема менш, ніж 1000 амінокислотних залишків, головним чином менш, ніж 800 амінокислотних залишків.

Т-клітинними епітопами є короткі суміжні відрізки амінокислот, що впізнаються Т - клітинами (наприклад, Т-клітинами CD4+ або CD8+). Ідентифікацію Т-клітинних епітопів можна здійснити за допомогою відомих досвідченим 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). У неоднаковій неспорідненій популяції, як-то у популяції людей, різні типи HLA означають те, що окремі епітопи можуть не впізнаватися всіма членами цієї популяції. В результаті важливості участі Т-клітинної відповіді на туберкульоз, максимізації рівня впізнавання та шкали імунної відповіді, імуногенна похідна M72 є тим бажаним білком, що містить більшість (або відповідно всі) інтактних Т-клітинних епітопів.

Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що окремі заміни, делеції або доповнення білка M72, що змінюють, доповнюють або зменшують одиничні амінокислотні положення або маленький відсоток амінокислот є "імуногенною похідною", де змінення (одне або декілька) веде до заміщення амінокислоти на функціонально подібну амінокислоту або до заміщення/делеції/додавання залишків, що істотно не впливають на імуногенну функцію.

Також добре відомі таблиці консервативних заміщень, де вказані функціонально подібні амінокислоти. Головним чином, такі консервативні заміщення будуть знаходитися в межах однієї з зазначених нижче амінокислотних груп, хоча у деяких обставинах інші заміщення також можуть бути можливими без істотного впливу на імуногенні властивості антигену. Кожна з наступних восьми груп охоплює амінокислоти, що, як правило, є консервативними заміщеннями одна до іншої:

- 1) аланін (A), гліцин (G);
- 2) аспарагінова кислота (D), глютамінова кислота (E);
- 3) аспарагін (N), глютамін (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); та
- 8) цистеїн (C), метіонін (M)

(див., наприклад, Creighton, Proteins 1984).

Відповідно, такі заміщення не виникають у епітопній ділянці, отже не мають значного впливу на імуногенні властивості антигену.

Також, імуногенні похідні можуть охоплювати такі похідні, де порівняно з референсною послідовністю також вставлені додаткові амінокислоти. Відповідно, подібні вставки не виникають у епітопній ділянці, отже вони не мають значного впливу на імуногенні властивості антигену. Одним прикладом таких вставок є вставка короткого відрізка гістидинових залишків (наприклад, 2-6 залишків) для сприяння експресії та/або очищення досліджуваного антигену.

Також імуногенні похідні можуть охоплювати похідні, де, порівняно з референсною послідовністю, деякі амінокислоти є видаленими. Відповідно, подібні делеції не виникають у епітопній ділянці, отже теж не мають значного впливу на імуногенні властивості антигену.

Досвідченому фахівцю буде зрозуміло, що окремі імуногенні похідні можуть мстити заміщення, делеції та додавання (або будь-яку їх комбінацію).

Терміни "ідентичний" (тотожний) або відсоток "ідентичності" у контексті двох або декількох поліпептидних послідовностей, має відношення до двох або декількох послідовностей або суб-послідовностей, що є однаковими або мають точно визначений відсоток однакових амінокислотних залишків (тобто 70 % ідентичності, вибірково 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % ідентичності у зазначеній ділянці) при порівнянні та вирівнюванні на максимальну відповідність у вікні порівняння або коли зазначену ділянку вимірюють з застосуванням одного з наступних алгоритмів порівняння послідовностей або ручного вирівнювання та візуального огляду. Це визначення також має відношення до комплементу тестової послідовності. Вибірково, ідентичність має місце у ділянці, що має принаймні 250 амінокислот у довжину, як-то 300 амінокислот або 350 амінокислот. Відповідно, порівняння проводять відносно вікна, відповідного повній довжині референсної послідовності (на відміну від похідної послідовності).

Для порівняння послідовностей, одна послідовність виконує функцію референсної послідовності, з якою порівнюють тестову послідовність. При застосуванні алгоритму порівняння послідовностей, тестову та референсну послідовності вводять у комп'ютер та, якщо це необхідно, задають координати субпослідовності та параметри програми алгоритму послідовності. У цьому випадку можуть бути застосовані параметри програми за замовчуванням або альтернативні параметри. Потім, за допомогою алгоритму порівняння послідовностей обчислюють відсоток ідентичностей для тестових послідовностей по відношенню до референсної послідовності на основі параметрів програми.

"Вікно порівняння", як тут застосовано, має відношення до сегменту, у якому послідовність може бути порівняна з референсною послідовністю з такою ж саме кількістю суміжних положень після оптимального вирівнювання двох послідовностей. Способи вирівнювання послідовностей для порівняння є добре відомими. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння можна здійснити, наприклад, за допомогою алгоритму локальної 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 пошуку подібності від Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), за допомогою комп'ютеризованих втілень цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA, та TFASTA у наборі програмного забезпечення Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) або шляхом ручного вирівнювання та візуального огляду. (див., наприклад., Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).

Одним прикладом корисного алгоритму є PILEUP. PILEUP створює багато вирівнювань послідовності з групи споріднених послідовностей з застосуванням прогресивних, попарних вирівнювань, показуючи спорідненість та відсоток тотожності послідовностей. Також, у цьому алгоритмі можна отримати дерево або дендрограму, що показує кластеризовані співвідношення, застосовані для отримання вирівнювання. У PILEUP застосовано спосіб спрощення прогресивного вирівнювання від Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987). Цей застосований спосіб є подібним до описаного у Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989). Програма може вирівняти до 300 послідовностей, де кожна має максимальну довжину у 5,000 нуклеотидів або амінокислот. Багато процедур вирівнювання починається з попарного вирівнювання двох найбільш подібних послідовностей з отриманням кластеру з двох вирівнених

послідовностей. Цей кластер потім знов вирівнюють з наступними найбільш спорідненими послідовностями або кластером вирівняних послідовностей. Два кластера послідовностей вирівнюють шляхом простого розширення попарного вирівнювання двох окремих послідовностей. Кінцевого вирівнювання досягають за допомогою серій прогресивних попарних вирівнювань. Програма рухається шляхом призначення певних послідовностей та їх амінокислотних координат ділянкам порівняння послідовності та шляхом встановлення її параметрів. З застосуванням алгоритму PILEUP, референсну послідовність порівнюють з іншими тестовими послідовностями для визначення відсоткового відношення тотожності послідовності з застосуванням наступних параметрів: відкриття пробілу у послідовності по замовчуванню (3.00), продовження пробілу у послідовності по замовчуванню (0.10) та кінцевих пробілів. PILEUP можна знайти у наборі програмного забезпечення GCG sequence analysis software package, наприклад, версії 7.0 (Devereaux et al., Nuc. Acids Res. 12:387-395 (1984)).

Іншими прикладами прийнятого алгоритму визначення відсотка ідентичності та подібності послідовностей є алгоритми BLAST та BLAST 2.0, описані, відповідно, у Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) та Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Програмне забезпечення для проведення BLAST - аналізу є загальнодоступним від Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information; веб-сайт www.ncbi.nlm.nih.gov/). Цей алгоритм у першу чергу передбачає ідентифікацію пар сегментів з максимальною схожістю (HSP) шляхом ідентифікації коротких слів довжиною W у питомій послідовності, що або співпадають або задовольняють певному позитивно оціненому граничному значенню T при вирівнюванні зі словом тієї ж самої довжини у базі даних послідовностей, де T відноситься до граничного значення сусіднього слова (Altschul et al., supra). Ці початкові співпадиння сусідніх слів діють у якості затравки для початку пошуків більш довгих HSP, що їх містять. Співпадиння слів поширюють у обох напрямках вздовж кожної послідовності для збільшення сукупного рахунка вирівнювання. У сукупних оцінках для нуклеотидних послідовностей застосовують параметри M (заохочувальні бали для пари співпадаючих залишків; завжди > 0) та N (штрафні бали для неспівпадаючих залишків; завжди < 0). Для амінокислотних послідовностей, для обчислення сукупного рахунка застосовують матрицю заміщень. Поширення співпадинь слів у кожному напрямку зупиняють, коли сукупний рахунок вирівнювання знижується на величину x від його максимального досягнутого значення; сукупний рахунок наближається до нульової відмітки або нижче через накопичення одного або декількох негативних балів вирівнювань залишків або досягається кінець будь-якої з послідовностей. Параметри алгоритму BLAST W, T та X визначають чутливість та швидкість вирівнювання. У програмі BLASTN (для нуклеотидних послідовностей) застосовують по замовчуванню довжину слова (W), що дорівнює 11, очікування (E), що дорівнює 10, M=5, N= - 4 та порівняння обох ланцюгів. Для амінокислотних послідовностей, у програмі BLASTP застосовують по замовчуванню довжину слова (W), що дорівнює 3, очікування (E), що дорівнює 10 та матрицю заміщень BLOSUM62 (див. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)), вирівнювання (B) у 50, очікування (E) у 10, M=5, N=- 4 та порівняння обох ланцюгів.

Алгоритм BLAST також здійснює статистичний аналіз подібності між двома послідовностями (див., наприклад, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одним вимірюванням подібності, що передбачено алгоритмом BLAST є найменша сумарна ймовірність (P(N)), що надає ознаку ймовірності, завдяки якій може випадково відбуватися співпадиння між двома нуклеотидними або амінокислотними послідовностями. Наприклад, нуклеїнова кислота вважається подібною до референсної послідовності, якщо найменша сумарна ймовірність у порівнянні тестової нуклеїнової кислоти до референсної нуклеїнової кислоти є меншою, ніж приблизно 0.2, більш переважно меншою, ніж приблизно 0.01 та найбільш переважно меншою, ніж приблизно 0.001.

У кожному разі, імуногенні похідні поліпептидної послідовності будуть мати по суті таку ж саме активність, як і еталонна послідовність. Під "істотно такою саме" активністю мається на увазі принаймні 50 %, відповідно, принаймні 75 % та, головним чином, принаймні 90 % активності референсної послідовності у аналізі повторного стимулювання МПК in vitro або цільної крові зі специфічними антигенами (наприклад, повторного стимулювання протягом періоду, що сягає від декількох годин до двох тижнів, як-то до одного дня, 1 день - 1 тиждень або 1-2 тижня) де активування клітин вимірюють шляхом лімфопроліферації, шляхом дослідження продукування цитокінів у культуральному супернатанті (вимірюють за допомогою ІФА, СВА (тест-система BD Cytometric Bead Array (BD, США) тощо) або характеристичним аналізом Т та В – клітинних відповідей за допомогою внутрішньо- та зовнішньоклітинного фарбування (наприклад, з застосуванням антитіл, специфічних до імунних маркерів як-то CD3,

CD4, CD8, IL2, TNF-альфа, IFN-гамма, CD40L, CD69 тощо) з наступним проточним цитофлуориметричним аналізом. Відповідно, під "істотно такою ж саме активністю" мається на увазі принаймні 50 %, відповідно принаймні 75 % та головним чином принаймні 90 % активності референсної послідовності у Т - клітинній проліферації та/або у аналізі продукування гамма-інтерферону (IFN-гамма).

До окремих похідних білка M72 належать похідні з додатковими His - залишками на N-кінці (наприклад, з двома His - залишками, як наведено у SEQ ID No: 3; або з полігістидиновою міткою з 5 або особливо з 6 His - залишків, що може бути застосована для афінного очищення з іонами нікелю). Білок Mtb72f (SEQ ID No: 5), що містить оригінальний сериновий залишок, змінений в результаті мутації у M72, є додатковою похідною M72, так само, як і білки Mtb72f з додатковими His - залишками на N-кінці (наприклад, два His - залишка; або полігістидинова мітка з 5 або особливо 6 His- залишків, що може бути застосована для афінного очищення з іонами нікелю).

Відповідно антиген, споріднений з білком M72 буде містити, як-то складатися з послідовності, що має принаймні 70 % тотожності до M72, як-то принаймні 80 %, зокрема принаймні 90 %, головним чином принаймні 95 %, наприклад принаймні 99 %, вибірково, антиген, споріднений з білком M72 буде містити, як-то складатися з послідовності, що має принаймні 98 % тотожності до M72.

Типові антигени, споріднені з білком M72 будуть містити, як-то складатися з імуногенних похідних послідовностей SEQ ID No: 1 або 3, що мають невелику кількість делецій, вставок та/або заміщень. Прикладами таких антигенів є антигени, що мають делеції до 5 залишків у 0-5 положеннях, вставки до 5 залишків у 0-5 п'яти положеннях та заміщення до 20 залишків.

Інші імуногенні похідні M72 містять, як-то складаються з фрагмента послідовності SEQ ID No: 1 або 3, що має розмір принаймні 500 амінокислот у довжину, як-то принаймні 600 амінокислот у довжину або принаймні 700 амінокислот у довжину.

Антигени, споріднені з білком M72 можна отримати за допомогою способів, попередньо описаних у WO2006/117240 та наведених у Прикладах або аналогічних їм способів.

Імуногенні композиції також можуть містити один або декілька додаткових антигенних компонентів. Подібні додаткові антигенні компоненти не повинні самі по собі бути чутливими до присутності солей у композиції.

Додаткові антигенні компоненти можуть бути призначеними для зміцнення або доповнення імунних відповідей, викликаних антигеном, спорідненим з білком M72 з метою запобігання та лікування туберкульозу або додаткові антигени можуть бути пов'язаними з іншими патогенами та призначеними для застосування зі спорідненим з M72 антигеном з міркувань зручності. Якщо у препараті є декілька антигенних компонентів, то вони можуть бути надані у вигляді окремих поліпептидів або злитих білків. У деяких випадках, додаткові антигенні компоненти можуть бути надані у вигляді полінуклеотиду (або полінуклеотидів).

Добре відомо, що для парентерального введення розчини повинні мати фармацевтично прийнятну осмоляльність, щоб уникнути клітинної деформації або лізису. Фармацевтично прийнятна осмоляльність головним чином означає те, що розчини повинні мати майже ізотонічну або помірно гіпертонічну осмоляльність. Відповідно, імуногенні композиції заявленого винаходу будуть мати осмоляльність у діапазоні 250-750 мОсм/кг, наприклад, осмоляльність може бути у діапазоні 250-550 мОсм/кг, як-то у діапазоні 280-500 мОсм/кг.

Осмоляльність можна виміряти за допомогою відомих у цій галузі способів, наприклад, шляхом застосування наявного у продажу осмометра, наприклад Advanced® Model 2020 від Advanced Instruments Inc. (USA).

"Ізотонічний агент" є сполукою, яка є фізіологічно толерантною та забезпечує препарат прийнятну тонічність для запобігання виникнення води крізь клітинні мембрани, що контактують з препаратом.

Звичайно, у якості ізотонічного агента застосовують хлорид натрію (NaCl). Винахідники спочатку показали, що антигени, споріднені з білком M72 є особливо чутливими до "висолювання", процесу, у якому білки у розчині агрегують або коагулюють, коли їх розчини містять підвищені концентрації солі. Отже, передбачені альтернативні засоби забезпечення імуногенних композицій винаходу фармацевтично прийнятною осмоляльністю.

У окремому втіленні, передбачені імуногенні композиції, що додатково містять неіонний ізотонічний агент. Неіонний ізотонічний агент для застосування у імуногенній композиції повинен сам по собі бути фармацевтично прийнятним, наприклад, прийнятним для застосування до людини, а також бути сумісним з антигеном, спорідненим з білком M72 та додатково бути сумісним з іншими компонентами, як-то імуностимулятором (імуностимуляторами).

У одному втіленні заявленого винаходу, прийнятними неіонними ізотонічними агентами є полііоли, цукри (зокрема цукроза, фруктоза, декстроза або глюкоза) або амінокислоти, як-то гліцин. У одному втіленні, поліол є цукроспиртом, головним чином, цукроспиртом С3-6. Зразкові цукроспирти охоплюють гліцерин, еритрит, треїт, арабіт, ксиліт, рибіт, сорбіт, маніт, дульцит та ідіт. У особливому прикладі цього втілення, прийнятним неіонним ізотонічним агентом є сорбіт. Досвідченому фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що відповідна осмоляльність може бути досягнута за рахунок застосування суміші різних тонізуючих агентів. У окремому втіленні винаходу, неіонний тонізуючий агент композицій винаходу містить цукрозу та/або сорбіт.

У одному втіленні, прийнятна концентрація полііолу у імуногенній композиції знаходиться у діапазоні біля 2.5-15 % (ваги/обсягу), зокрема у діапазоні біля 2.5-10 % (ваги/обсягу), наприклад, у діапазоні біля 3-7 % (ваги/обсягу), як-то у діапазоні біля 4-6 % (ваги/обсягу). У особливому прикладі цього втілення, поліол є сорбітом.

У іншому втіленні, імуногенна композиція містить цукрозу та сорбіт. У такому разі, імуногенна композиція може відповідно містити цукрозу у діапазоні біля 2.5-15 % (ваги/обсягу) та сорбіт у діапазоні біля 2.5-15 % (ваги/обсягу), зокрема цукрозу у діапазоні біля 2.5-10 % (ваги/обсягу) та сорбіт у діапазоні біля 2.5-10 % (ваги/обсягу), наприклад, цукрозу у діапазоні біля 3-7 % (ваги/обсягу) та сорбіт у діапазоні біля 3-7 % (ваги/обсягу), як-то цукрозу у діапазоні біля 4-6 % (ваги/обсягу) та сорбіт у діапазоні біля 4-6 % (ваги/обсягу).

pH імуногенних композицій повинен мати прийнятне для парентерального введення значення. Звичайно pH знаходиться у діапазоні 6.0-9.0. Відповідно, pH може бути у діапазоні 7.0-9.0, головним чином 7.25-8.75, як-то 7.5-8.5, зокрема 7.75-8.25. Окремий інтерес являють собою значення pH у діапазоні біля 8.0. Значення pH можна контролювати шляхом застосування буферів, в тому числі, наприклад, Tris або фосфатних буферів.

У окремому втіленні винаходу, імуногенна композиція містить один або декілька імуностимуляторів.

У одному втіленні, імуностимулятор може бути сапоніном. Особливо прийнятним сапоніном для застосування у заявленому винаході є Quil A та його похідні. Quil A є сапоніновим препаратом, виділеним з південноамериканського дерева *Quillaja saponaria* Molina та був вперше описаний у Dalsgaard et al. in 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254), як сполука, що має ад'ювантну активність. Очищені фракції Quil, наприклад, фракції QS7 та QS21 (також відомі, як QA7 та QA21), виділені за допомогою ВЕРХ (HPLC)-хроматографії зберігають ад'ювантну активність без токсичності, пов'язаної з Quil (WO88/09336). QS21 є природним сапоніном, отриманим з кори дерева *Quillaja saponaria* Molina, що викликає відповідь CD8+ цитотоксичних Т-клітин (CTL), клітин Th1 та предомінантних антитіл IgG2a. У контексті заявленого винаходу, бажаним сапоніном є QS21.

У відповідному варіанті заявленого винаходу, сапоніновий ад'ювант у складі імуногенної композиції є похідною Quil A від *saponaria* Molina, зокрема він є імунологічно активною фракцією Quil A, як-то QS17 або QS21, відповідно QS21.

Бажано, щоб QS21 був наданий у менш реактогенній композиції, де він є "згашеним" екзогенним стеролом, наприклад, холестерином. Існують також деякі окремі форми менш реактогенних композицій, де QS21 є "згашеним" холестерином. У особливому втіленні, сапонін / стерол знаходиться у вигляді ліпосомної структури (як-то, наприклад, описано у WO96/33739, Приклад 1). У цьому втіленні, ліпосоми, відповідно, містять нейтральний ліпід, наприклад, фосфатидилхолін, який при кімнатній температурі є, відповідно, некристалічним, наприклад, фосфатидилхолін яєчного жовтка, діолеойл фосфатидилхолін (DOPC) або дилаурил фосфатидилхолін. Також ліпосоми можуть містити заряджений ліпід, що підвищує стійкість структури ліпосоми - QS21 для ліпосом, що складаються з насичених ліпідів. У цих випадках кількість зарядженого ліпиду дорівнює відповідно 1-20 % (у ваговому співвідношенні), як-то 5-10 %. Співвідношення стерол/фосфоліпід сягає 1-50 % (у молярному співвідношенні), відповідно 20-25 %.

Прийнятні стероли охоплюють β -ситостерол, стигмастерин, ергостерол, ергокальциферол та холестерин. У одному окремому втіленні, імуногенна композиція містить холестерин. Ці стероли є добре відомими, наприклад, холестерин описаний у Merck Index, 11th Edn., стор. 341, як стерол, що природно існує у тваринному жирі.

Коли активною сапоніновою фракцією є QS21, то співвідношення QS21:стерол звичайно буде сягати порядку 1:100-1:1 (у ваговому співвідношенні), відповідно 1:10-1:1 (у ваговому співвідношенні) та головним чином, 1:5-1:1 (у ваговому співвідношенні). Відповідно, якщо існує надлишок стеролу, то співвідношення QS21:стерол буде дорівнювати принаймні 1:2 (у ваговому

співвідношенні). У одному втіленні, співвідношення QS21: стерол дорівнює 1:5 (у ваговому співвідношенні). Відповідно, стерол є холестериним.

У іншому втіленні, імуногенна композиція містить імуностимулятор, який є агоністом Тол-подібного рецептора 4 (TLR4). Під "агоністом TLR" мається на увазі компонент, здатний викликати сигнальну відповідь через сигнальний шлях TLR або у якості безпосереднього ліганду або небезпосередньо шляхом генерації ендogenous або екзогенного ліганду (Sabroe et al., J Immunol 2003 p1630-5). Агоніст TLR4 є здатним викликати сигнальну відповідь через сигнальний шлях TLR-4. Прийнятним прикладом агоністу TLR4 є ліпополісахарид, відповідно нетоксична похідна А - ліпиду, особливо монофосфорил - ліпід або більш особливо 3-де-О-ацильований монофосфорил - ліпід (3D-MPL).

3D-MPL є у продажу від GlaxoSmithKline Biologicals N.A. під назвою MPL та позначений у документі, як MPL або 3D-MPL див., наприклад, US Patent Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 та 4,912,094. В першу чергу, 3D-MPL сприяє розвитку CD4+ Т-клітинних відповідей з IFN-гамма (Th1) фенотипом. 3D-MPL можна отримати за допомогою способів, описаних у GB2220211A. Хімічний склад 3D-MPL являє собою суміш 3-де-О-ацильованого монофосфорил-ліпиду з 3, 4, 5 або 6 ацильованими ланцюгами. У композиціях заявленого винаходу для отримання імуногенної композиції можуть бути застосовані маленькі частинки 3D-MPL, що повинні мати розмір, прийнятний для стерильної фільтрації крізь 0.22 мкм фільтр. Препарати таких частинок описані у WO94/21292. Відповідно, 3D-MPL у порошковому стані застосовують для отримання імуногенних композицій заявленого винаходу.

Іншими прийнятними для застосування агоністами TLR4 є алкіл глюкозамінід фосфати (AGP), наприклад, описані у WO98/50399 або у US Patent No. 6,303,347 (разом з описом способів їх отримання), відповідно як RC527 або RC529 або фармацевтично прийнятні солі AGP, наведені у US Patent No. 6,764,840. Деякі AGP є агоністами TLR4, а деякі з них є антагоністами TLR4.

Інші прийнятні агоністи TLR4 описані у WO2003/011223 та WO2003/099195, як-то Сполука I, Сполука II та Сполука III, що наведені на сторінках 4-5 у WO2003/011223 або на сторінках 3-4 у WO2003/099195. Зокрема, ці сполуки також наведені у WO2003/011223 під назвами ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057m ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 та ER804764. Наприклад, одним прийнятним агоністом TLR-4 є ER804057.

У окремому втіленні, імуногенна композиція містить разом сапонін та агоніст TLR4. У специфічному прикладі, імуногенна композиція містить QS21 та 3D-MPL.

Агоніст TLR4, як-то ліпополісахарид, наприклад 3D-MPL, можна застосувати у кількостях 1-100 мкг на дозу імуногенної композиції, що передбачена для застосування до людини. 3D-MPL можна застосувати у кількості біля 50 мкг, наприклад, 40-60 мкг, відповідно 45-55 мкг або 49-51 мкг або 50 мкг. У додатковому втіленні, передбачена для застосування до людини доза імуногенної композиції містить 3D-MPL у кількості біля 25 мкг, наприклад 20-30 мкг, відповідно 21-29 мкг або 22-28 мкг або 23-27 мкг або 24-26 мкг або 25 мкг.

Сапонін, як-то QS21 можна застосувати у кількостях 1-100 мкг на дозу імуногенної композиції, що передбачена для застосування до людини. QS21 можна застосувати у кількості біля 50 мкг, наприклад 40-60 мкг, відповідно 45-55 мкг або 49-51 мкг або 50 мкг. У додатковому втіленні, передбачена для застосування до людини доза імуногенної композиції містить QS21 у кількості біля 25 мкг, наприклад 20-30 мкг, відповідно 21-29 мкг або 22-28 мкг або 23-27 мкг або 24-26 мкг або 25 мкг.

Якщо в імуногенній композиції присутні разом агоніст TLR4 та сапонін, тоді вагове співвідношення агоніста TLR4 до сапоніну знаходиться відповідно у межах 1:5-5:1, відповідно 1:2-2:1, наприклад, приблизно 1:1. Наприклад, якщо 3D-MPL є присутнім у кількості 50 мкг або 25 мкг, тоді відповідно QS21 може також бути присутнім відповідно у кількості 50 мкг або 25 мкг на дозу імуногенної композиції, що передбачена для застосування до людини. Окремі імуногенні композиції заявленого винаходу містять QS21 та 3D-MPL у кількості 1-100 мкг кожного на передбачену для застосування до людини дозу, як-то у кількості 10-75 мкг кожного на передбачену для застосування до людини дозу. Імуногенні композиції заявленого винаходу можуть відповідно містити QS21 та 3D-MPL у кількості 15-35 мкг кожного на передбачену для застосування до людини дозу, як-то у кількості 20-30 мкг кожного на передбачену для застосування до людини дозу.

У одному втіленні, імуностимулятор є агоністом TLR9, наприклад, як наведено у WO2008/142133. У окремому прикладі, вказаний агоніст TLR9 є імуностимуляторним олігонуклеотидом, зокрема олігонуклеотидом, щр містить неметильовану характерну послідовність CpG. Подібні олігонуклеотиди є добре відомими та описані, наприклад, у WO96/025555, WO99/33488 та US5,865,462. Описані тут прийнятні для застосування у

імуногенних композиціях агоністи TLR9 містять олігонуклеотиди CpG та вибірково містять дві або більше динуклеотидних характерних послідовностей CpG, відокремлених принаймні трьома, переважно принаймні шістьма або ще більшою кількістю нуклеотидів. Характерна послідовність CpG являє собою цитозиновий нуклеотид, за яким знаходиться гуаніновий нуклеотид.

У одному втіленні, міжнуклеотидний зв'язок у олігонуклеотиді є фосфородитіоатним або, можливо, фосфоротіоатним зв'язком, хоча також можуть бути застосовані фосфодієфірні та інші міжнуклеотидні зв'язки, в тому числі, можуть існувати олігонуклеотиди зі змішаними міжнуклеотидними зв'язками. Способи отримання фосфоротіоатних або фосфородитіоатних олігонуклеотидів описані у US5,666,153, US5,278,302 та WO95/26204. Олігонуклеотиди, що містять різні міжнуклеотидні зв'язки передбачені, наприклад, у вигляді змішаних фосфоротіоатних фосфодієфірів. Також можуть бути застосовані інші міжнуклеотидні зв'язки, що стабілізують олігонуклеотиди.

Приклади прийнятих для включення до складу описаних тут імуногенних композицій CpG - олігонуклеотидів мають наступні послідовності. У одному втіленні, ці послідовності містять фосфоротіоатні модифіковані міжнуклеотидні зв'язки.

OLIGO 1 (SEQ ID No: 9): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID No: 10): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEQ ID No: 11): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID No: 12): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID No: 13): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

Альтернативні CpG - олігонуклеотиди можуть містити вищенаведені послідовності з незначними делеціями або додаваннями.

У одному втіленні, імуностимулятором є токол. Токоли є добре відомими та описані у EP0382271. У окремому втіленні, токол є альфа-токоферолом або його похідною, як-то альфа-токоферолу сукцинат (також відомий, як сукцинат вітаміну E).

Заявлений винахід також передбачає спосіб отримання імуногенної композиції винаходу, що містить наступні етапи:

а. ліофілізації антигену, спорідненого з білком M72; та

б. відновлення ліофілізованого антигену, спорідненого з білком M72 відповідно етапу а) у водному розчині, де провідність розчину дорівнює 13 мСм/см або менше.

У окремих втіленнях, провідність водного розчину дорівнює 12 мСм/см або менше, наприклад 10 мСм/см або менше, 8 мСм/см або менше, 6 мСм/см або менше, 5 мСм/см або менше, 4 мСм/см або менше або 3 мСм/см або менше. У окремому втіленні, провідність водного розчину дорівнює 2.5 мСм/см або менше, як-то 2.25 мСм/см або менше або 2.0 мСм/см або менше.

Відповідно, провідність водного розчину є такою, що при відновленні ліофілізованого антигену отриманий розчин має провідність, що дорівнює 13 мСм/см або менше, як-то 12 мСм/см або менше, наприклад 10 мСм/см або менше, 8 мСм/см або менше, 6 мСм/см або менше, 5 мСм/см або менше, 4 мСм/см або менше або 3 мСм/см або менше. У окремому втіленні, провідність отриманого розчину дорівнює 2.5 мСм/см або менше, як-то 2.25 мСм/см або менше або 2.0 мСм/см або менше.

Додатково передбачено спосіб отримання імуногенної композиції винаходу, що містить наступні етапи:

а. ліофілізації антигену, спорідненого з білком M72; та

б. відновлення ліофілізованого антигену, спорідненого з білком M72 відповідно етапу а) у водному розчині, де концентрація солей у вказаному розчині дорівнює 130 мМ або менше.

У деяких втіленнях, концентрація солей у вказаному водному розчині дорівнює 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація солей у вказаному водному розчині дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше або 25 мМ або менше.

Відповідно, концентрація солей у водному розчині є такою, що при відновленні ліофілізованого антигену отриманий розчин має концентрацію солей, що дорівнює 130 мМ або менше, як-то 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація солей у отриманому розчині дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше або 25 мМ або менше.

На додачу до цього, передбачено спосіб отримання імуногенної композиції винаходу, що містить наступні етапи:

а. ліофілізації антигену, спорідненого з білком M72; та

б. відновлення ліофілізованого антигену, спорідненого з білком M72 відповідно етапу а) у водному розчині, де концентрація хлориду натрію у вказаному розчині дорівнює 130 мМ або менше.

У деяких втіленнях, концентрація хлориду натрію у вказаному водному розчині дорівнює 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація солей у вказаному водному розчині дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше, 20 мМ або менше або 15 мМ або менше. Відповідно, концентрація хлориду натрію у водному розчині є біля або нижче 5 мМ.

Відповідно, концентрація хлориду натрію у водному розчині є такою, що при відновленні ліофілізованого антигену отриманий розчин має концентрацію хлориду натрію, що дорівнює 130 мМ або менше, як-то 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація хлориду натрію у отриманому розчині дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше або 25 мМ або менше.

У одному втіленні, водні розчини етапу б) (наведено вище) містять сапонін та/або агоніст TLR4, наприклад QS21 та/або 3D-MPL. У додатковому втіленні, сапонін та/або агоніст TLR4 знаходяться у ліпосомному препараті. У одному втіленні, водні розчини містять агоніст TLR4 та сапонін у ліпосомному препараті та, як тут описано, неіонний ізотонічний агент, як-то поліол. Зокрема водні розчини можуть містити сорбіт.

Також передбачено набір, що містить:

- а. ліофілізований антиген, споріднений з білком M72; та
- б. водний розчин, де провідність розчину дорівнює 13 мСм/см або менше.

У деяких втіленнях, провідність водного розчину дорівнює 12 мСм/см або менше, наприклад 10 мСм/см або менше, 8 мСм/см або менше, 6 мСм/см або менше, 5 мСм/см або менше, 4 мСм/см або менше або 3 мСм/см або менше. У окремому втіленні, провідність водного розчину дорівнює 2.5 мСм/см або менше, як-то 2.25 мСм/см або менше або 2.0 мСм/см або менше.

Відповідно, провідність водного розчину є такою, що при відновленні ліофілізованого антигену отриманий розчин має провідність у 13 мСм/см або менше, як-то 12 мСм/см або менше, наприклад 10 мСм/см або менше, 8 мСм/см або менше, 6 мСм/см або менше, 5 мСм/см або менше, 4 мСм/см або менше або 3 мСм/см або менше. У окремому втіленні, провідність отриманого розчину дорівнює 2.5 мСм/см або менше, як-то 2.25 мСм/см або менше або 2.0 мСм/см або менше.

На додачу до цього передбачено набір, що містить:

- а. ліофілізований антиген, споріднений з білком M72; та
- б. водний розчин, де концентрація солей у вказаному розчині дорівнює 130 мМ або менше.

У деяких втіленнях, концентрація солей у вказаному водному розчині дорівнює 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація солей у вказаному водному розчині дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше або 25 мМ або менше.

Відповідно, концентрація солей у водному розчині є такою, що при відновленні ліофілізованого антигену отриманий розчин має концентрацію солей, що дорівнює 130 мМ або менше, як-то 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація солей у отриманому розчині дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше або 25 мМ або менше.

На додачу до цього передбачено набір, що містить:

- а. ліофілізований антиген, споріднений з білком M72; та
- б. водний розчин, де концентрація солей у вказаному розчині дорівнює 130 мМ або менше.

У деяких втіленнях, концентрація хлориду натрію у вказаному водному розчині дорівнює 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому втіленні, концентрація солей у вказаному водному розчині дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше, 20 мМ або менше або 15 мМ або менше. Відповідно, концентрація хлориду натрію у розчині дорівнює приблизно 5 мМ або нижче.

Відповідно, концентрація хлориду натрію у водному розчині є такою, що при відновленні ліофілізованого антигену отриманий розчин має концентрацію хлориду натрію, що дорівнює 130 мМ або менше, як-то 100 мМ або менше, наприклад 90 мМ або менше, 80 мМ або менше, 70 мМ або менше, 60 мМ або менше, 50 мМ або менше або 40 мМ або менше. У окремому

втіленні, концентрація хлориду натрію у отриманому розчині дорівнює 35 мМ або менше, як-то 30 мМ або менше або 25 мМ або менше.

Набори можуть бути адаптовані для надання одиничної дози імуногенної композиції, як-то одиничної дози, передбаченої для застосування до людини або декількох доз імуногенної композиції.

Водні розчини, застосовані у наборах винаходу можуть бути будь-якими визначеними тут водними розчинами. У особливому втіленні винаходу, водний розчин містить агоніст TLR4 та/або сапонін у формі ліпосом. У окремому втіленні, агоніст TLR4 є 3D-MPL та сапонін є QS21. Застосовані тут водні розчини можуть містити ізотонічний агент, наприклад поліол, як-то сорбіт.

Відносно вищевказаних наборів та способів отримання імуногенних композицій винаходу слід зазначити, що імуностимулятор(и) та ізотонічний агент (агенти), якщо вони присутні, можуть бути спільно ліофілізованими з антигеном або, якщо це бажано, знаходитися у водному розчині. Водний розчин може бути простою водою для ін'єкцій та всі інші компоненти імуногенної композиції можуть бути спільно ліофілізованими з антигеном. Звичайно, принаймні деякі імуностимулятор(и) та ізотонічний агент (агенти) надаються у водному розчині, що є особливо прийнятним у разі, коли певні компоненти є погано сумісними з ліофілізацією, як-то ліпосоми. У одному втіленні, водний розчин містить імуностимулятор. У другому втіленні, водний розчин містить ізотонічний агент, наприклад, неіонний ізотонічний агент, як-то поліол, зокрема сорбіт. У третьому втіленні, водний розчин містить імуностимулятор та ізотонічний агент, як-то поліол, зокрема сорбіт.

Також набори можуть додатково містити інструкції по відновленню ліофілізованого спорідненого з білком M72 антигену з застосуванням водного розчину.

Імуногенні композиції відповідно до винаходу можуть бути застосовані у медицині, зокрема для профілактики, лікування або послаблення мікобактеріальних інфекцій, як-то інфекцій, спричинених *Mycobacterium tuberculosis*. Головним чином, імуногенні композиції будуть надаватися для застосування до людини, хоча передбачається, що вони також можуть бути прийнятними у ветеринарній медицині, наприклад, у лікуванні корів.

Також передбачено застосування імуногенної композиції відповідно до винаходу у виробництві ліків, зокрема ліків для профілактики, лікування або послаблення мікобактеріальних інфекцій, як-то інфекцій, спричинених *Mycobacterium tuberculosis*.

Також передбачено спосіб профілактики, лікування або послаблення мікобактеріальних інфекцій, як-то інфекцій, спричинених *Mycobacterium tuberculosis*, що полягає у застосуванні безпечної та ефективної кількості імуногенної композиції відповідно до заявленого винаходу.

Імуногенна композиція може бути надана з метою:

- лікування активного туберкульозу;
 - профілактики активного туберкульозу, як-то шляхом введення неінфікованому суб'єкту або, альтернативно, суб'єкту, що має інфекцію у латентній формі;
 - лікування латентного туберкульозу;
 - профілактики латентного туберкульозу, як-то шляхом введення неінфікованому суб'єкту;
- або
- запобігання або затримання реактивування туберкульозу, головним чином затримання реактивування туберкульозу, наприклад, строком на декілька місяців, років або навіть на невизначений час.

Термін "активна інфекція" має відношення до інфекції, наприклад, інфекції, спричиненої *M. tuberculosis*, що триває з проявленням її симптомів та/або уражень, відповідно, з проявленням симптомів хвороби.

Терміни "неактивна інфекція", "спляча інфекція" або "латентна інфекція" має відношення до інфекції, наприклад, інфекції *M. tuberculosis*, що триває без проявлення її симптомів та/або уражень, відповідно проявлення симптомів хвороби. Суб'єкт з латентною інфекцією, відповідно, буде тест-позитивним відносно цієї інфекції, наприклад, мати позитивний тест на туберкульоз за допомогою PPD-тестування або на основі дослідження Т-клітин, але у нього не будуть виникати симптоми хвороби та/або ураження, пов'язані з активною формою інфекції.

Термін "первинний туберкульоз" має відношення до клінічного захворювання, наприклад, проявлення симптомів хвороби безпосередньо після зараження, наприклад, спричиненого *M. tuberculosis*. Див., Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005).

Терміни "вторинний туберкульоз" або "післяпервинний туберкульоз" має відношення до реактивування сплячої, неактивної або латентної інфекції, наприклад, інфекції, спричиненої *M. tuberculosis*. Див., Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005).

Термін “реактивування туберкульозу” має відношення до пізнього проявлення симптомів хвороби у тест-позитивної на цю інфекцію особи (наприклад, за допомогою туберкулінової шкірної проби, відповідно на основі аналізу Т-клітин *in vitro*), що досі не мала цих відповідних симптомів. Відповідно, ця особа не буде знову зазнавати реактивування інфекції. Позитивний

діагностичний тест свідчить про те, що особа є інфікованою, однак, вона може мати або може й не мати симптомів активної форми хвороби, що попередньо проявляються та можуть бути піддані успішному лікуванню для переходу туберкульозу у неактивний або латентний стан.

Відповідно, імуногенну композицію вводять суб'єкту, який є неінфікованим або має латентну мікобактеріальну інфекцію, як-то інфекція, спричинена *Mycobacterium tuberculosis*.

Обсяг застосованої імуногенної композиції може змінюватися у залежності від ряду інших факторів, як-то від певного шляху доставки, наприклад, внутрішньом'язового, підшкірного або внутрішньошкірного. Звичайно, обсяг препарату, що вводять у вигляді одиничної ін'єкції (разової дози) для людини знаходиться у діапазоні 50 мкл - 1 мл, як-то 100-750 мкл, головним чином 400-600 мкл, наприклад, біля 500 мкл.

Кількість антигену, спорідненого з білком M72, що знаходиться у одиничній дозі залежить від клінічних потреб, але одинична доза, передбачена для застосування до людини буде звичайно знаходитися у діапазоні 1-100 мкг, як-то 5-50 мкг, наприклад, 5-20 мкг. Одинична доза, передбачена для застосування до людини може містити біля 10 мкг антигену, спорідненого з білком M72.

Відповідно, композиції винаходу вважаються стійкими, якщо їх антигенність, виміряна за допомогою описаних тут способів після зберігання протягом 24 годин при 25 °C дорівнює принаймні 80 % від антигенності, виміряної перед зберіганням. Бажано, щоб антигенність залишалася на рівні принаймні 85 %, як-то принаймні 90 % та зокрема принаймні 95 % після зберігання протягом 24 годин при 25 °C. Для певних інтересуючих композицій цей показник дорівнює принаймні 80 % антигенності, як-то принаймні 85 %, принаймні 90 % та головним чином принаймні 95 % антигенності, що залишається після зберігання протягом 24 годин при 30 °C.

Далі заявлений винахід буде додатково описано за допомогою наступних необмежених прикладів.

Приклади.

Приклад 1: отримання ад'ювантної композиції ASA (сорбіт).

З застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента, у ліпосомному препараті була отримана ад'ювантна композиція, що містила 3-де-О-ацильований монофосфорил - ліпід А та QS21. Цю композицію отримали наступним чином:

А. спосіб отримання ліпосом:

Суміш ліпиду (DOPC), холестерину та 3-де-О-ацильованого монофосфорил - ліпиду А у органічному розчиннику піддали вакуумній сушці, після чого додали водний розчин (сольовий розчин, буферизований за допомогою фосфатного буферу [100 mM NaCl, 50 mM фосфату, pH 6.1]) та посудину збовтували до повного суспендування всіх ліпідів. Потім цю суспензію попередньо гомогенізували у змішувачі з високим зрушенням, після чого її гомогенізували під високим тиском до зменшення розмірів ліпосом до приблизно 90 нм ± 10 нм (виміряно за допомогою способу динамічного розсіювання світла (DLS). Далі ліпосоми піддали стерильній фільтрації.

В. отримання ASA:

Для розведення концентрованих ліпосом, десятиразово розбавлений 100 mM Na₂/K фосфатний буфер (pH 6.1) та 1.5 M NaCl додали до води для ін'єкцій до досягнення концентрацій фосфатного буферу та NaCl у кінцевому препараті у 10 mM та 150 mM відповідно. Потім до розчину додали 30 % (ваги/обсягу) розчин сорбіту у воді для ін'єкцій (WFI) до досягнення концентрації 4.7 % у кінцевому препараті, після чого розчин перемішували протягом 15-45 хв. при кімнатній температурі. Потім до суміші додали концентровані ліпосоми (отримані з DOPC, холестерину та 3D-MPL з концентраціями 40 мг/мл, 10 мг/мл та 2 мг/мл відповідно) до досягнення 100 мкг/мл концентрації 3D-MPL у кінцевому препараті, після чого суміш перемішували протягом 15-45 хв. при кімнатній температурі. Потім, за допомогою перистальтичної помпи до розведених ліпосом додали QS21 у сипучому стані з перемішуванням протягом 15-45 хв. за допомогою магнітної мішалки до досягнення концентрації у 100 мкг/мл у кінцевому препараті. Остаточний препарат ASA (сорбіт) містив 2 мг DOPC, 500 мкг холестерину, 100 мкг/мл 3D-MPL, 100 мкг/мл QS21, 4.7 % сорбіту, 5 mM NaCl та 10 mM фосфату. Значення pH, як було перевірено, дорівнювало 6.1±0.1.

Стерильну фільтрацію отриманого продукту здійснили за допомогою фільтру з поліефірсульфону (PES) від PALL Corporation, після чого отриману ад'ювантну композицію, що

містила 3-де-О-ацильований MPL та QS21 у ліпосомному препараті та сорбіт у якості ізотонічного агента (позначену, як ASA (сорбіт)), зберігали при 4 °C.

Приклад 2: отримання ад'ювантної композиції ASA (150 mM NaCl).

З застосуванням NaCl у якості ізотонічного агента, у ліпосомному препараті була отримана ад'ювантна композиція, що містила 3-де-О-ацильований монофосфорил - ліпід A та QS21. Цю композицію отримали наступним чином:

A. спосіб отримання ліпосом:

Суміш ліпиду (DOPC), холестерину та 3-де-О-ацильованого монофосфорил - ліпиду (3D-MPL) у органічному розчиннику піддали вакуумній сушці, після чого додали водний розчин (сольовий розчин, буферизований за допомогою фосфатного буферу [100 mM NaCl, 50 mM фосфату, pH 6.1]) та посудину збовтували до повного суспендування всіх ліпідів. Потім цю суспензію попередньо гомогенізували у змішувачі з високим зрушенням, після чого її гомогенізували під високим тиском до зменшення розмірів ліпосом до приблизно 90 нм \pm 10 нм (виміряно за допомогою способу динамічного розсіювання світла (DLS)). Далі ліпосоми піддали стерильній фільтрації за допомогою

0.22 мкм PES (поліетилсульфонові) мембрани.

B. Отримання ASA:

Для розведення концентрованих ліпосом, десятиразово розбавлений 100 mM Na₂/K фосфатний буфер (pH 6.45) та 1.5 M NaCl додали до води для ін'єкцій до відповідного досягнення концентрацій фосфатного буферу та NaCl у кінцевому препараті у 10 mM та 150 mM відповідно. Потім суміш перемішували протягом 5 хв. при кімнатній температурі та додали до неї концентровані ліпосоми (отримані з DOPC, холестерину та 3D-MPL з концентраціями 40 мг/мл, 10 мг/мл та 2 мг/мл відповідно) до досягнення 100 мкг/мл концентрації 3D-MPL у кінцевому препараті, після чого суміш перемішували протягом 5-15 хв. при кімнатній температурі. Потім, до розведених ліпосом додали QS21 у сипучому стані з перемішуванням при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки до досягнення концентрації у 100 мкг/мл у кінцевому препараті. Значення pH, як було перевірено, дорівнювало 6.1 \pm 0.1.

Стерильну фільтрацію отриманого продукту здійснили за допомогою фільтру з поліефірсульфону (PES) від PALL Corporation, після чого отриману композицію ASA (150 mM NaCl), що містила 2 мг DOPC, 500 мкг холестерину, 100 мкг 3-де-О-ацильованого MPL, 100 мкг/мл QS21, з 10 mM фосфату та 150 mM NaCl зберігали при +2 °C - +8 °C.

Приклад 3: Літична активність QS21.

Як відомо, QS21 викликає лізис еритроцитів (RBC). Ад'ювантну композицію ASA (сорбіт), отриману, як наведено у Прикладі 1 піддали перевірці, щоб переконатися у згашуванні літичної активності QS21 таким саме чином, як було спостережено у випадку з еквівалентною ад'ювантною композицією, що містила 150 mM NaCl (ASA (150 mM NaCl)).

Літичну активність QS21 вимірювали шляхом аналізу гемолізу з застосуванням еритроцитів курчат (RBC). Спочатку RBC центрифугували з прискоренням 550 g при 4 °C, супернатант відокремили, а осад обережно ресуспендували у буфері PBS до досягнення початкового обсягу, після чого операцію повторювали до втрати супернатантом червоного кольору (звичайно тричі). Якщо гранули осаду застосовували не одразу після центрифугування, то їх зберігали при 4 °C максимум строком у 3-4 доби (та знову промивали у день застосування) або, при застосуванні в той же день, їх розчиняли у буфері приблизно у 10 разів.

Криву діапазону дози QS21 отримали у ASA буфері (у сольовому або сорбітовому буфері після тестування зразка ASA) випадковим чином. Також були отримані відповідні зразки ад'юванту (що містять 50 мкг або 90 мкг еквіваленту QS21, тобто еквівалент 500 мкл або 900 мкл ASA). Кінцевий обсяг довели до 900 мкл у стандартах та зразках з відповідним буфером (що містили або не містили сорбіт у якості буферу досліджуваного зразку). Завдяки своїй опалесценції, ASA змінює оптичну густину (OD). Отже, були отримані контрольні зразки ASA та значення їх OD відняли від показників OD досліджуваних зразків ASA. Ці контрольні зразки відповідали такому саме обсягу ASA, як і обсяг, що досліджували у зразках, але доведений буфером до 1 мл. До цих контрольних зразків також не додавали жодних кількостей RBC. Потім стандарти та тестові зразки інкубували з RBC (100 мкл розведених RBC додавали до 900 мкл стандартів та зразків) протягом 30 хв. при кімнатній температурі (RT). Далі зразки центрифугували 5 хв. при 900 g., після чого вимірювали оптичну густину при 540 нм.

Визначення літичної активності проводили шляхом перевірки на граничний вміст.

1. Межа визначення (LOD) була позначена, як найменша концентрація QS21, що веде до OD:

- вищої, ніж базовий рівень (OD>0.1)

- приблизно втричі вищої, ніж OD буферу ("0 мкг" QS21)

- у висхідній частині кривої
- визначеної для кожного випробування.

2. Літична активність QS21 у ад'ювантних зразках була визнана позитивною, якщо OD для ад'ювантного зразка була більшою, ніж OD_{LOD}.

5 Приклад кривої QS21.

QS21 (мкг)	OD	Пригнічення літичної активності QS21
0	0.029	NA
0.5	0.052	< LOD
0.6	0.073	< LOD
0.7	0.091	< LOD
0.8	0.096	< LOD
0.9	0.12	> 98.2 %
1	0.195	> 98 %
1.1	0.212	> 97.8 %
1.2	0.348	> 97.6 %
1.3	0.479	> 97.4 %
1.4	0.612	> 97.2 %
1.5	0.669	> 97 %
2	1.139	> 96 %
2.5	1.294	> 95 %
3	1.391	> 94 %
5	1.416	> 90 %
ад'ювант *	0.03	> 98.2 %

* Перевіряли 50 мкг еквіваленту QS21. 150 мМ NaCl буфер.

Вищенаведені дані графічно зображені у Фіг. 1.

Межа визначення у цьому аналізі була при 0.9 мкг QS21 та OD=0.12.

10 Пригнічення (згашування) активності QS21 у ад'ювантній композиції, що містила 150 мМ NaCl було оцінено, як більш, ніж 98.2 % для еквіваленту 50 мкг досліджуваного QS21. У випадку з еквівалентом 90 мкг, результат був більшим, ніж 99 %.

15 Потім пригнічення QS21 порівняли з еквівалентом ад'ювантної композиції, що містить тільки сорбіт та 5 мМ NaCl. Дані були отримані після зберігання ASA при 4 °C або після прискорених досліджень на стійкість (7 днів при 37 °C). Для ASA у сорбіті була отримана стандартна крива QS21 у буфері, що містить сорбіт.

Зразок	Момент часу	LOD	Пригнічення QS21
ад'ювантна композиція (ASA) 150 мМ NaCl	T0	< 1.4	> 97.2 %
	7 днів 37 °C	< 0.9	> 98.2 %
ад'ювантна композиція (ASA) сорбіт, 5 мМ NaCl	T0	< 2	> 97.8 %
	7 днів 37 °C	< 1	> 96 %
	11 місяців 4 °C	< 2	> 97.8 %*

20 Дослідження проводили з еквівалентом 50 мкг QS21, за виключенням *досліджень з еквівалентом 90 мкг QS21.

Зроблено висновок, що QS21 належним чином пригнічується в слабкому буфері NaCl.

Приклад 4: Конгенери MPL.

25 За своїм хімічним складом, 3D-MPL є сумішшю 3-де-О-ацильованого монофосфорила - ліпиду з переважно 4, 5 або 6 ацильованими ланцюгами. Кожна окрема молекула 3D-MPL має назву конгенера. Важливо те, що конгенерна композиція залишається постійною, без будь-яких зсувів між часткою конгенерів. Також є важливим те, що будь-який застосований буфер дозволяє конгенерній композиції бути такою ж саме, як і у концентрованих ліпосомах, застосованих для отримання ад'ювантної композиції.

30 Як видно на Фіг. 2, конгенерна композиція була перевірена у 3D-MPL концентрованих ліпосомах (концентровані ліпосоми LIP07-217, перша колонка Фіг. 2), у ад'ювантній композиції, що містила 3D-MPL ліпосоми та QS21 у 150 мМ NaCl буфері (ад'ювант - 150 мМ NaCl або ASA

(150 mM NaCl), друга колонка) та у ад'ювантній композиції, що містила 3D-MPL ліпосоми та QS21 у сорбіті та 5 mM NaCl буфер (ад'ювант - сорбіт або ASA (сорбіт), колонки 3-7).

Конгенерну композицію також перевірили у двох партіях ад'юванта ASA (сорбіт) у 0 та 7 день після їх отримання зі зберіганням при 37 °C для того, щоб переконатися у відсутності будь-яких змінень протягом часу (див. останні чотири колонки Фіг. 2).

Відносний розподіл тетра-, пента- та гекса-ацильованих конгенерів MPL у концентрованих ліпосомах або зразках ASA (сорбіт) визначали шляхом іонообмінної ВЕРХ-флуо-хроматографії (ARD). Стандарти та зразки спочатку дериватизували з дансилгідразином, який вводить флуоресцентно – активний хромопор у дисахаридну основу. Дериватизовані зразки аналізували на колонці C18 зі зворотною фазою з застосуванням тетрабутиламоній гідроксиду (TBAOH) у якості іонопарного реагенту. Конгенери містять ті ж саме кількості жирних ацильних груп, що були елюйовані у окремих групах (тетраацил, пентаацил та гексаацил). Розподілення конгенерів отримали шляхом порівняння площі піку кожної групи до загальної площі піків всіх MPL конгенерів.

У Фіг. 2 наведено відсоток кожного конгенера. Не було виявлено жодної суттєвої різниці у конгенерній композиції серед ад'ювантних буферів та конгенерна композиція залишалася незмінною у сорбітовому буфері протягом часу.

Приклад 5: Отримання ад'ювантної композиції ASA (сорбіт - 2).

З застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента, у ліпосомному препараті була отримана ад'ювантна композиція, що містила 3-де-О-ацильований монофосфорил - ліпід А та QS21 зі зменшеним порівняно з Прикладом 1 рівнем. Цю композицію отримали наступним чином:

Ад'ювант отримали шляхом 1:1 розведення ASA (сорбіт), отриманого відповідно за Прикладом 1 з розчином, що містив 10 mM фосфат, 5 mM NaCl та 4.7 % сорбіт з pH 6.1. Кінцевий препарат ASA (сорбіт - 2) містив 1 мг DOPC, 250 мкг холестерину, 50 мкг/мл 3D-MPL, 50 мкг/мл QS21, 4.7 % сорбіт, 5 mM NaCl та 10 mM фосфат.

Приклад 6: Отримання ад'ювантної композиції ASA (сорбіт - 3).

З застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента, у ліпосомному препараті була отримана ад'ювантна композиція, що містила 3-де-О-ацильований монофосфорил - ліпід А та QS21 зі зменшеним порівняно з Прикладом 1 рівнем. Цю композицію отримали наступним чином:

А. спосіб отримання ліпосом:

Суміш ліпиду (DOPC), холестерину та 3-де-О-ацильованого монофосфорил - ліпиду (3D-MPL) у органічному розчиннику піддали вакуумній сушці, після чого додали водний розчин (сольовий розчин, буферизований за допомогою фосфатного буферу [100 mM NaCl, 50 mM фосфату, pH 6.1]) та посудину збовтували до повного суспендування всіх ліпідів. Потім цю суспензію попередньо гомогенізували у змішувачі з високим зрушенням, після чого її гомогенізували під високим тиском до зменшення розмірів ліпосом до приблизно 90 нм \pm 10 нм (виміряно за допомогою способу динамічного розсіювання світла (DLS). Далі ліпосоми піддали стерильній фільтрації.

В. Отримання ASA:

Для розведення концентрованих ліпосом, десятикратно розбавлений 100 mM Na₂/K фосфатний буфер (pH 6.1) додали до води для ін'єкцій до досягнення концентрації фосфатного буферу у кінцевому препараті у 10 mM, після чого до розчину додали 30 % (ваги/обсягу) розчин сорбіту у воді для ін'єкцій (WFI) до досягнення вмісту сорбіту у кінцевому препараті у 4.7 %. Потім суміш перемішували протягом 15-45 хв. при кімнатній температурі та додали до неї концентровані ліпосоми (отримані з DOPC, холестерину та 3D-MPL з концентраціями 40 мг/мл, 10 мг/мл та 2 мг/мл відповідно) до досягнення концентрації 50 мкг/мл 3D-MPL у кінцевому препараті, після чого суміш перемішували протягом 15-45 хв. при кімнатній температурі. Потім, за допомогою перистальтичної помпи, до розведених ліпосом додали QS21 у сипучому стані з перемішуванням протягом 15 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки до досягнення концентрації у 50 мкг/мл у кінцевому препараті. Кінцевий препарат ASA містив 1 мг DOPC, 250 мкг холестерину, 50 мкг/мл 3D-MPL, 50 мкг/мл QS21, 4.7 % сорбіт, 2.5 mM NaCl та 10 mM фосфат. Значення pH, як було перевірено, дорівнювало 6.1 \pm 0.1.

Стерильну фільтрацію отриманого продукту здійснили за допомогою фільтру з поліефірсульфону (PES) від PALL Corporation, після чого отриману ад'ювантну композицію, що містила 3-де-О-ацильований MPL та QS21 у ліпосомному препараті та сорбіт у якості ізотонічного агента (позначену, як ASA (сорбіт -3)), зберігали при 4 °C.

Приклад 7: Отримання ад'ювантної композиції ASA (150 mM NaCl-2).

З застосуванням NaCl у якості ізотонічного агента, у ліпосомному препараті була отримана ад'ювантна композиція, що містила 3-де-О-ацильований монофосфорил - ліпід А та QS21 зі зменшеним порівняно з Прикладом 2 рівнем. Цю композицію отримали наступним чином:

А. спосіб отримання ліпосом:

- 5 Суміш ліпиду (DOPC), холестерину та 3-де-О-ацильованого монофосфорил - ліпиду (3D-MPL) у органічному розчиннику піддали вакуумній сушці, після чого додали сольовий розчин, буферизований за допомогою фосфатного буферу [100 мМ NaCl, 50 мМ фосфату, pH 6.1] та посудину збовтували до повного суспендування всіх ліпідів. Потім цю суспензію попередньо гомогенізували у змішувачі з високим зрушенням, після чого її гомогенізували під високим тиском до зменшення розмірів ліпосом до приблизно 90 нм \pm 10 нм (виміряно за допомогою способу динамічного розсіювання світла (DLS)). Далі ліпосоми піддали стерильній фільтрації за допомогою 0.22 мкм PES (поліетилсульфонової) мембрани.

В. Отримання ASA:

- 15 Для розведення концентрованих ліпосом, десятиразово розбавлений 100 мМ Na₂/K фосфатний буфер (pH 6.45) та 1.5 М NaCl додали до води для ін'єкцій до досягнення концентрацій фосфатного буферу та NaCl у кінцевому препараті у 10 мМ та у 150 мМ, відповідно, після чого суміш перемішували протягом 5 хв. при кімнатній температурі та додали до неї концентровані ліпосоми (отримані з DOPC, холестерину та 3D-MPL з концентраціями 40 мг/мл, 10 мг/мл та 2 мг/мл відповідно) до досягнення концентрації 50 мкг/мл 3D-MPL у кінцевому препараті, після чого суміш перемішували протягом 5-15 хв. при кімнатній температурі. Потім до розведених ліпосом додали QS21 у сипучому стані з перемішуванням при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки до досягнення концентрації у 50 мкг/мл у кінцевому препараті. Значення pH, як було перевірено, дорівнювало 6.1 \pm 0.1.

- 25 Стерильну фільтрацію отриманого продукту здійснили за допомогою фільтру з поліефірсульфону (PES) від PALL Corporation, після чого отриману композицію ASA (150 мМ NaCl - 2), що містила 1 мг DOPC, 250 мкг холестерину, 50 мкг 3-де-О-ацильованого MPL, 50 мкг/мл QS21, 10 мМ фосфат та 150 мМ NaCl зберігали при +2 °C - +8 °C.

Приклад 8: Отримання білкових антигенів M72 з двома N-кінцевими His - залишками (SEQ ID No: 3).

- 30 Для отримання вектора експресії M72, за допомогою послідовного зв'язку в тандемі відкритих рамок зчитування (ORF), що кодують С - кінцевий фрагмент Mtb32a до повнорозмірної ORF Mtb39a, що знаходиться на С - кінці з N - кінцевою часткою Mtb32a, була отримана плазміда, що кодує амінокислотну послідовність Mtb72f з додатковою 6-His міткою на N - кінці. Це було досягнуто шляхом застосування специфічних до послідовностей олігонуклеотидів, що містили унікальні сайти рестрикції (EcoRI та EcoRV) та були позбавлені стоп-кодонів на С - кінцях (у випадку С - кінцевого фрагменту Mtb32a та Mtb39a) для ПЛР геномної ДНК зі штаму H37Rv *M. tuberculosis*. З застосуванням цього вектора в якості основи, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу була отримана мутація, що полягала у заміщенні серину у положенні 706 на аланін. Належну орієнтацію вставок, а також мутацію Ser706Ala підтвердили шляхом секвенування ДНК.

- 40 Для отримання вектора, який кодує M72, що має тільки два His - залишка на N - кінці, за допомогою промислової системи сайт-спрямованого мутагенезу було видалено чотири His - залишка. Після перевірки послідовності, послідовність, що кодує M72 вирізали з плазміди за допомогою ферментної реакції, очистили у гелі та лігували у вектор pET, після чого була здійснена перевірка послідовності отриманої рекомбінантної плазміди. Ця плазміда кодує M72 під контролем промотора T7. Експресія РНК - полімерази T7 керується з геномного інтегранта у хазяїні експресії, який індують з застосуванням системи на основі lac - оперону (lacI) та хімічного сигналу індукції ІПТГ. Експресія плазміди також охоплює експресію гена стійкості до канаміцину.

- 50 Плазмідною, що кодує злитий білок M72 під контролем промотора T7 за допомогою електропорації трансформували штам HMS174 (DE3) *E.coli*. Потім було проведено секвенування кодуючої послідовності вставки M72 та фланкуючих ділянок обох ланцюгів та була підтверджена їх тотожність відносно послідовності, що була визначена по оригінальній плазмідній конструкції.

- 55 Для ферментації, флакон з гранульованим посівним матеріалом піддали відтаванню при кімнатній температурі. Попереднє розведення здійснили шляхом перемішування посівного матеріалу з 4.9 мл прекультуального середовища. 1 мл суміші з попереднього розведення застосували для інокуляції рідкої прекультури, що містила 400 мл прекультуального середовища, доповненого сульфатом канаміцину (50 мг/л) та глюкозою (10 г/л).

Композиція прекультуального середовища.

Інгредієнт	Концентрація		
KH ₂ PO ₄	14.83 г/л		
K ₂ HPO ₄	1.65 г/л		
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.82 г/л		
дріжджовий екстракт	6.21 г/л		
87 % гліцерин (у ваговому співвідношенні)	14.54 мл/л		
розчин металів та солей ⁽¹⁾ :	9.7 мл/л		
- FeCl ₃ 6H ₂ O		3.3 г/л	
- MgSO ₄ 7H ₂ O		58 г/л	
розчин мікроелементів ⁽²⁾ :		116 мл/л	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O			7.65 г/л
- MnSO ₄ H ₂ O			5.28 г/л
- CuSO ₄ 5H ₂ O			1.1 г/л
- CoCl ₂ 6H ₂ O			1.1 г/л
- H ₃ BO ₃			0.3 г/л
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O			2.64 г/л
- 4N HCl			6.2 мл/л
розчин біотину та CaCl ₂ ⁽²⁾ :	0.97 мл/л		
- біотин		0.05 г/л	
- CaCl ₂ 2 H ₂ O		61.7 г/л	

pH середовища був доведений до 6.5 розчином NaOH (25 %)
Середовище відфільтрували через 0.22 мкм фільтр

(1) pH був доведений до 1.50 розчином HCl (37 %); розчин відфільтрували через 0.22 мкм фільтр.

5 (2) розчин відфільтрували через 0.22 мкм фільтр.

Прекультуру інкубували у двохлітрових колбах на качалці при 30 °C зі струшуванням (200 об/хв.) до досягнення значення оптичної густини у 2-4 при 650 нм (приблизний час інкубування дорівнював 16 год.). На цій стадії, 72 л (загальний обсяг) ферментеру містив 45 л культурального середовища, доповненого сульфатом канаміцину (34 мг/л), інокульованим з 52

10 мл рідкої прекультури.

Композиція культурального середовища.

Інгредієнт	Концентрація		
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.63 г/л		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.056 г/л		
розчин мікроелементів ⁽¹⁾ :	1.91 мл/л		
- ZnSO ₄ 7H ₂ O			7.65 г/л
- MnSO ₄ H ₂ O			5.28 г/л
- CuSO ₄ 5H ₂ O			1.1 г/л
- CoCl ₂ 6H ₂ O			1.1 г/л
- H ₃ BO ₃			0.3 г/л
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O			2.64 г/л
- HCl 4N			6.2 мл/л
HCl 37 %	0.40 мл/л		
дріжджовий екстракт	35 г/л		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.10 г/л		
KH ₂ PO ₄	18.70 г/л		
глутамат натрію	2.5 г/л		
87 % гліцерин	0.276 мл/л		
глюкоза	20 г/л		
розчин біотину ⁽²⁾ :	0.22 мл/л		
- біотин			1 г/л
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.21 г/л		

розчин відфільтрували через 0.22 мкм фільтр.

(1) розчин відфільтрували через 0.22 мкм фільтр.

(2) розчин відфільтрували через 0.22 мкм фільтр; pH був доведений до 11.0 25 % розчином NaOH.

Значення температури підтримували на відмітці 30 °C ще протягом додаткових двох годин, після чого його підняли до 37 °C до кінця ферментування. Показник повітряного потоку постійно дорівнював 75 л/хв. та розчинений кисень тримали на рівні 17 % насичення шляхом регулювання струшування та тиску зі зворотним зв'язком. Також, по мірі необхідності до середовища у маленьких кількостях автоматично додавали розчин агента-піногасника. При досягненні значення оптичної густини у 50 (± 5) при 650 нм, для індукування експресії M72 до середовища додали 1 mM ізопропіл-бета-D-тіогалактопіранозиду (IPTG). Ферментацію закінчили через 5 годин після початку індукування. Клітинну культуру у режимі легкого струшування охолодили до 15 °C та центрифугували (при 4 °C) до отримання твердого клітинного осаду, який також спостерігали у аліквотах після зберігання при -20 °C.

Для отримання тілець включень, зібрані гранули клітинного осаду піддали відтаванню при кімнатній температурі та руйнуванню у лізуючому буфері (10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.0) за допомогою гомогенізатора з високим тиском, після чого лізати піддали центрифугуванню та отримані гранули клітинного осаду (або тільки включень) промили буфером для промивання, що містив сечовину, Tris та NaCl. Тільки включень розчинили у солюбілізаційному буфері, що містив 8 M сечовину та відфільтрували крізь 0.2 мкм мембрану. Спочатку цей відфільтрований розчин очистили шляхом аніон-обмінної хроматографії з застосуванням колонки Q Sepharose Fast Flow (QSFF). Елюювання M72 проводили за допомогою розчину, що містив 6 M сечовину, 20 mM bis-Tris пропан, 90 mM NaCl, pH 7.0. Зібраний M72 додатково очистили шляхом хроматографії на гідроксиапатиті (HA) та знов елюювали за допомогою розчину, що містив 6 M сечовину, 20 mM bis-Tris пропан, 250 mM NaCl, pH 7.0. Зібрану фракцію концентрували за допомогою мембранної касети (30 кДа) та піддали діалізуванню проти 20 mM Tris, pH 7.5. Потім M72 стерилізували фільтруванням через 0.22 мкм, очищений матеріал розподілили на аліквоти та зберігали при -70 °C.

Приклад 9: Дослідження "висолювання" у композиціях, що містили M72 з різними сольовими концентраціями зі значеннями pH 6.1, 7.5 та 8.5.

За допомогою оцінки розмірів та антигенності був досліджений вплив концентрації хлориду натрію та pH на стійкість антигену M72.

Очищену масу антигену (M72 з двома N-кінцевими His залишками, SEQ ID No: 3, отриманий, як наведено у Прикладі 8) розчинили до концентрації 100 мкг/мл у трьох різних буферах (10 mM фосфатний буфер з pH 6.1, 20 mM Tris-буфер з pH 7.5 та 20 mM Tris-буфер з pH 8.5) з кінцевими концентраціями NaCl у 0, 50, 150, 300 та 450 mM.

Зразки або аналізували негайно (T0) або зберігали перед аналізом протягом ночі при 4 °C (T0 O/N) або зберігали перед аналізом протягом 24 годин при 25 °C (T24h25 °C).

DLS проводили за допомогою приладу Malvern Zetasizer Nano ZS від Malvern Instruments (UK), де був застосований лазер потужністю 4 мВт з довжиною хвилі 633 нм. Розсіяне світло визначали під кутом 173° з температурою 22 °C. Z- середній діаметр (Z_{av}) та індекс полідисперсності (PI) обчислювали за допомогою програмного забезпечення приладу. Нефелометрію проводили з застосуванням приладу Nepheloskan® Ascent від Thermo Fischer Scientific. Аналіз проводили на прозорих для УФ-випромінювання мікропланшетах Costar® від Corning Inc (USA).

Кількісний аналіз антигенності проводили шляхом сендвіч - ІФА з захопленням антигену M72 - специфічними поліклональними антитілами кролів та наступним їх виявленням M72(Mtb39) - специфічними мишачими моноклональними антитілами. Всі виміряні значення наведені відносно очікуваної антигенності на основі застосованої для отримання досліджуваних препаратів очищеної партії білка.

Результати цього експерименту, що наведені у Фіг 3-5 свідчать про те, що спочатку стійкість розчинів, що містять антиген, споріднений з M72, є чутливою як до pH, так і до концентрації NaCl. Вплив NaCl на розміри антигену та антигенність стає більш помітним при нижчому значенні pH. При pH 6.1, значення розмірів антигену та антигенності є нестійкими навіть у відсутності NaCl. Додавання 50 mM NaCl при pH 6.1 веде до збільшення розмірів від 35 нм (0 mM NaCl при T0) до 58 нм (T0) або 79 нм через 24 год. при 25 °C. При pH 7.5 або 8.5, розміри антигену та антигенність є відносно стійкими протягом 24 год. при 25 °C, особливо у відсутності NaCl або коли концентрація NaCl дорівнює 50 mM. Проте, підвищення концентрації хлориду натрію до 150 mM або вище веде до явного збільшення розмірів антигену та до зменшення антигенності.

Приклад 10: Запобігання "висолювання" композицій, що містили M72 та імуностимулятори, де у якості ізотонічного агента було застосовано сорбіт.

Для порівняння стійкості імуногенних композицій, що містять 150 мМ NaCl з композиціями, де у якості ізотонічного агента застосовано сорбіт, ряд зразків досліджували з застосуванням ексклюзійного ВЕРХ - аналізу та ІФА.

Три різних ліофілізованих зразка осаду були отримані таким чином, що при поєднанні з відповідними ад'ювантними препаратами з Прикладів 5 та 7 було отримано бажане значення рН:

(а) M72 з двома N-кінцевими His - залишками, бажане значення рН у відновленій вакцині дорівнює 8.5:

Розчин цукрози (15.75 % (ваги/обсягу) у воді для ін'єкцій) додали до води для ін'єкцій до досягнення 6.3 % кінцевої концентрації цукрози. Потім до суміші додали розчин Tween 80 (3 % (ваги/обсягу) у воді для ін'єкцій) до досягнення його 0.025 % концентрації, після чого до суміші додали 1 М Tris-буфер -HCl рН 8.8 до досягнення його 50 мМ концентрації. Суміш перемішували протягом 5 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки, після чого до неї додали очищену партію антигену (M72 з двома N-кінцевими His - залишками (SEQ IDNo:3), отриману, як наведено у Прикладі 8), до досягнення кінцевої концентрації білка у 25 мкг/мл. Потім суміш перемішували протягом 10 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки. Перевірене значення рН суміші дорівнювало 8.8.

Потім у скляні флакони обсягом 3 мл додали по 0.5 мл отриманої суміші та піддали її ліофілізуванню.

(b) M72 з двома N-кінцевими His - залишками, бажане значення рН у відновленій вакцині дорівнює 8.0:

Розчин цукрози (15.75 % (ваги/обсягу) у воді для ін'єкцій) додали до води для ін'єкцій до досягнення 6.3 % кінцевої концентрації цукрози. Потім до суміші додали розчин Tween 80 (3 % (ваги/обсягу) у воді для ін'єкцій) до досягнення його 0.025 % концентрації, після чого до суміші додали 1 М Tris-буфер -HCl рН 8.8 до досягнення його 20 мМ концентрації. Суміш перемішували протягом 5 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки, після чого до неї додали очищену партію антигену (M72 з двома N-кінцевими His - залишками (SEQ ID No:3), отриману, як наведено у Прикладі 8), до досягнення кінцевої концентрації білка у 25 мкг/мл. Потім суміш перемішували протягом 10 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки. Перевірене значення рН суміші дорівнювало 8.8.

Потім у скляні флакони обсягом 3 мл додали по 0.5 мл отриманої суміші та піддали її ліофілізуванню.

(c) M72 з двома N-кінцевими His - залишками, бажане значення рН у відновленій вакцині дорівнює 7.5:

Розчин цукрози (15.75 % (ваги/обсягу) у воді для ін'єкцій) додали до води для ін'єкцій до досягнення 6.3 % кінцевої концентрації цукрози. Потім до суміші додали розчин Tween 80 (3 % (ваги/обсягу) у воді для ін'єкцій) до досягнення його 0.025 % концентрації, після чого до суміші додали 1 М Tris-буфер - HCl рН 8.8 до досягнення його 12.5 мМ концентрації. Суміш перемішували протягом 5 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки, після чого до неї додали очищену партію антигену (M72 з двома N-кінцевими His - залишками (SEQ ID No:3), отриману, як наведено у Прикладі 8), до досягнення кінцевої концентрації білка у 25 мкг/мл. Потім суміш перемішували протягом 10 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки. Перевірене значення рН суміші дорівнювало 8.8.

Потім у скляні флакони обсягом 3 мл додали по 0.5 мл отриманої суміші та піддали її ліофілізуванню.

Вищеописані ліофілізовані зразки осаду були відновлені з застосуванням 625 мкл ад'ювантних розчинів, отриманих у Прикладах 5 та 7. В результаті відновлення ад'ювантними розчинами були отримані наступні імуногенні композиції:

(i) M72 з двома N-кінцевими His - залишками - ASA(150 мМ NaCl-2) рН 8.5:

10 мкг антигену (20 мкг/мл)

5 % (ваги/обсягу) цукрози

40 мМ Tris

0.02 % (ваги/обсягу) Tween80

500 мкг DOPC

125 мкг холестерину

25 мкг 3D-MPL

25 мкг QS21

150 мМ NaCl

	10 мМ фосфат
	pH 8.5
	(ii) M72 з двома N-кінцевими His - залишками - ASA(150 мМ NaCl-2) pH 8.0
5	10 мкг антигену (20 мкг/мл)
	5 % (ваги/обсягу) цукрози
	16 мМ Tris
	0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
	500 мкг DOPC
10	125 мкг холестерину
	25 мкг 3D-MPL
	25 мкг QS21
	150 мМ NaCl
	10 мМ фосфат
	pH 8.0
15	(iii) M72 з двома N-кінцевими His - залишками - ASA(150 мМ NaCl-2) pH 7.5
	10 мкг антигену (20 мкг/мл)
	5 % (ваги/обсягу) цукрози
	12.5 мМ Tris
	0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
20	500 мкг DOPC
	125 мкг холестерину
	25 мкг 3D-MPL
	25 мкг QS21
	150 мМ NaCl
25	10 мМ фосфату
	pH 7.5
	(iv) M72 з двома N-кінцевими His - залишками - ASA (сорбіт - 2) pH 8.5
	10 мкг антигену (20 мкг/мл)
	5 % (ваги/обсягу) цукрози
30	40 мМ Tris
	0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
	500 мкг DOPC
	125 мкг холестерину
	25 мкг 3D-MPL
35	25 мкг QS21
	5 мМ NaCl
	4.7 % (ваги/обсягу) сорбіту
	10 мМ фосфат
	pH 8.5
40	(v) M72 з двома N-кінцевими His - залишками - ASA (сорбіт - 2) pH 8.0
	10 мкг антигену (20 мкг/мл)
	5 % (ваги/обсягу) цукрози
	16 мМ Tris
	0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
45	500 мкг DOPC
	125 мкг холестерину
	25 мкг 3D-MPL
	25 мкг QS21
	5 мМ NaCl
50	4.7 % (ваги/обсягу) сорбіту
	10 мМ фосфат
	pH 8.0
	(vi) M72 з двома N-кінцевими His - залишками - ASA (сорбіт - 2) pH 7.5
	10 мкг антигену (20 мкг/мл)
55	5 % (ваги/обсягу) цукрози
	12.5 мМ Tris
	0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
	500 мкг DOPC
	125 мкг холестерину
60	25 мкг 3D-MPL

25 мкг QS21
5 мМ NaCl
4.7 % (ваги/обсягу) сорбіту
10 мМ фосфат
pH 7.5

5

Характеристичний аналіз вищеописаних відновлених імуногенних композицій проводили після їх зберігання при 25 °С або 30 °С (Т0, Т6 год. та Т24 год.).

Ексклюзійний ВЕРХ - аналіз проводили шляхом ін'єкції на колонці TOSOH TSK-Gel5000Pw_{XL} (з внутрішнім діаметром 7.8 мм × 30 см), врівноважений 20 мМ буфером Tris, pH 8.5, УФ - визначення з довжиною хвилі у 210 нм та швидкістю потоку 0.5 мл/хв.

10

Кількісний аналіз антигенності проводили шляхом сендвіч - ІФА з захоплюванням антигену M72 - специфічними поліклональними антитілами кролів та наступним їх виявленням M72(Mtb39) - специфічними мишачими моноклональними антитілами. Всі виміряні значення наведені відносно очікуваної антигенності на основі застосованої для отримання досліджуваних препаратів очищеної партії білка.

15

Результати наведені у Фіг. 6a-6d та 7.

Профілі результатів ексклюзійного ВЕРХ - аналізу залишалися стійкими після відновлення у низькосольових композиціях з застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента з кожним значенням pH (тобто pH 7.5, 8.0 та 8.5). На відміну від цього, профілі результатів ексклюзійного ВЕРХ - аналізу для імуногенних композицій, що містили 150 мМ NaCl показали чіткі змінення між отриманим початковим профілем та профілями, отриманими після зберігання композицій при 25 °С або 30 °С. Ці змінення ставали більш інтенсивнішими при зменшенні pH композиції з 150 мМ NaCl.

20

Такі ж саме висновки можна зробити відносно антигенності, з відновленнями, що в основному залишалися стійкими після відновлення у низькосольових композиціях з застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента з кожним значенням pH (тобто pH 7.5, 8.0 та 8.5) протягом часу до 24 годин при 30 °С.

25

Приклад 11: Визначення провідності імуногенних композицій винаходу.

Була виміряна провідність ряду імуногенних композицій відповідно до заявленого винаходу, яку порівняли з провідністю контрольних розчинів NaCl та імуногенної композиції, що містила обумовлену кількість хлориду натрію.

30

Ряд стандартів, що мали концентрації NaCl, що дорівнювали 0, 75, 100, 150, 250 та 300 мМ був отриманий з базового розчину 1500 мМ NaCl шляхом розведення у воді для ін'єкцій.

Імуногенні композиції отримали з застосуванням M72 з двома N-кінцевими His - залишками відповідно за процедурами, наведеними у Прикладі 8. Для дослідження частки самого антигену та будь-якого з матеріалів залишків у очищеній композиції, також були отримані ліофілізовані зразки осаду плацебо без антигенного компоненту.

35

Дослідження по визначенню провідності проводили за допомогою приладу Malvern Zetasizer Nano з нанесенням 1.5 мл кожного зразка у вигнуті капілярні кювети та застосуванням напруги у 30-150 В (що автоматично визначається приладом).

40

Провідність стандартних
розчинів хлориду натрію

Концентрація NaCl (мМ)	Провідність (мСм/см)
0	0.0
75	8.2
100	10.7
150	15.6
250	23.9
300	30.0

Стандартна крива, отримана на основі цих даних наведена у Фіг. 8.

Провідність тестових розчинів

Опис розчину	Концентрація NaCl (мМ)	Провідність (мСм/см)	Еквівалентна концентрація NaCl (мМ)
ASA (сорбіт - 2)	5	1.46	9
плацебо pH 8.0 / ASA (сорбіт - 2)	5	1.95	14
M72 pH 8.0 / ASA (сорбіт - 2)	5	1.96	14
плацебо pH 8.5 / ASA (сорбіт - 2)	5	2.36	18
M72 pH 8.5 / ASA (сорбіт - 2)	5	2.28	17
ASA(150 мМ NaCl-2)	150	16	159
плацебо pH 8.5 / ASA (150 мМ NaCl-2)	150	14.8	147
M72 pH 8.5 / ASA (150 мМ NaCl-2)	150	15.3	152

Як можна побачити з вищенаведених даних, провідність розчинів, де застосовано 150 мМ NaCl була значно більшою, ніж провідність розчинів з мінімальним застосуванням NaCl. Вплив антигену та будь-яких компонентів у збагаченій партії був мінімальним, тому що препарати плацебо та препарати, що містили антиген, споріднений з білком M72 мали порівняно аналогічну провідність.

Приклад 12: Перевірка імуногенності імуногенних композицій винаходу.

Метою цього прикладу було визначення спроможності змінень препарату зменшувати кількість солі у імуногенних композиціях винаходу з метою підвищення стійкості білка, що впливає на імуногенність в природних умовах.

Була проведена оцінка чотирьох імуногенних композицій:

1. M72 з двома N-кінцевими His - залишками pH 8.5/ASA (150 мМ NaCl-2)
2. M72 з двома N-кінцевими His - залишками pH 8.5/ASA (сорбіт - 2)
3. M72 з двома N-кінцевими His - залишками pH 8/ASA (сорбіт - 2)
4. M72 з двома N-кінцевими His - залишками pH 7.5/ASA (сорбіт - 2)

Імуногенність цих композицій, що містили антиген досліджували на мишах C57BL/6.

Для кожної з чотирьох композицій, 30 мишам C57BL/6 три рази (у 0, 14 та 28 день) внутрішньом'язово шляхом ін'єкції вводили по 1 мкг антигену у 50 мкл ад'ювантного розчину (отриманого, як наведено у Прикладі 10). Викликані M72 - специфічні T-клітинні відповіді (CD4 та CD8 T-клітинні відповіді) вимірювали через 6 днів після останньої імунізації (6dPIII).

Для визначення M72- специфічних клітинних відповідей, лімфоцити периферичної крові від групи з 30 мишей зібрали та об'єднали у шість наборів по 5 мишей/груп). Лізис еритроцитів проводили перед посівом клітин in vitro. Клітини активували шляхом стимулювання in vitro групою перекриваючихся пептидів (15-мерних пептидів з 11 перекриваючимися амінокислотами з концентрацією 1 мкг/мл/пептид), що охоплювали послідовність M72 (без N-кінцевих His - залишків). Клітини, що залишалися у середовищі (без пептидного стимулювання) застосували для визначення фонових відповідей. Через дві години після спільного культивування з набором пептидів, до лунок додали брэфелдин (для інгібування цитокінової екскреції) та клітини зберігали протягом ночі при 4 °C. Потім клітини піддали забарвленню для маркерів CD4, CD8, IL-2, IFN-гамма та TNF-альфа.

Кожне вимірювання у Фіг. 9 та 10 являє собою M72- специфічну CD4 або, відповідно, CD8 T-клітинну відповідь з вирахуванням фону, отриману з групи лімфоцитів периферичної крові з 5 мишей через 6 днів після третьої імунізації. Відповідь наведена у вигляді відсотка CD4 T-клітин, що виробляють IFN-гамма та/або IL-2 та/або TNF-альфа у відповідь на стимулювання групою пептидів M72. Рисками позначені середні значення відповідей для кожної групи.

Результати, наведені у Фіг. 9 та 10 показали наявність індукування порівняльних CD4 та CD8 T-клітинних відповідей після трьох імунізацій з кожним тестовим препаратом. Отже, можна зробити висновок, що зменшення кількості солей, присутніх у імуногенних композиціях заявленого винаходу не веде до порушення індукованих T-клітинних відповідей.

Приклад 13: Дослідження "висолювання" у композиціях, що містили M72 з CaCl₂ або MgSO₄ зі значеннями pH 6.1 та 8.0.

Для дослідження впливу інших солей на стійкість антигену M72, були отримані розчини з рядом концентрацій CaCl₂ або MgSO₄ та з різними значеннями pH. Зчитування даних стійкості проводили шляхом візуального спостереження.

Очищену партію антигену (M72 з двома N-кінцевими His - залишками, SEQ ID No: 3)

розчинили до концентрації 100 мкг/мл у двох різних буферах (10 мМ сукцинатний буфер з рН 6.1 та 10 мМ Tris-буфер з рН 8.0), що містили точно визначені кількості солей (0 мМ; 150 мМ або 300 мМ NaCl; 40 мМ, 80 мМ або 160 мМ CaCl₂; 87.5 мМ, 175 мМ або 430 мМ MgSO₄). Зразки аналізували безпосередньо після отримання.

- 5 Провідність зразків (по 6 мл кожного зразка у несіліконізованому скляному флаконі) визначали за допомогою кондуктометру від Mettler Toledo.

Група	Сіль	Буфер	рН (теоретичне значення)	Провідність (мСм/см) (виміряна)	рН (виміряне значення)	Візуальне спостереження
A	0 мМ	10 мМ сукцинат	6.1	1.1	6.3	прозорий
B	150 мМ NaCl	10 мМ сукцинат	6.1	13.4	6.1	прозорий
C	300 мМ NaCl	10 мМ сукцинат	6.1	20.0	6.1	прозорий
D	40 мМ CaCl ₂	10 мМ сукцинат	6.1	8.0	6.1	опалесценція
E	80 мМ CaCl ₂	10 мМ сукцинат	6.1	11.2	5.8	опалесценція + великі частки
F	160 мМ CaCl ₂	10 мМ сукцинат	6.1	20.2	5.8	опалесценція + великі частки
G	87.5 мМ MgSO ₄	10 мМ сукцинат	6.1	7.7	6.1	опалесценція
H	175 мМ MgSO ₄	10 мМ сукцинат	6.1	12.4	5.9	опалесценція + дуже великі частки
I	430 мМ MgSO ₄	10 мМ сукцинат	6.1	20.4	5.9	опалесценція + дуже великі частки
J	0 мМ	10 мМ Tris	8.0	0.463	8.0	прозорий
K	150 мМ NaCl	10 мМ Tris	8.0	12.13	8.0	прозорий
L	300 мМ NaCl	10 мМ Tris	8.0	21.1	8.0	прозорий
M	40 мМ CaCl ₂	10 мМ Tris	8.0	6.7	8.1	великі частки
N	80 мМ CaCl ₂	10 мМ Tris	8.0	10.8	8.0	опалесценція + великі частки
O	160 мМ CaCl ₂	10 мМ Tris	8.0	19.7	8.0	опалесценція + великі частки
P	87,5 мМ MgSO ₄	10 мМ Tris	8.0	7.5	8.0	великі частки
Q	175 мМ MgSO ₄	10 мМ Tris	8.0	10.9	8.2	опалесценція + дуже великі частки
R	430 мМ MgSO ₄	10 мМ Tris	8.0	21.7	8.1	опалесценція + дуже великі частки

- 10 Результати вказують на те, що розчини, що містять антигени, споріднені з білком M72 можуть бути чутливими до інших, ніж хлорид натрію, солей. Вплив CaCl₂ або MgSO₄ здається більш виразним, ніж вплив NaCl з порівняльними концентраціями або провідністю.

Приклад 14: Дослідження “ висолювання ” у композиціях, що містили Mtb72f з різними сольовими концентраціями та значеннями рН, що дорівнювали 6.1, 7.5 та 8.5.

- 15 У цьому Прикладі, за допомогою оцінки за розміром, був досліджений вплив концентрації хлориду натрію та рН на стійкість антигену Mtb72f.

Очищену партію антигену (Mtb72f з 6 His -залишками, SEQ ID No: 7) розчинили до концентрації 100 мкг/мл у трьох різних буферах (10 мМ фосфатний буфер, рН 6.1; 20 мМ Tris-буфер, рН 7.5 та 20 мМ Tris-буфер, рН 8.5), які містили кінцеві концентрації NaCl, що дорівнювали 0, 150 та 450 мМ.

- 20 Зразки перед аналізом зберігали протягом 24 год. при температурі 4 °C або 25 °C.

Нефелометрію проводили з застосуванням приладу Nepheloskan® Ascent від Thermo Fischer Scientific. Аналіз проводили на прозорих для УФ-випромінювання мікропланшетах Costar® від Corning Inc (USA).

Аналіз динамічного розсіювання світла (DLS) проводили з застосуванням приладу Dynapro Plate Reader від Wyatt Instruments з лазером з довжиною хвилі 830 нм та потужністю 50 мВт. Розсіяне світло виявляли при 150° з температурою 22 °С. Середній гідродинамічний діаметр та індекс полідисперсності (PI) обчислювали за допомогою програмного забезпечення приладу.

Результати цього експерименту наведені у Фіг. 11 та 12.

Результати, отримані за допомогою аналізу динамічного розсіювання світла (DLS) та нефелометрії демонструють головну тенденцію, яка полягає у тому, що Mtb72f, подібно до M72, наведеного у попередніх прикладах, також є чутливим до сольової концентрації та pH. Отже, переваги заявленого винаходу також мають відношення до антигенів, споріднених з білком M72, а не тільки до самої послідовності M72.

У ряді зразків DLS - способу, прилад був нездатним визначити деякі розміри частинок (показано, як NV у Фіг.12).

Приклад 15: Запобігання "висолювання" у композиціях, що містять M72 та імуностимулятори з застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента.

Для порівняння стійкості імуногенних композицій, що містили 150 mM NaCl з композиціями, де у якості ізотонічного агента був застосований сорбіт, зразки були піддані перевірці з застосуванням альтернативного ІФА.

Ліофілізовані зразки осаду отримали, як описано у Прикладі 10 (особливо спосіб (а)) таким чином, щоб у поєднанні з відповідними ад'ювантними препаратами з Прикладу 7 була б отримана суміш з pH 8.5. Вищеописані ліофілізовані зразки осаду були відновлені у 625 мкл ад'ювантних розчинів, отриманих у Прикладі 7. При відновленні з ад'ювантними розчинами були отримані наступні імуногенні композиції:

(i) M72 з двома N-кінцевими His - залишками - ASA(150 mM NaCl - 2) pH 8.5

10 мкг антигену (20 мкг/мл)

5 % (ваги/обсягу) цукрози

40 mM Tris

0.02 % (ваги/обсягу) Tween80

500 мкг DOPC

125 мкг холестерину

25 мкг 3D-MPL

25 мкг QS21

150 mM NaCl

10 mM фосфат

pH 8.5

(ii) M72 з двома N-кінцевими His - залишками - ASA (сорбіт - 2) pH 8.5

10 мкг антигену (20 мкг/мл)

5 % (ваги/обсягу) цукрози

40 mM Tris

0.02 % (ваги/обсягу) Tween 80

500 мкг DOPC

125 мкг холестерину

25 мкг 3D-MPL

25 мкг QS21

5 mM NaCl

4.7 % (ваги/обсягу) сорбіту

10 mM фосфат

pH 8.5

Характеристичний аналіз вищеописаних відновлених імуногенних композицій проводили після їх зберігання при 30 °С (Т24 год.), порівнюючи їх з випадково отриманим зразком (Т0).

Кількісний аналіз антигенності проводили шляхом непрямого сендвіч - ІФА з захоплюванням антигену M72 - специфічними поліклональними антитілами кролів та наступним їх виявленням M72(Mtb39) - специфічними мишачими моноклональними антитілами. Стисло кажучи, на планшет наносили анти-M72 - специфічні поліклональні антитіла кролів з розведенням 1/8000 у сольовому розчині Дульбекко, буферизованому допомогою фосфатного буферу з наступним інкубуванням при 4 °С протягом ночі. Після чотирьох промивань реакцію на планшетах призупиняли шляхом інкубування протягом години при 37 °С з буфером насичення (PBS, 0.1 % Tween 20, 1 % BSA). Після етапу промивання, білковий стандарт (очищена партія M72: 1950

мкг/мл), внутрішній контроль (M72: 1768 мкг/мл) та зразки нанесли у лунки з першого рядку планшету з концентрацією приблизно у 0.25 мкг/мл, після чого здійснили двократне серійне розведення буфером насичення (PBS, 0.025 % Tween 20) з лунок 1-12 та інкубували зразки протягом 1 год. 30 хв. при 37 °С. Після промивання, імунний комплекс знову інкубували 1 год. при 37 °С з анти-M72 мишачими моноклональними антитілами з розведенням 1/1000 у буфері насичення (PBS, 0.025 % Tween 20). Після чотирьох промивань, до зразків додали біотинільовані анти-мишачі поліклональні антитіла кролів з розведенням 1/1000 у буфері насичення (PBS, 0.025 % Tween 20). Ще після чотирьох промивань, сигнал ампліфікували шляхом додавання комплексу стрептавидин-пероксидаза хрину з розведенням 1/4000 у буфері насичення (PBS, 0.025 % Tween 20). Після чотирьох промивань, сигнал був виявлений за допомогою реакції з орто-фенілен-діамін дигідрохлоридом (OPDA) протягом 15 хв. при кімнатній температурі та реакцію призупинили шляхом додавання 1М HCl. Отримане забарвлення було пропорційним до кількості зв'язаних анти-M72 антитіл та його вимірювали при 490 нм та 620 нм. Всі етапи промивання проводили з застосуванням буферу PBS, 0.025 % Tween 20.

Всі виміряні кількості наведені по відношенню до очікуваної антигенності на основі очищеної партії білка, застосованої для отримання тестових препаратів.

Результати наведені у Фіг. 13. Ромбами вказані особливі вимірювання для кожного з трьох тестових зразків, разом з лінією, якою позначено середнє значення.

Відновлення антигену після відновлення у низькосольових композиціях з застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента з рН 8.5, що тривало до 24 год. при 30 °С значною мірою було стійким. Відновлення у ASA (сорбіт-2) через 24 год. дорівнювало 83.5 % (T0 87.1 % означає, що підтримується 95.9 % відносної антигенності), у той час, як відновлення у ASA NaCl-2) через 24 год. дорівнювало 54.5 % (T0 81.0 % означає, що після зберігання підтримується тільки 67.3 % відносної антигенності).

Таким чином, приклади 9, 10 та 15 вперше демонструють згубний вплив значення рН та концентрації NaCl на стійкість імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком M72. Приклад 13 доповнює це, показуючи, що інші солі також можуть негативно впливати на стійкість імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком M72. Приклад 14 демонструє, що цей ефект також може бути застосованим до інших послідовностей, споріднених з M72.

Змінення складу імуногенних композицій з неіонними ізотонічними агентами спрямовано на вирішення проблем стійкості антигену. На додачу до цього, Приклади 3, 4 та 12 демонструють видалення по суті всього NaCl з імуногенного препарату та його заміщення сорбітом у якості ізотонічного агента, що не має шкідливого впливу на стимулювання Т-клітинних відповідей.

Стійкість імуногенних композицій є ключовим фактором та може бути особливо актуальною у ізолюваних місцях, де охолодження не завжди є легко доступним. Шляхом зменшення наявності солей у імуногенних композиціях, автори цього винаходу можуть скоротити обсяг змінень, що відбуваються при зберіганні імуногенних композицій.

В описі та у Формулі Винаходу, якщо контекст не вимагає іншого, слово “включати” та його варіації, як-то “включає” та “включає в себе”, слід розуміти як включення зазначеного цілого числа, етапу, групи цілих чисел або групи етапів, але без виключення будь-якого іншого цілого числа, етапу, групи цілих чисел або групи етапів.

Всі згадані тут документи, в тому числі патенти та патентні заявки включені сюди у якості посилання у повному обсязі.

Перелік послідовностей

<110> Глаксомітклайн Байолоджікалз С.А.
Годарт Стефан
Ланан Аміна
Лемоін Домінік

<120> Нові сполуки

<130> VB64442

<150> US61/422723

<151> 2010-12-14

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 723

<212> Білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> злитий (гібридний) білок M72

<400> 1

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> 2
<211> 2172
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> кодуєча послідовність злитого (гібридного) білка M72

<400> 2
atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tcccaggggtg ggcagggatt cgccattccg 60
atcgggcagg cgatggcgat cgcgggccag atccgatcgg gtgggggggtc acccaccggt 120
catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgttgctg acaacaacgg caacggcgca 180
cgagtccaac gcgtggctcg gagcgctccg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac 240
gtgatcaccg cggtcgacgg cgctccgatc aactcgcca ccgcgatggc ggacgcgctt 300
aacgggcatc atcccgggta cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg 360
cgtacaggga acgtgacatt ggccgaggga ccccggccg aattcatggg ggatttcggg 420
gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccggggtc ggcctcgctg 480
gtggccgagg ctcagatgtg ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcggcg 540
tttcagtcgg tggctcgggg tctgacgggt gggctcgtgga taggttcgtc ggcgggtctg 600
atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgaggg gcaggccgag 660
ctgaccgccg cccagggtccg ggttgctgctg gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg 720
gtgccccgcg cggtgatcgc cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac 780
ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg 840
gccaagacg ccgccgcatg gtttggtctac gcccgggcga cggcgacggc gacggcgacg 900
ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcgcgg gtgggctcct cgagcaggcc 960
gccgcggctg agggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgccc 1020
caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt 1080
ggcctgtgga agacgggtct gccgcacatg tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140
aacaaccaca tgatcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg 1200
ttgaagggtt ttgctccggc ggcggccgcc caggccgtgc aaaccgcggc gcaaaacggg 1260
gtccggggca tgagctcgct gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtggggtg 1320
gccgccaact tgggtcgggc ggcctcggtc ggttcgttgt cggtgccgca ggcctgggccc 1380
gcggccaacc aggcagtcac cccggcgggc cgggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc 1440
gccgcggaaa gagggcccg gcagatgctg ggcgggctgc cgggtggggca gatgggcgcc 1500
agggccgggt gtgggctcag tgggtgtgctg cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg 1560

cattctccgg cagccggcga tatcgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcgccgac 1620
 ttccccgcgc tgcccctcga cccgtccgcg atggtcgccc aagtggggcc acaggtggtc 1680
 aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gccgtgggcg ccgggaccgg catcgtcatc 1740
 gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat 1800
 gcgttcagcg tcggctccgg ccaaacctac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc 1860
 caggatgtcg cgggtgtgca gctgcgcggt gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcggc 1920
 ggcggcgtcg cgggttggtga gcccgtcgtc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcgga 1980
 acgccccgtg cgggtgcctgg caggggtggc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040
 tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
 cccggtgatg cgggcggggc cgctgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160
 gccgcgtcct ag 2172

<210> 3
 <211> 725
 <212> Білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> злитий білок M72 з двома додатковими his - залишками

<400> 3

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

Pro 145 Pro Glu Ile Asn 150 Ser Ala Arg Met Tyr Ala 155 Gly Pro Gly Ser Ala 160
 Ser Leu Val Ala 165 Ala Ala Gln Met Trp Asp 170 Ser Val Ala Ser Asp 175 Leu
 Phe Ser Ala 180 Ala Ser Ala Phe Gln 185 Val Val Trp Gly Leu 190 Thr Val
 Gly Ser Trp 195 Ile Gly Ser Ser Ala 200 Gly Leu Met Val Ala 205 Ala Ala Ser
 Pro Tyr 210 Val Ala Trp Met Ser 215 Val Thr Ala Gly Gln 220 Ala Glu Leu Thr
 Ala 225 Ala Gln Val Arg Val 230 Ala Ala Ala Tyr 235 Glu Thr Ala Tyr Gly 240
 Leu Thr Val Pro 245 Pro Val Ile Ala Glu 250 Asn Arg Ala Glu Leu 255 Met
 Ile Leu Ile Ala 260 Thr Asn Leu Leu Gly 265 Gln Asn Thr Pro Ala 270 Ile Ala
 Val Asn Glu 275 Ala Glu Tyr Gly Glu 280 Met Trp Ala Gln Asp 285 Ala Ala Ala
 Met Phe 290 Gly Tyr Ala Ala Ala 295 Thr Ala Thr Ala Thr 300 Ala Thr Leu Leu
 Pro Phe 305 Glu Glu Ala Pro 310 Glu Met Thr Ser Ala 315 Gly Gly Leu Leu Glu 320
 Gln Ala Ala Ala Val 325 Glu Glu Ala Ser Asp 330 Thr Ala Ala Ala Asn 335 Gln
 Leu Met Asn 340 Asn Val Pro Gln Ala Leu 345 Gln Gln Leu Ala Gln 350 Pro Thr
 Gln Gly Thr 355 Thr Pro Ser Ser Lys 360 Leu Gly Gly Leu Trp 365 Lys Thr Val
 Ser Pro 370 His Arg Ser Pro Ile 375 Ser Asn Met Val Ser 380 Met Ala Asn Asn
 His 385 Met Ser Met Thr Asn 390 Ser Gly Val Ser Met 395 Thr Asn Thr Leu Ser 400
 Ser Met Leu Lys 405 Gly Phe Ala Pro Ala Ala 410 Ala Ala Gln Ala Val 415 Gln

Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser
 420 425 430
 Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg
 435 440 445
 Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala
 450 455 460
 Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu
 465 470 475 480
 Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro
 485 490 495
 Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu
 500 505
 Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
 515 520 525
 Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro
 530 535 540
 Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln
 545 550 555 560
 Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala
 565 570 575
 Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn
 580 585 590
 His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser
 595 600 605
 Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp
 610 615 620
 Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala
 625 630 635 640
 Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn
 645 650 655
 Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val
 660 665 670
 Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu
 675 680 685

Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly
690 695 700

Asp Ala Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met
705 710 715 720

Asn Thr Ala Ala Ser
725

<210> 4
<211> 2178
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> кодує послідовність злитого білка M72 з двома додатковими his - залишками

<400> 4
atgcatcaca cggccgcgtc cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc 60
attccgatcg ggcaggcgat ggcgatcgcg ggccagatcc gatcggggtgg ggggtcacc 120
accgttcata tcgggcctac cgccttcctc ggcttgggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180
ggcgacagag tccaacgcgt ggtcgggagc gtcgcggcg caagtctcgg catctccacc 240
ggcgacgtga tcaccgcggg cgacggcgct ccgatcaact cggccaccgc gatggcgag 300
gcgcttaacg ggcacatcc cgggtgacgtc atctcggtga cctggcaaac caagtctggg 360
ggcacgcgta cagggaacgt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat 420
ttcggggcgt taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgccggccc ggggttcggcc 480
tcgctgggtg ccgcggtcga gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt ttcggccgcg 540
tcggcggttc agtcgggtgt ctggggtctg acgggtgggt cgtggatagg ttcgtcggcg 600
ggctctgatg tggcggcggc ctccggtat gtggcggtga tgagcgtcac cgcggggcag 660
gccgagctga ccgccgcca ggtccgggtt gtcgcggcg cctacgagac ggcgtatggg 720
ctgacgggtg ccccgccggg gatcgccgag aaccgtgctg aactgatgat tctgatagcg 780
accaacctct tggggcaaaa caccggcg atcgcggtca acgaggccga atacggcgag 840
atgtggggccc aagacgccgc cgcgatgttt ggctacgcc cggcgacggc gacggcgacg 900
gcgacgttgc tgccgttcga ggaggcgccg gagatgacca gcgcgggtgg gtcctcagag 960
caggccgccg cggtcgagga ggcctccgac accgccgcgg cgaaccagtt gatgaacaat 1020
gtgccccagg cgtgcaaca gctggcccag cccacgcagg gcaccacgcc ttcttccaag 1080
ctgggtggcc tgtggaagac ggtctcgcc catcggtcgc cgatcagcaa catggtgtcg 1140
atggccaaca accacatgtc gatgaccaac tcgggtgtgt cgatgaccaa caccttgagc 1200
tcgatgttga agggctttgc tccggcgccg gccgccagg ccgtgcaaac cgcggcgcaa 1260
aacgggggtcc gggcgatgag ctcgctgggc agctcgctgg gttcttcggg tctggcggt 1320

```

ggggtggccg ccaacttggg tcgggcggcc tcggtcggtt cgttgtcggg gccgcaggcc 1380
tgggcccggg ccaaccaggc agtcaccccg gcggcgcggg cgctgccgct gaccagcctg 1440
accagcgccg cggaagagg gcccgggcag atgctgggcg ggctgccggg ggggcagatg 1500
ggcgccaggg ccggtggtgg gctcagtggg gtgctgcgtg ttccgcccg accctatgtg 1560
atgccgcatt ctccggcagc cggcgatata gccccgccgg ccttgtcgca ggaccggttc 1620
gccgacttcc ccgcgctgcc cctcgacccg tccgcgatgg tcgccaagt ggggccacag 1680
gtggtcaaca tcaacaccaa actgggctac aacaacgccg tgggcgccgg gaccggcatc 1740
gtcatcgatc ccaacggtgt cgtgctgacc aacaaccag tgatcgggg cgccaccgac 1800
atcaatgcgt tcagcgctcg ctccggccaa acctacggcg tcgatgtggg cgggtatgac 1860
cgcacccagg atgtcgcggt gctgcagctg cgcggtgccg gtggcctgcc gtcggcgggc 1920
atcggtggcg gcgtcgcggt tggtagccc gtcgtcgca tgggcaacag cgggtggcag 1980
ggcggaacgc cccgtgcggg gcctggcagg gtggtcgcg tcggccaaac cgtgcaggcg 2040
tcggattcgc tgaccggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgcccg 2100
atccagcccg gtgatgcggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggg ggtcggtatg 2160
aacacggccg cgtcctag 2178

```

```

<210> 5
<211> 723
<212> Білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> злитий (гібридний) білок mtb72f

<400> 5

```

```

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> 6
<211> 2172
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> кодує послідовність злитого білка Mtb72f

<400> 6
atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tcccaggggtg ggcagggatt cgccattccg 60
atcgggacag cgtatggcgt cgcgggcccag atccgatcgg gtgggggggtc acccaccgtt 120
catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgtgtctg acaacaacgg caacggcgca 180
cgagtccaac gcgtggctcg gagcgctccg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac 240
gtgatcaccg cggtcgacgg cgctccgatc aactcggcca ccgcatggc ggacgcgctt 300
aacgggcatc atcccgggta cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg 360
cgtacaggga acgtgacatt ggccgaggga cccccggccg aattcatggt ggatttcggg 420
gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccgggttc ggcctcgtg 480
gtggccgcgg ctcatgtgtg ggacagcgtg gcgagtgaac tgttttcggc cgcgtcggcg 540
tttcagtcgg tggctcgggg tctgacgggt gggtcgtgga taggttcgtc ggcgggtctg 600
atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgcggg gcaggccgag 660
ctgaccgccg ccaggttccg ggttgctgct gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg 720
gtgccccgc cggatgatcg cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac 780
ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg 840
gccaagacg ccgccgcgat gtttggctac gccgcggcga cggcgacggc gacggcgacg 900
ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcgcgg gtgggctcct cgagcaggcc 960
gccgcggtcg aggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaaac agttgatgaa caatgtgcc 1020
caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt 1080
ggcctgtgga agacgggtct gccgcacggt tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140

aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg 1200
 ttgaagggtt ttgctccggc ggcggccgcc caggccgtgc aaaccgcggc gcaaaacggg 1260
 gtccgggcca tgagctcgct gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtgggtg 1320
 gccgccaaact tgggtcgggc ggcctcggtc ggttcgttgt cggtgccgca ggcctgggcc 1380
 gcggccaacc aggcagtcac cccggcggcg cgggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc 1440
 gccgcggaaa gagggcccgg gcagatgctg ggcgggctgc cggtggggca gatgggcgcc 1500
 agggccgggtg gtgggctcag tgggtgtgctg cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg 1560
 cattctccgg cagccggcga tatcgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcgccgac 1620
 ttccccgcgc tgccccctga cccgtccgcg atggtcgccc aagtggggcc acagggtggtc 1680
 aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gccgtgggcg ccgggaccgg catcgtcatc 1740
 gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat 1800
 gcgttcagcg tcggctccgg ccaaacctac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc 1860
 caggatgtcg cgggtgtgca gctgcgcggt gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcggc 1920
 ggcggcgtcg cggttggtga gcccgtcgtc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcgga 1980
 acgccccgtg cgggtcctgg cagggtgggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040
 tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
 cccggtgatt cgggcggggc cgctcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160
 gccgcgtcct ag 2172

<210> 7
 <211> 729
 <212> Білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> Злитий білок Mtb72f з 6 додатковими his - залишками
 <400> 7

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

				85				90				95			
Asn	Ser	Ala	Thr 100	Ala	Met	Ala	Asp	Ala 105	Leu	Asn	Gly	His	His 110	Pro	Gly
Asp	Val	Ile 115	Ser	Val	Thr	Trp	Gln 120	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly 125	Thr	Arg	Thr
Gly	Asn 130	Val	Thr	Leu	Ala	Glu 135	Gly	Pro	Pro	Ala	Glu 140	Phe	Met	Val	Asp
Phe 145	Gly	Ala	Leu	Pro	Pro 150	Glu	Ile	Asn	Ser	Ala 155	Arg	Met	Tyr	Ala	Gly 160
Pro	Gly	Ser	Ala	Ser 165	Leu	Val	Ala	Ala 170	Ala	Gln	Met	Trp	Asp	Ser 175	Val
Ala	Ser	Asp	Leu 180	Phe	Ser	Ala	Ala	Ser 185	Ala	Phe	Gln	Ser	Val 190	Val	Trp
Gly	Leu	Thr 195	Val	Gly	Ser	Trp	Ile 200	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly 205	Leu	Met	Val
Ala	Ala 210	Ala	Ser	Pro	Tyr	Val 215	Ala	Trp	Met	Ser	Val 220	Thr	Ala	Gly	Gln
Ala 225	Glu	Leu	Thr	Ala	Ala 230	Gln	Val	Arg	Val	Ala 235	Ala	Ala	Ala	Tyr	Glu 240
Thr	Ala	Tyr	Gly	Leu 245	Thr	Val	Pro	Pro	Pro 250	Val	Ile	Ala	Glu	Asn 255	Arg
Ala	Glu	Leu	Met 260	Ile	Leu	Ile	Ala	Thr 265	Asn	Leu	Leu	Gly	Gln 270	Asn	Thr
Pro	Ala	Ile 275	Ala	Val	Asn	Glu	Ala 280	Glu	Tyr	Gly	Glu	Met 285	Trp	Ala	Gln
Asp	Ala 290	Ala	Ala	Met	Phe	Gly 295	Tyr	Ala	Ala	Ala	Thr 300	Ala	Thr	Ala	Thr
Ala 305	Thr	Leu	Leu	Pro	Phe 310	Glu	Glu	Ala	Pro	Glu 315	Met	Thr	Ser	Ala	Gly 320
Gly	Leu	Leu	Glu	Gln 325	Ala	Ala	Ala	Val	Glu 330	Glu	Ala	Ser	Asp	Thr 335	Ala
Ala	Ala	Asn	Gln 340	Leu	Met	Asn	Asn	Val 345	Pro	Gln	Ala	Leu	Gln 350	Gln	Leu
Ala	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Ser	Lys	Leu	Gly	Gly	Leu

	355					360					365				
Trp	Lys 370	Thr	Val	Ser	Pro	His 375	Arg	Ser	Pro	Ile	Ser 380	Asn	Met	Val	Ser
Met 385	Ala	Asn	Asn	His	Met 390	Ser	Met	Thr	Asn	Ser 395	Gly	Val	Ser	Met	Thr 400
Asn	Thr	Leu	Ser	Ser 405	Met	Leu	Lys	Gly	Phe 410	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala 415	Ala
Gln	Ala	Val	Gln 420	Thr	Ala	Ala	Gln	Asn 425	Gly	Val	Arg	Ala	Met 430	Ser	Ser
Leu	Gly	Ser 435	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser 440	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly 445	Val	Ala	Ala
Asn	Leu 450	Gly	Arg	Ala	Ala	Ser 455	Val	Gly	Ser	Leu	Ser 460	Val	Pro	Gln	Ala
Trp 465	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln 470	Ala	Val	Thr	Pro	Ala 475	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro 480
Leu	Thr	Ser	Leu	Thr 485	Ser	Ala	Ala	Glu	Arg 490	Gly	Pro	Gly	Gln	Met 495	Leu
Gly	Gly	Leu	Pro 500	Val	Gly	Gln	Met	Gly 505	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly 510	Gly	Leu
Ser	Gly	Val 515	Leu	Arg	Val	Pro	Pro 520	Arg	Pro	Tyr	Val	Met 525	Pro	His	Ser
Pro	Ala 530	Ala	Gly	Asp	Ile	Ala 535	Pro	Pro	Ala	Leu	Ser 540	Gln	Asp	Arg	Phe
Ala 545	Asp	Phe	Pro	Ala	Leu 550	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser 555	Ala	Met	Val	Ala	Gln 560
Val	Gly	Pro	Gln	Val 565	Val	Asn	Ile	Asn	Thr 570	Lys	Leu	Gly	Tyr	Asn 575	Asn
Ala	Val	Gly	Ala 580	Gly	Thr	Gly	Ile	Val 585	Ile	Asp	Pro	Asn	Gly 590	Val	Val
Leu	Thr	Asn 595	Asn	His	Val	Ile	Ala 600	Gly	Ala	Thr	Asp	Ile 605	Asn	Ala	Phe
Ser	Val 610	Gly	Ser	Gly	Gln	Thr 615	Tyr	Gly	Val	Asp	Val 620	Val	Gly	Tyr	Asp
Arg	Thr	Gln	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu

[illegible]

<210>	8
<211>	2190
<212>	ДНК
<213>	штучна послідовність

<220>
<223> кодує послідовність злитого білка M72 з 6 додатковими his- залишками

<400>	8	atgcatcacc	atcaccatca	cacggccgcg	tccgataact	tccagctgtc	ccaggggtggg	60
		cagggattcg	ccattccgat	cgggcaggcg	atggcgatcg	cgggccagat	ccgatcgggt	120
		gggggggtcac	ccaccgttca	tatcgggcct	accgccttcc	tcggcttggg	tgttgtcgac	180
		aacaacggca	acggcgcacg	agtccaacgc	gtggtcggga	gcgctccggc	ggcaagtctc	240
		ggcatctcca	ccggcgacgt	gatcaccgcg	gtcgacggcg	ctccgatcaa	ctcggccacc	300
		gcgatggcgg	acgcgcttaa	cgggcatcat	cccggtgacg	tcattctcgt	gacctggcaa	360
		accaagtctg	gcggcacgcg	tacaggaac	gtgacattgg	ccgagggacc	cccggccgaa	420
		ttcatggtgg	atttcggggc	gttaccaccg	gagatcaact	ccgcgaggat	gtacgccggc	480
		ccgggttcgg	cctcgctggt	ggccgcggct	cagatgtggg	acagcgtggc	gagtgcacctg	540
		ttttcggccg	cgtcggcggt	tcagtcgggt	gtctgggggt	tgacggtggg	gtcgtggata	600
		ggttcgtcgg	cgggtctgat	ggtggcggcg	gcctcgccgt	atgtggcgtg	gatgagcgtc	660
		accgcggggc	aggccgagct	gaccgccgcc	caggtccggg	ttgctgcggc	ggcctacgag	720
		acggcgtatg	ggctgacggt	gccccgccg	gtgatcgccg	agaaccgtgc	tgaactgatg	780
		attctgatag	cgaccaacct	cttggggcaa	aacaccccg	cgatcgcggt	caacgaggcc	840
		gaatacggcg	agatgtgggc	ccaagacgcc	gccgcgatgt	ttggctacgc	cgcggcgacg	900
		gcgacggcga	cggcgacgtt	gctgccgttc	gaggaggcgc	cggagatgac	cagcgcgggt	960

```

gggctcctcg agcaggccgc cgcggctcag gaggcctccg acaccgccgc ggccaaccag 1020
ttgatgaaca atgtgccccca ggcgctgcaa cagctggccc agcccacgca gggcaccacg 1080
ccttcttcca agctgggtgg cctgtggaag acggtctcgc cgcacgcggtc gccgatcagc 1140
aacatggtgt cgatggccaa caaccacatg tcgatgacca actcgggtgt gtcgatgacc 1200
aacaccttga gctcgatgtt gaagggcctt gctccggcgg cggccgcccc ggccgtgcaa 1260
accgcggcgc aaaacgggggt ccgggcgatg agctcgtctg gcagctcgtt gggttcttcg 1320
ggtctgggcg gtggggtggc cgccaacttg ggtcgggcgg cctcggtcgg ttcgttgtcg 1380
gtgccgcagg cctgggccgc ggccaaccag gcagtcaccc cggcggcgcg ggcgctgccg 1440
ctgaccagcc tgaccagcgc cgcggaaaga gggcccgggc agatgctggg cgggctgccg 1500
gtggggcaga tgggcgccag ggccgggtgt gggctcagtg gtgtgctgcg tgttcgcgcg 1560
cgacctatg tgatgccgca ttctccggca gccggcgata tcgccccgcc ggccttgtcg 1620
caggaccggt tcgccgactt cccgcgctg cccctcgacc cgtccgcgat ggtcgcccaa 1680
gtggggccac aggtggtcaa catcaacacc aaactgggct acaacaacgc cgtgggcgcc 1740
gggaccggca tcgtcatcga tcccaacggt gtcgtgtga ccaacaacca cgtgatcgcg 1800
ggcgccaccg acatcaatgc gttcagcgtc ggctccggcc aaacctacgg cgtcgatgtg 1860
gtcgggtatg accgcacca ggatgtcgcg gtgctgcagc tgcgcggtgc cggtggcctg 1920
ccgtcggcgg cgatcgggtg cggcgtcgcg gttggtgagc ccgtcgtcgc gatgggcaac 1980
agcgggtggc agggcggaac gccccgtgcg gtgcctggca gggtggtcgc gtcgggcaa 2040
accgtgcagg cgtcggattc gctgaccggt gccgaagaga cattgaacgg gttgatccag 2100
ttcgatgccg cgatccagcc cgggtattcg ggcggggccc tcgtcaacgg cctaggacag 2160
gtggtcggta tgaacacggc cgcgtcctag 2190

```

```

<210> 9
<211> 20
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> CpG oligo 1 - CpG 1826

<400> 9
tccatgacgt tcctgacgtt

```

20

```

<210> 10
<211> 18
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> CpG oligo 2 - CpG 1758

<400> 10
tctcccagcg tgcgccat

```

18

```

<210> 11

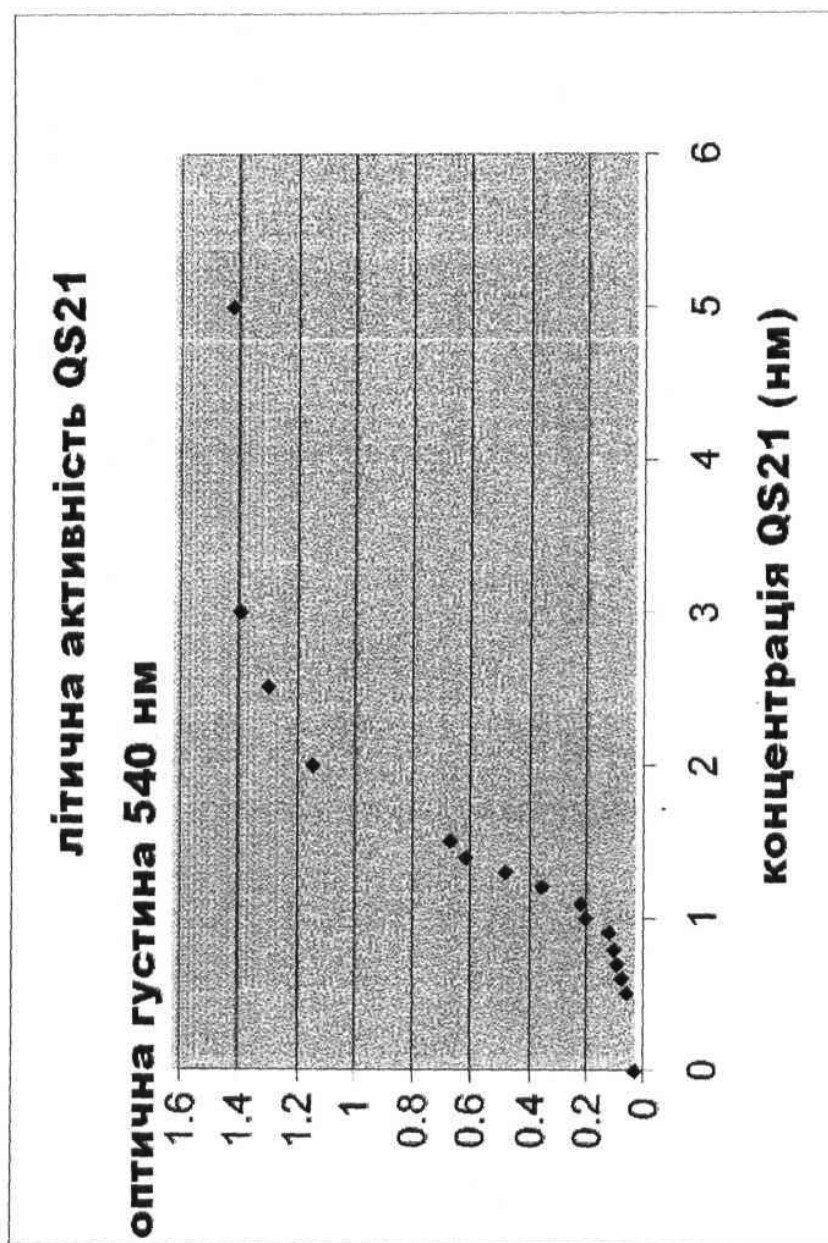
```

<211>	30	
<212>	ДНК	
<213>	штучна послідовність	
<220>		
<223>	CpG oligo 3	
<400>	11	
	accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg	30
<210>	12	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	штучна послідовність	
<220>		
<223>	CpG oligo 4 - CpG 2006	
<400>	12	
	tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt	24
<210>	13	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	штучна послідовність	
<220>		
<223>	CpG oligo 5 - CpG 1686	
<400>	13	
	tccatgacgt tcctgatgct	20

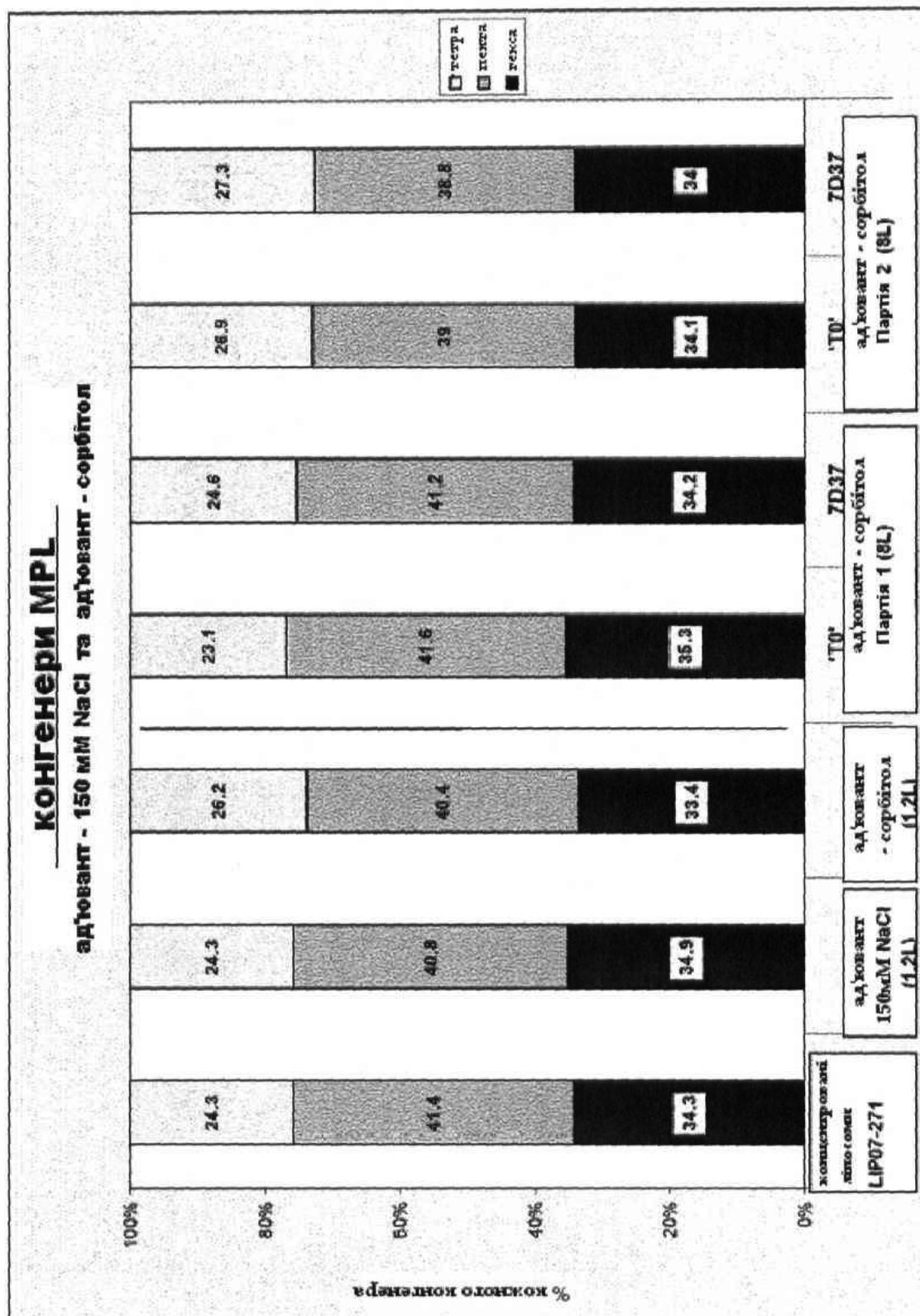
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Імуногенна композиція, яка містить антиген, споріднений з M72, де антиген, споріднений з M72, включає послідовність, що має принаймні 90 % ідентичності з послідовністю SEQ ID NO: 1, та рН вказаної композиції лежить в інтервалі від 7,0 до 9,0, а електропровідність композиції складає 5 мСм/см або менше.
2. Імуногенна композиція згідно з п. 1, де електропровідність композиції складає 4 мСм/см або
- 10 менше.
3. Імуногенна композиція згідно з п. 2, де електропровідність складає 3 мСм/см або менше.
4. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-3, в якій концентрація солей дорівнює 40 мМ або менше.
5. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-4, в якій концентрація хлориду натрію дорівнює 40
- 15 мМ або менше.
6. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-5, яка додатково включає неіонний агент, що регулює тоничність.
7. Імуногенна композиція згідно з п. 6, в якій неіонний агент, що регулює тоничність, є поліолом.
8. Імуногенна композиція згідно з п. 7, в якій поліол є сорбітом, а концентрація сорбіту складає
- 20 від приблизно 4 до приблизно 6 % (ваг./об.).
9. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-8, в якій концентрація сахарози складає від приблизно 4 до приблизно 6 % (ваг./об.).
10. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-9, яка додатково включає один або декілька імуностимуляторів.

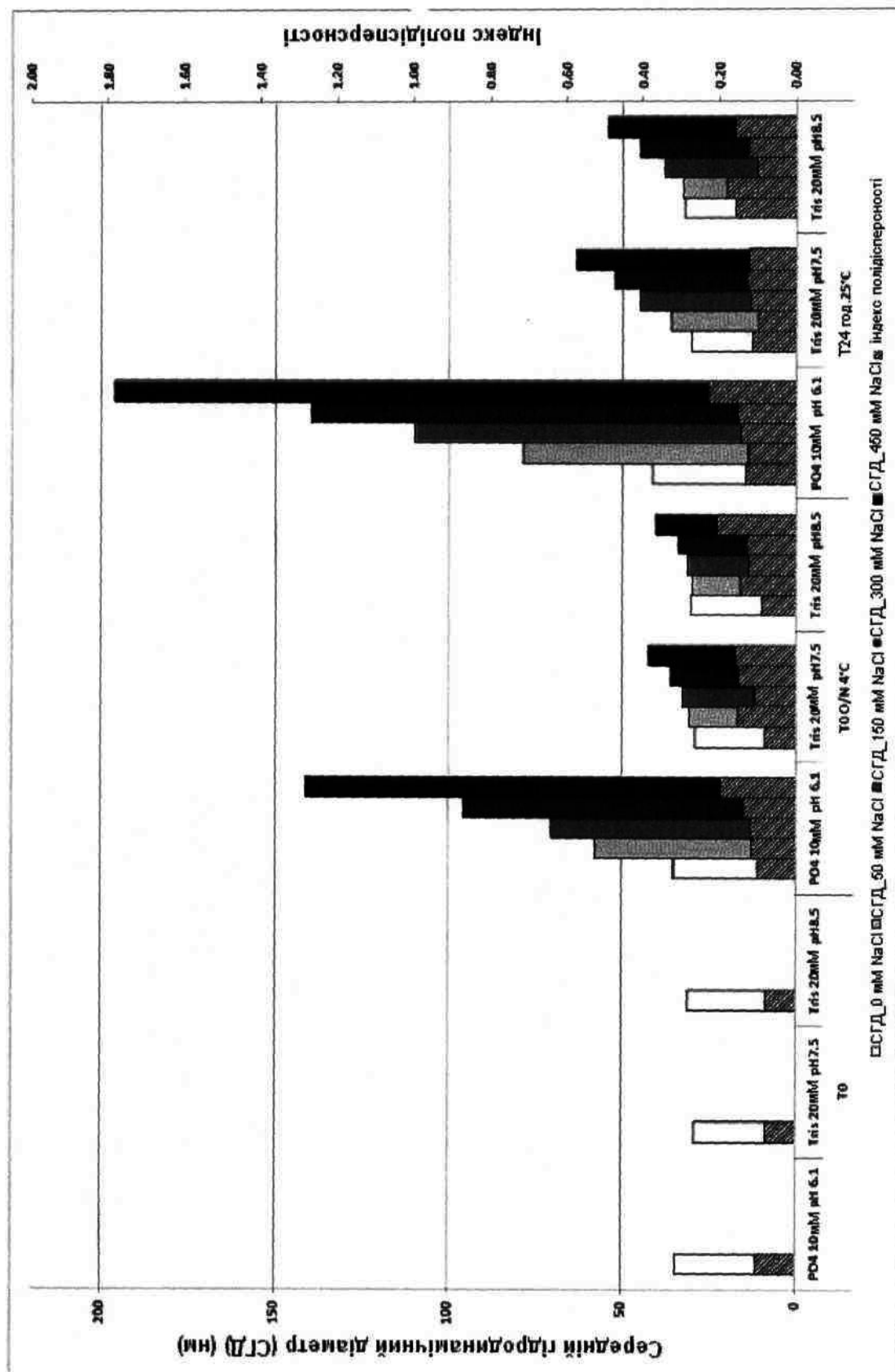
11. Імуногенна композиція згідно з п. 10, яка включає QS21.
12. Імуногенна композиція згідно з п. 10 або п. 11, яка містить 3-де-О-ацилований монофосфорилліпід А.
13. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-12, в якій осмоляльність складає 250-750 мОсм/кг.
14. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-13, де композиція забезпечується у вигляді одиначної дози, яка складає 50 мкл - 1 мл.
15. Імуногенна композиція згідно з п. 14, де одиначна доза містить 5-50 мкг білка, спорідненого з M72.
- 10 16. Імуногенна композиція згідно з п. 14 або п. 15, де одиначна доза є людською дозою та містить від 1 до 100 мкг 3D-MPL.
17. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з пп. 14-16, де одиначна доза є людською дозою та містить від 1 до 100 мкг QS21.
18. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-17, рН якої знаходиться у діапазоні від 7,5 до 8,5.
- 15 19. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-18, в якій антиген, споріднений з M72, включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.
20. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-18, в якій антиген, споріднений з M72, складається з послідовності, що має принаймні 90 % ідентичності з SEQ ID NO: 1.
21. Імуногенна композиція згідно з пунктом 20, в якій антиген, споріднений з M72, складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3.
- 20 22. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-21 для застосування у медицині.
23. Застосування імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-21 у виробництві лікарського засобу.
24. Імуногенна композиція за п. 22 або п. 23 для введення людині.
- 25 25. Спосіб профілактики, лікування або послаблення мікобактеріальних інфекцій, таких як інфекції, спричинені *Mycobacterium tuberculosis*, який полягає у застосуванні безпечної та ефективноі кількості імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-21.



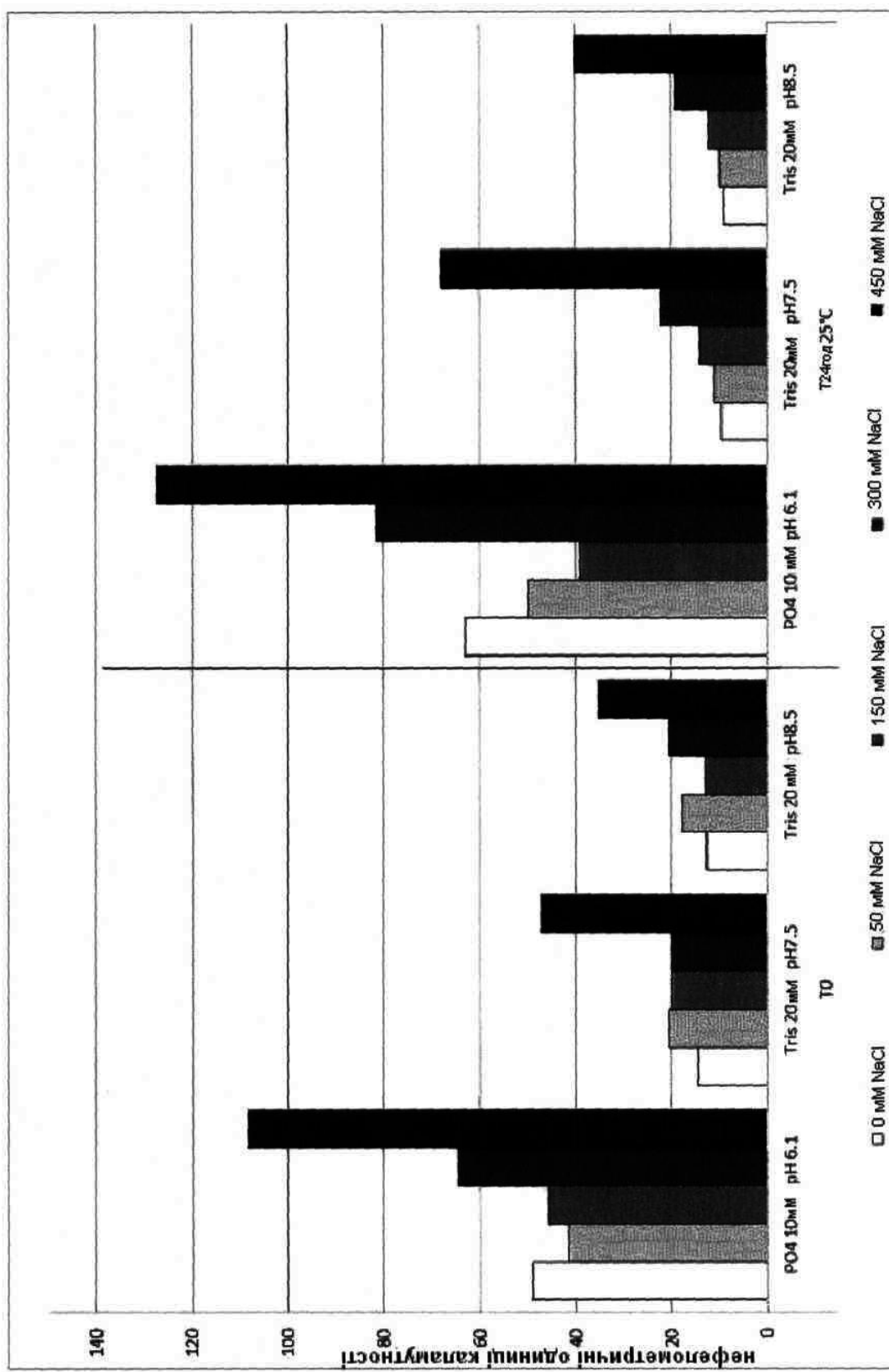
ФІГ. 1.



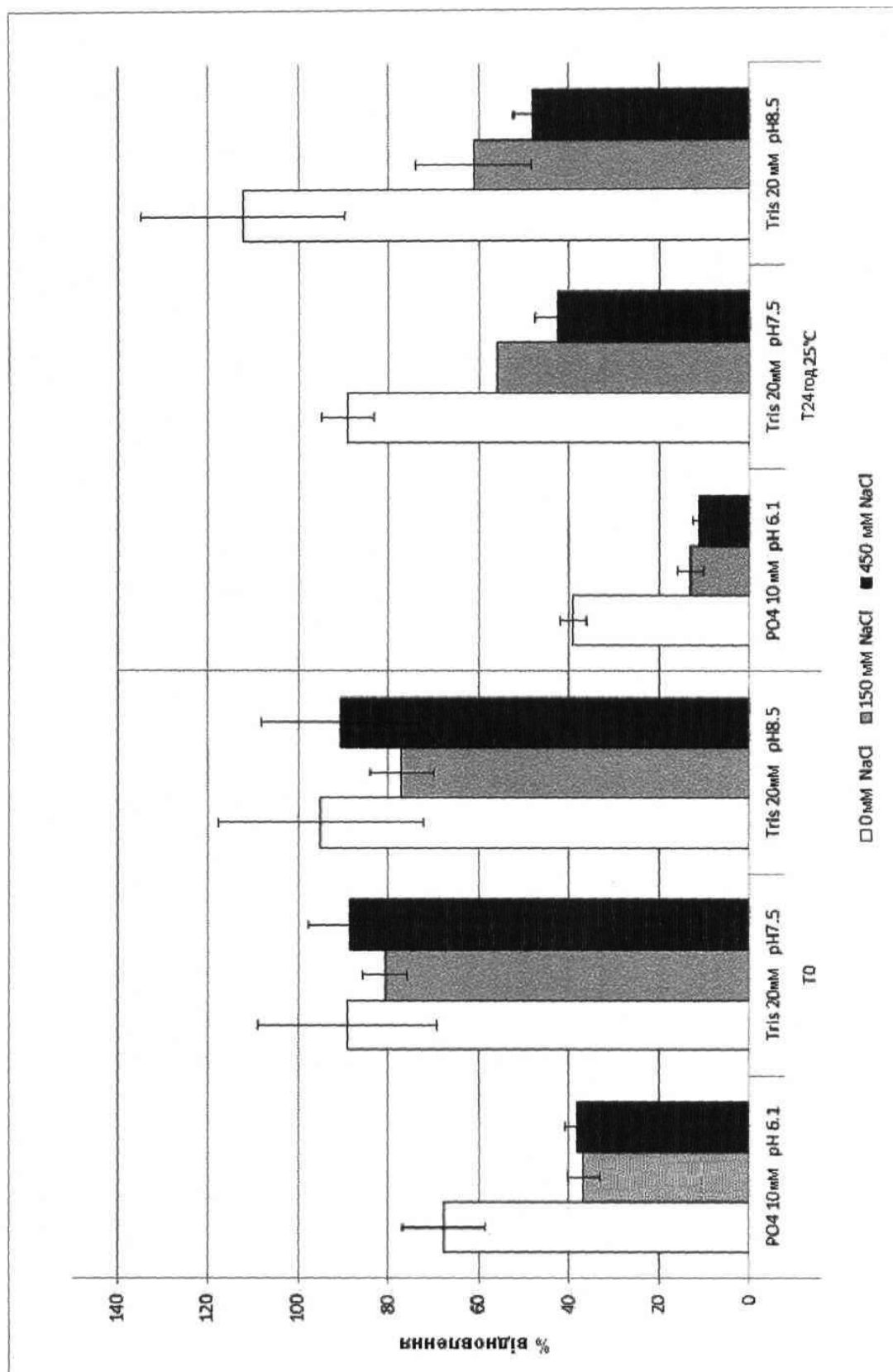
ФІГ. 2.



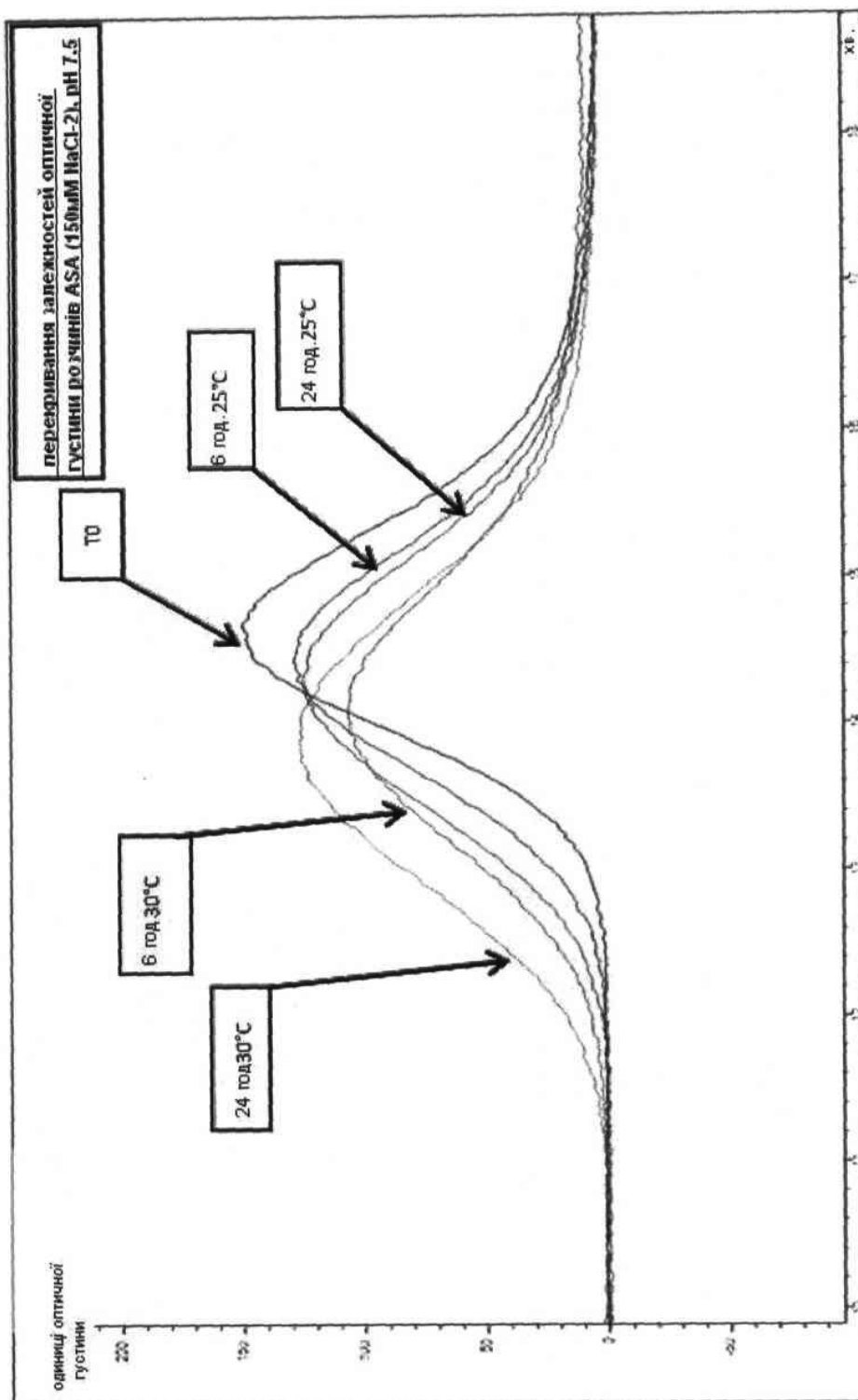
ФІГ. 3.



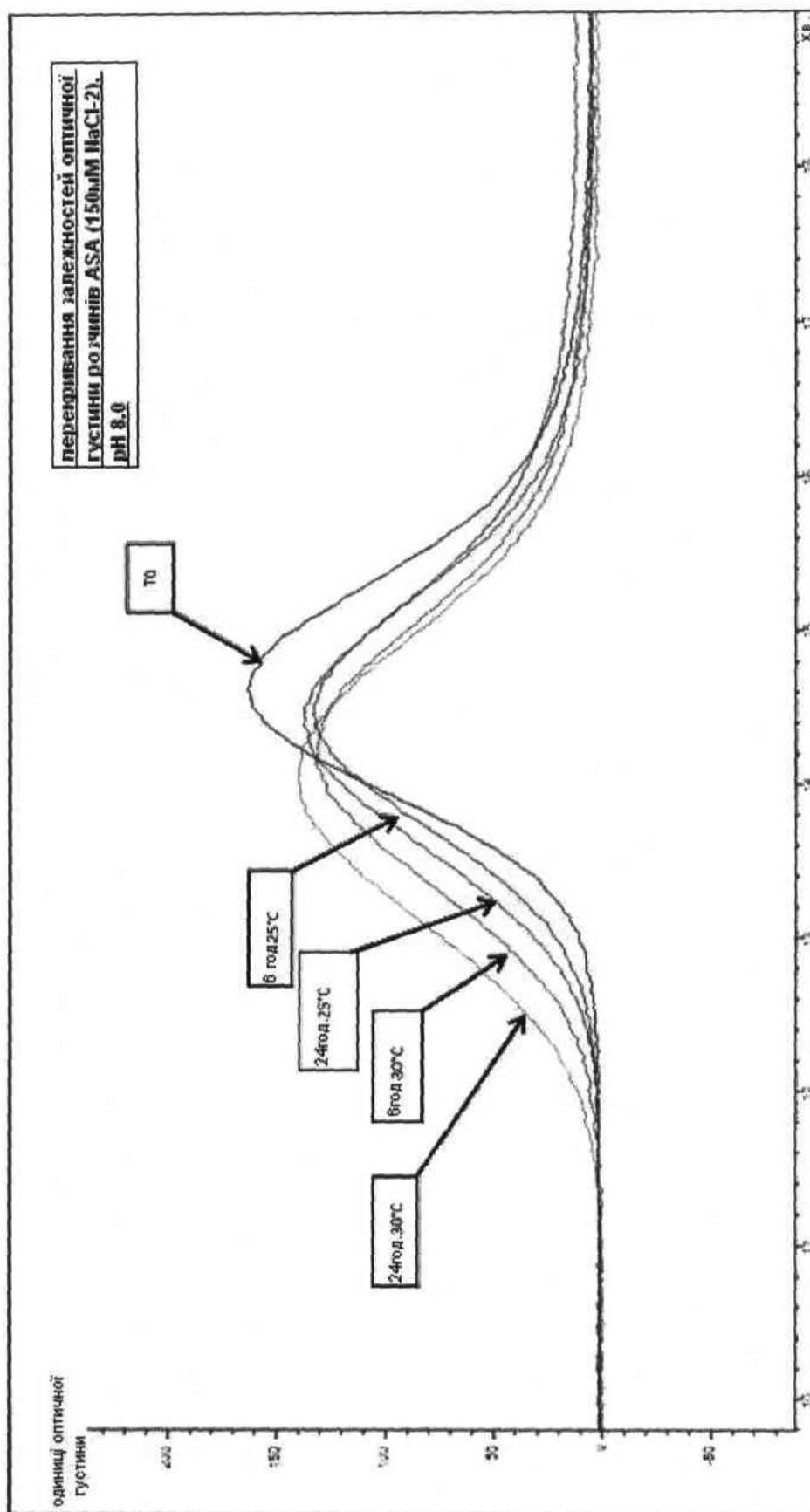
ФІГ. 4.



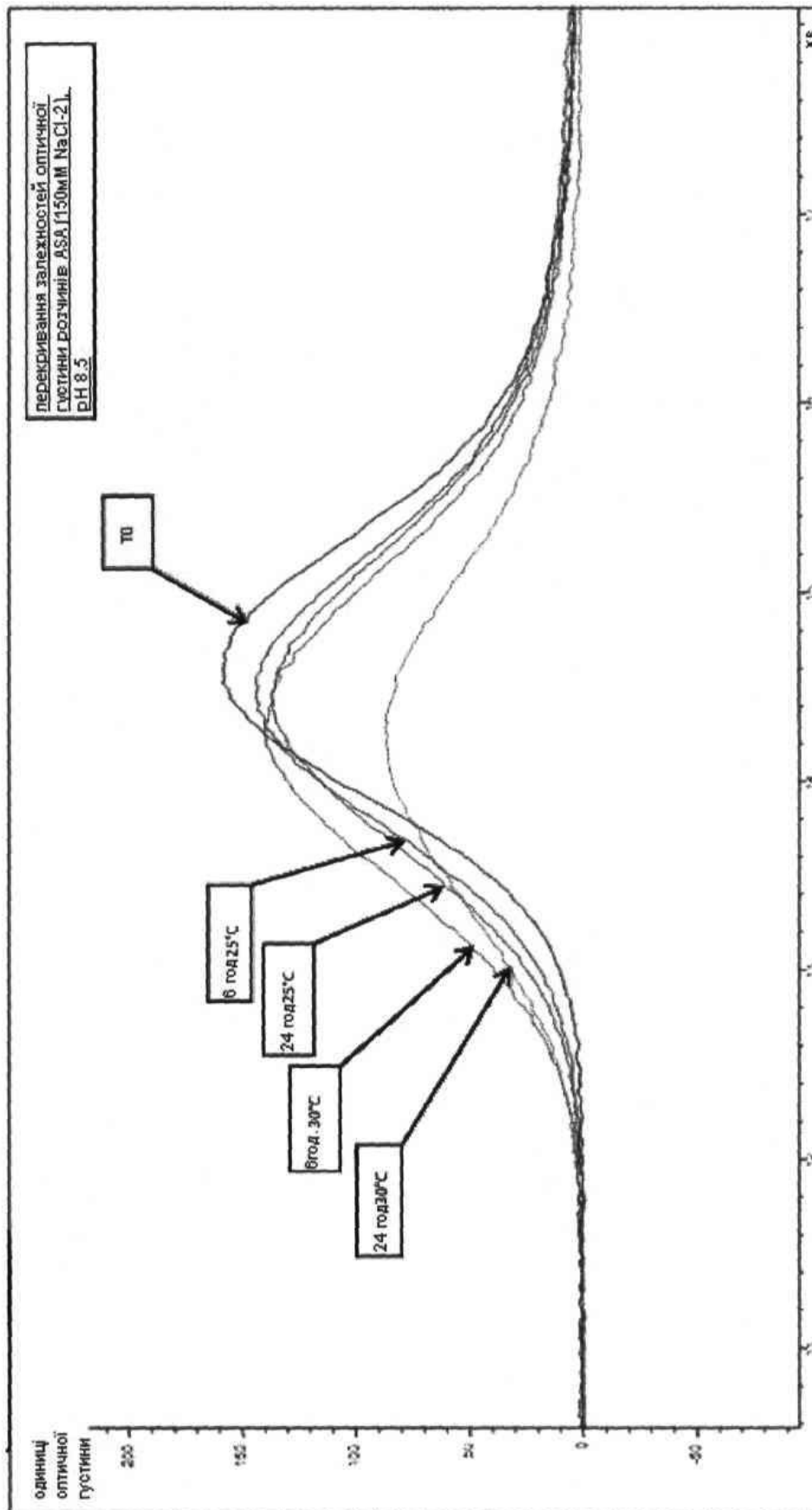
ФІГ. 5.



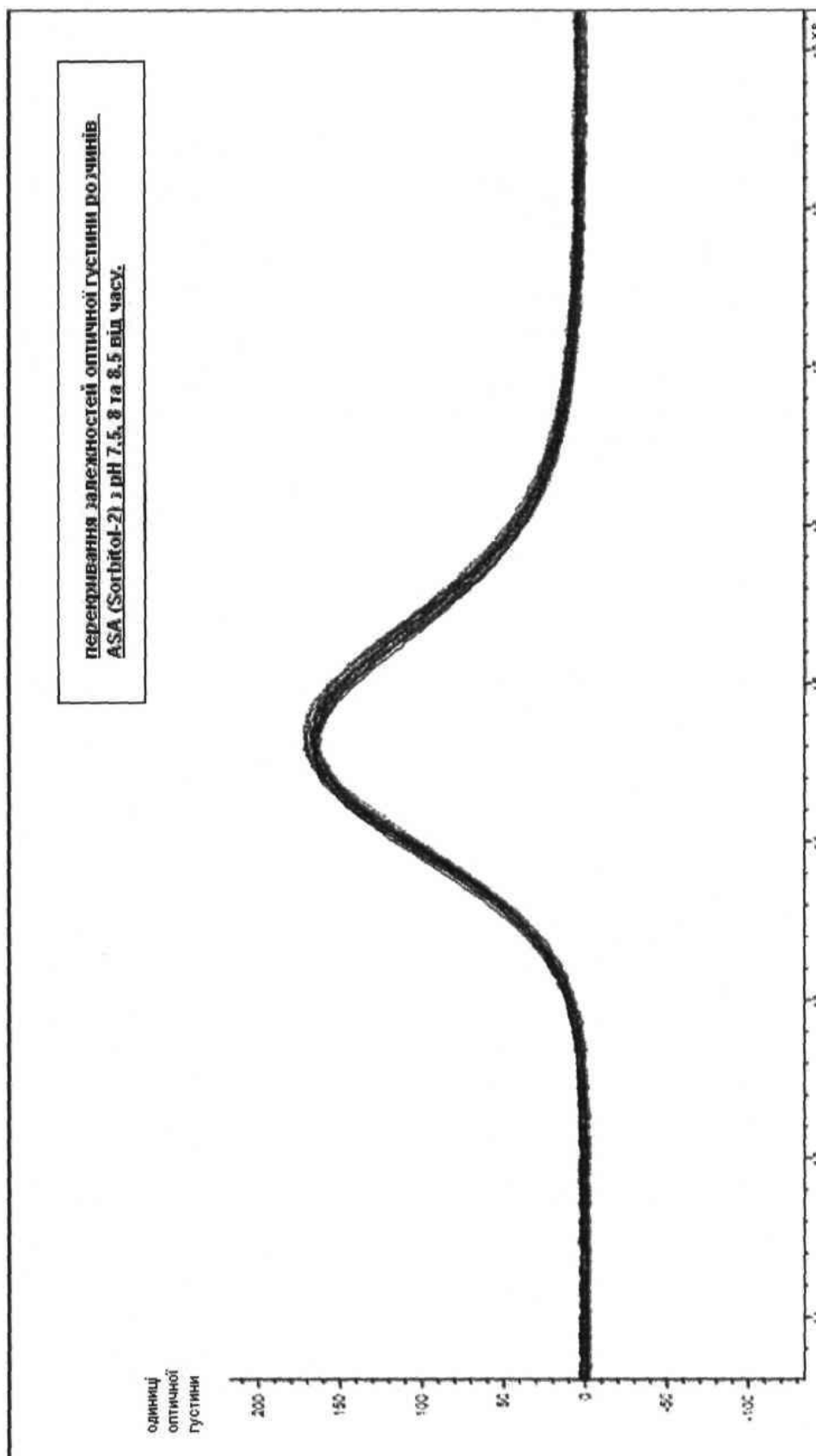
ФІГ. 6а.



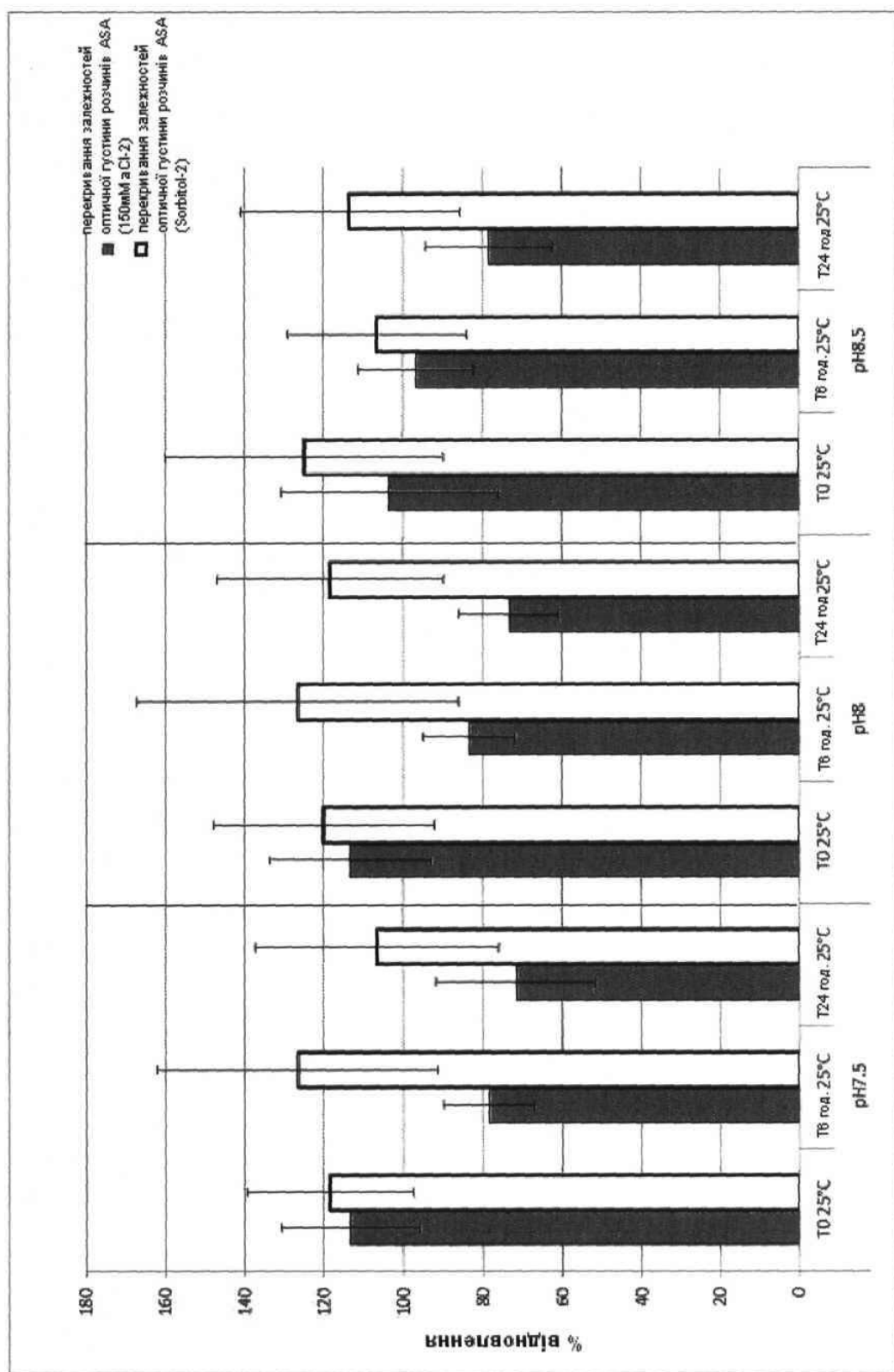
ФІГ. 6b.



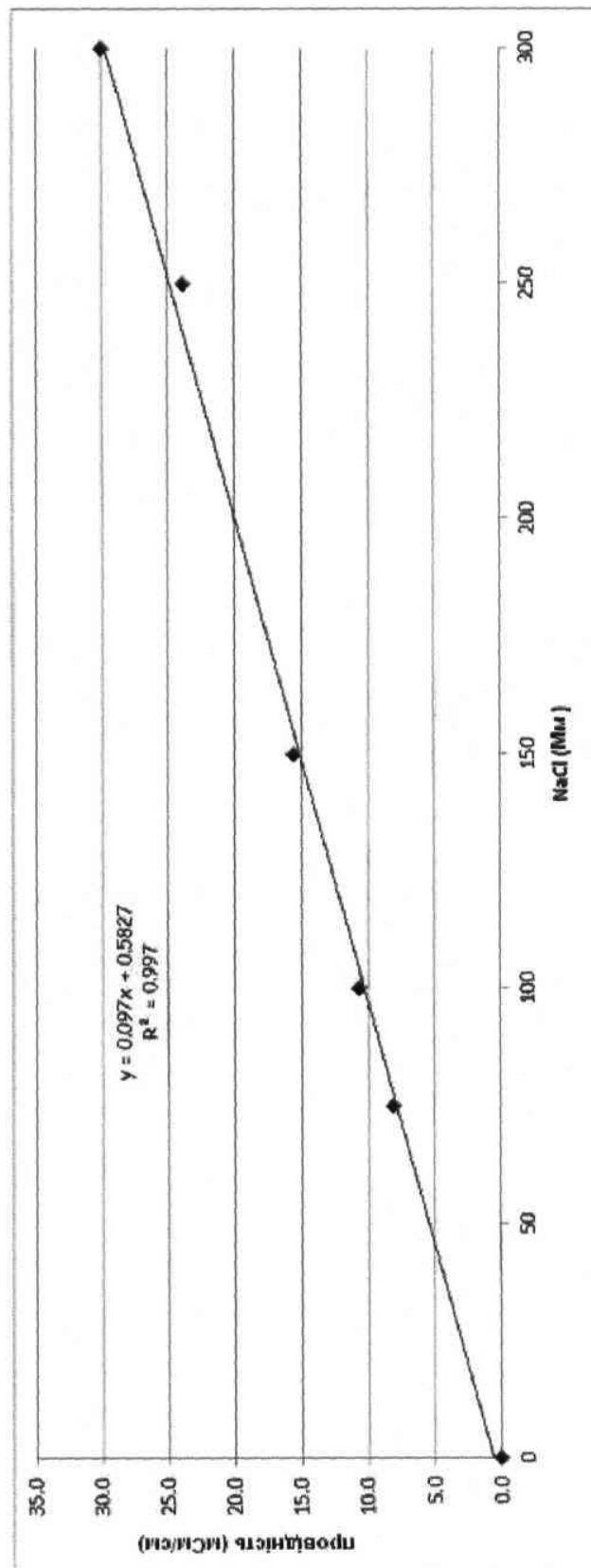
ФІГ. 6с.



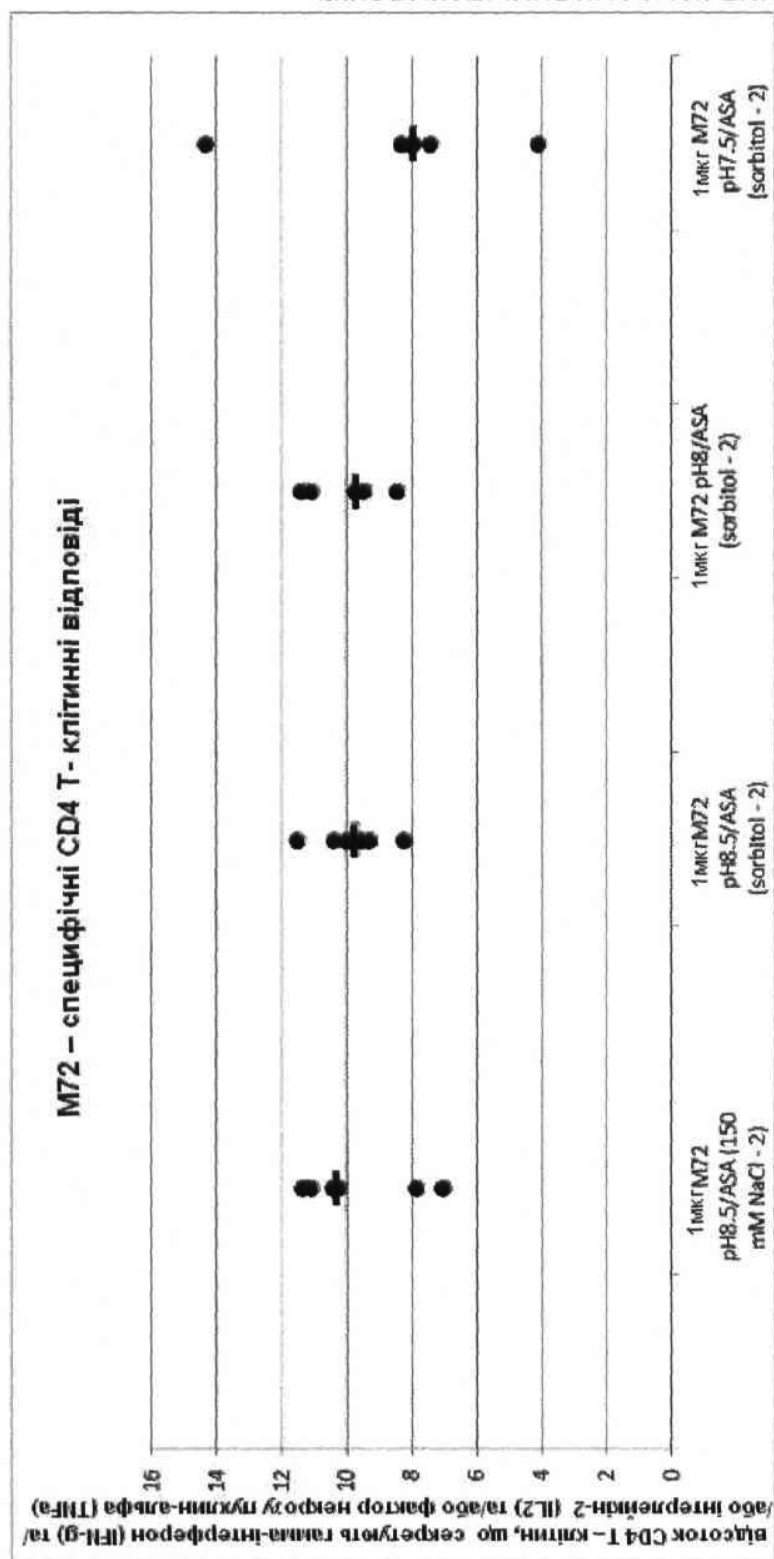
ФІГ. 6d.



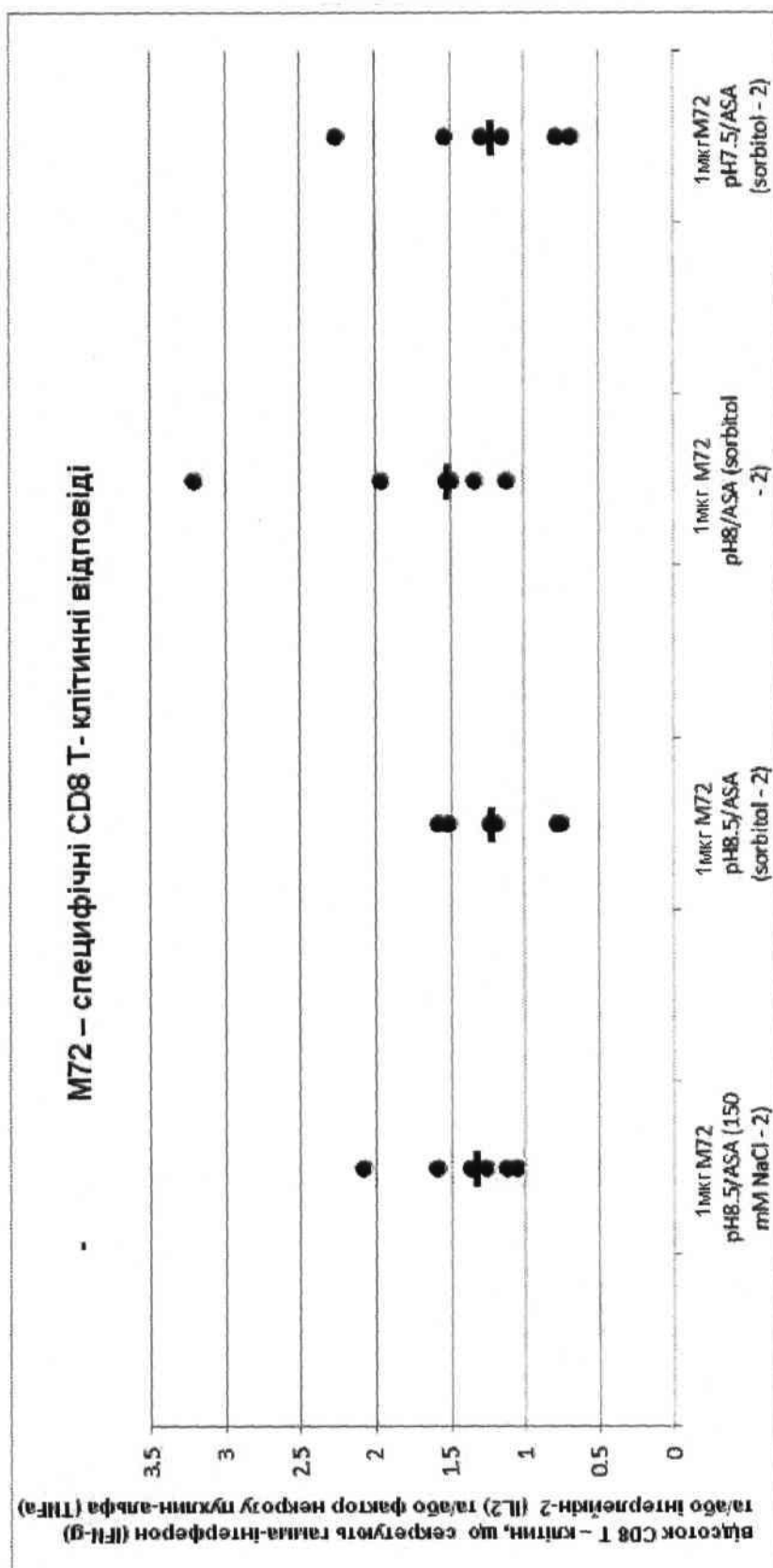
ФІГ. 7.



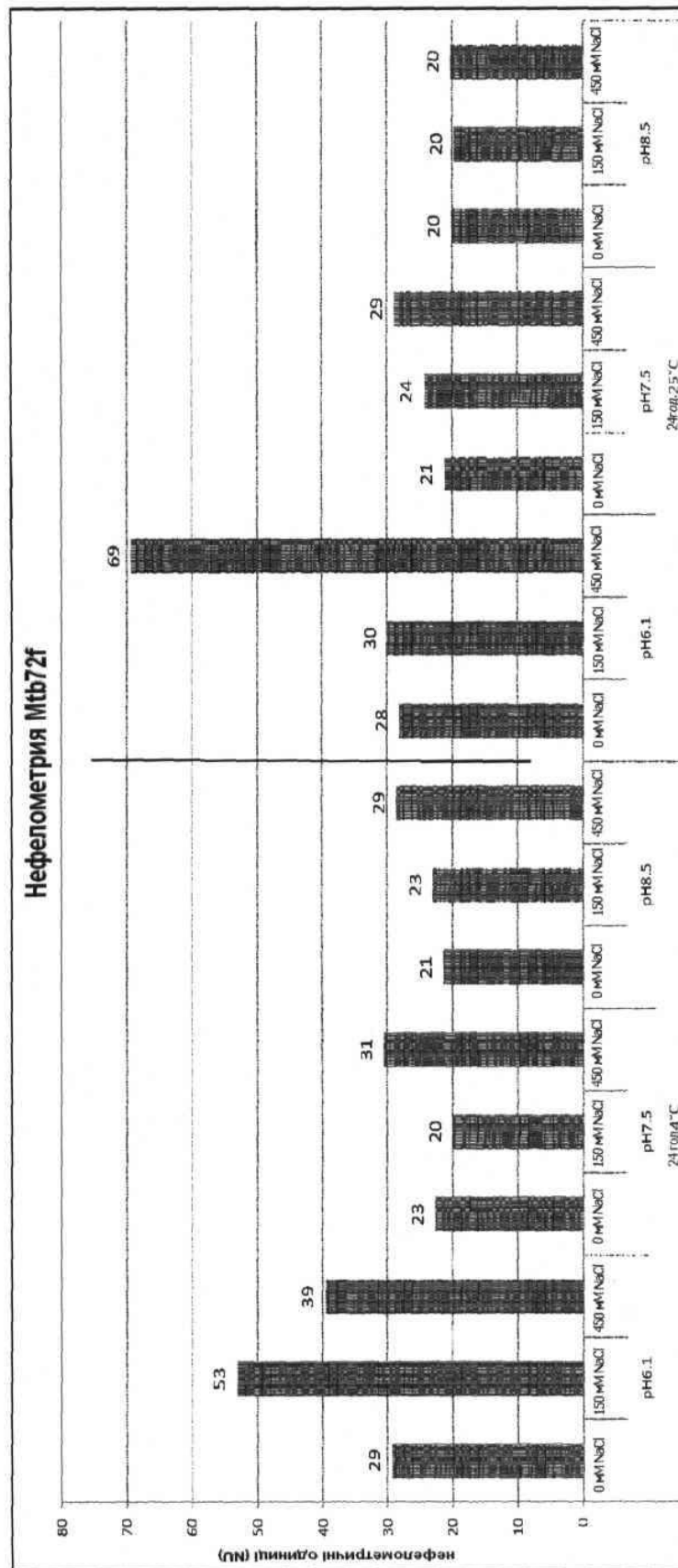
Фиг. 8.



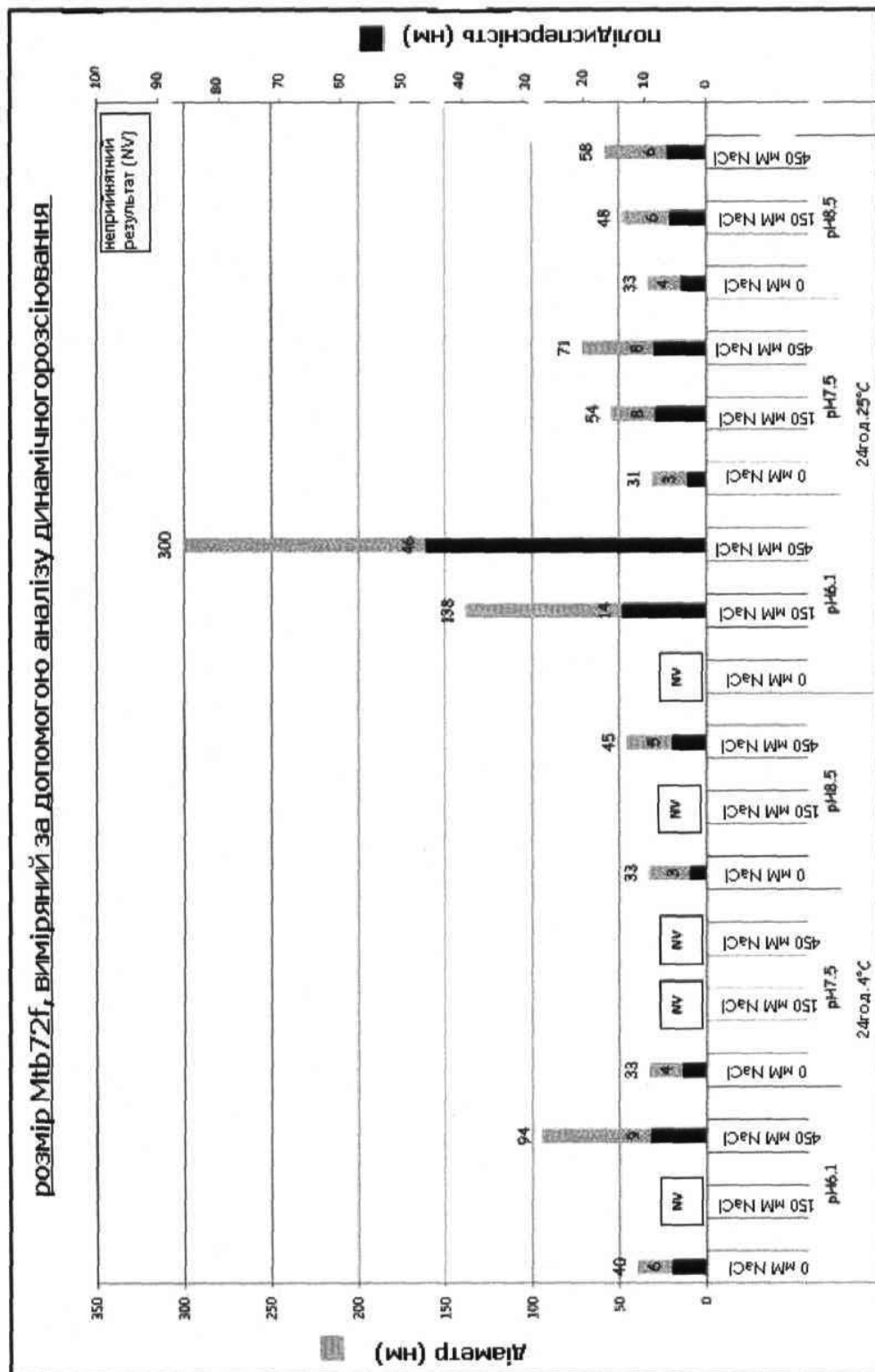
ФІГ. 9.



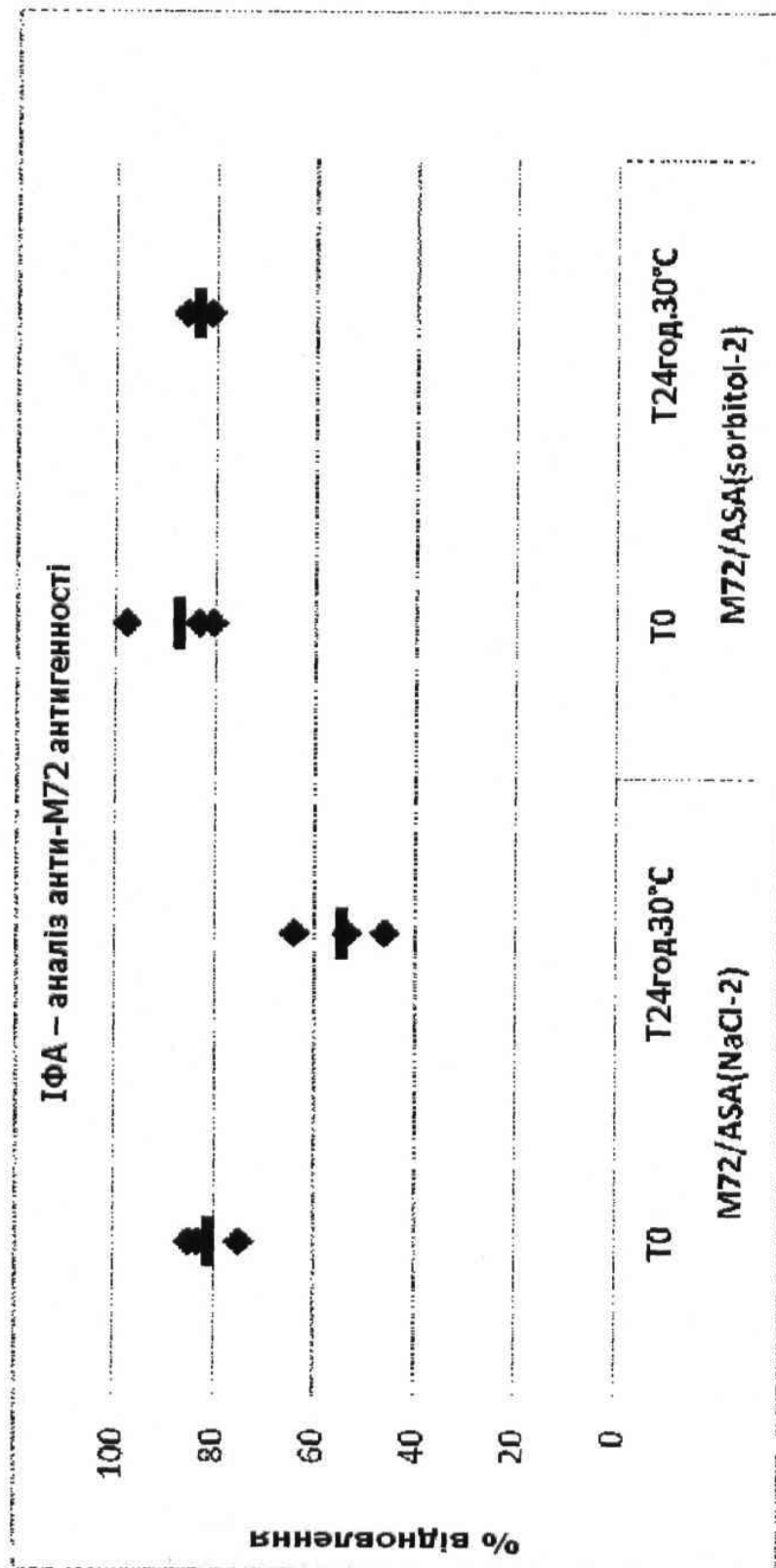
ФІГ. 10.



ФІГ. 11.



Фиг. 12.



ФІГ. 13.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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