



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 110806

(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 06356	(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:	25.02.2016	(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 WO 2010/142685 A1, 16.12.2010 WO 2010/142686 A1, 16.12.2010
(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:	25.02.2016, Бюл.№ 4		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2011/072817, 14.12.2011		

(54) МІКОБАКТЕРІАЛЬНА АНТИГЕННА КОМПОЗИЦІЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується імуногенної композиції, яка містить антиген, споріднений з Rv1196, де антиген, споріднений з Rv1196, включає (а) послідовність, що має принаймні 90 % ідентичності з послідовністю SEQ ID NO: 1 або (b) фрагмент послідовності SEQ ID NO: 1, який містить принаймні 350 амінокислот у довжину, та де електропровідність композиції складає 5 мСм/см або менше, а рН вказаної композиції лежить в інтервалі від 7,0, до 9,0.

UA 110806 C2

Заявлений винахід стосується імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком Rv1196 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 (ТБ) 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 з появою приблизно 9.4 мільйонів нових випадків туберкульозу 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).

Мікобактеріальний білок Rv1196 (описаний, наприклад, під назвою Mtb39a (Dillon et al *Infection and Immunity* 1999 67(6): 2941-2950) або його фрагменти або похідні є білковими антигенами, потенційно корисними для лікування або запобігання туберкульозу. Rv1196 є дуже консервативним білком, зі 100 % тотожністю послідовності між штамми H37Rv, C, Haarlem, CDC1551, 94-M4241A, 98-R604INH-RIF-EM, KZN605, KZN1435, KZN4207, KZNR506 та з одиничною точковою мутацією Q30K у штамі F11. Rv1196 є компонентом злитих (гібридних) білкових антигенів Mtb72f та M72, (що описані, наприклад, у міжнародній патентній заявці WO2006/117240).

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 компонента повинно бути розглянуто виробниками. Зокрема, повинна бути розглянута сумісність антигенного компонента 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 Rv1196 є особливо чутливими до наявності солей. Не обмежуючись теоретичним матеріалом, вважається, що антигени, споріднені з білком Rv1196, зазнають негативного впливу певного явища, відомого як "високоїонність", що 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 mM. Отже, стійкість імуногенних композицій, що містять антигени, споріднені з білком Rv1196 може несподівано бути збільшеною шляхом зменшення концентрації хлориду натрію.

Відповідно, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком Rv1196, де провідність композиції дорівнює 13 мСм/см або менше.

Додатково передбачено імуногенну композицію, що містить антиген, споріднений з білком Rv1196, де концентрація солей у вказаній композиції дорівнює 130 mM або менше.

Заявлений винахід також стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком Rv1196, де концентрація хлориду натрію у вказаній композиції дорівнює 130 mM або менше.

Стислий опис малюнків.

50 Фіг. 1. Крива літичної активності QS21.

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

Фіг. 3. Нефелометрія імуногенних композицій з різними pH та концентраціями NaCl після зберігання.

55 Фіг. 4. DLS імуногенних композицій з різними pH та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 5. DLS імуногенних композицій з різними pH та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 6. Нефелометрія імуногенних композицій з різними pH та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 7. Антигенна стійкість імуногенних композицій з різними pH та концентраціями NaCl, виміряна після зберігання.

60 Фіг. 8a-8d. Ексклюзивний ВЕРХ - аналіз імуногенних композицій з різними pH та

концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 9. Антигенність імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 10. Провідність стандартних розчинів NaCl.

5 Фіг. 11. Викликання CD4 Т-клітинних відповідей у мишей з застосуванням імуногенних композицій винаходу.

Фіг. 12. Викликання CD8 Т-клітинних відповідей у мишей з застосуванням імуногенних композицій винаходу.

10 Фіг. 13. Нефелометрія імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 14. DLS імуногенних композицій з різними рН та концентраціями NaCl після зберігання.

Фіг. 15. Антигенність імуногенних композицій з різними концентраціями NaCl після зберігання.

Стислий опис ідентифікаційних номерів послідовностей.

15 SEQ ID No: 1 Амінокислотна послідовність білка Rv1196 штаму H37Rv Mycobacterium tuberculosis.

SEQ ID No: 2 Нуклеотидна послідовність, що кодує білок Rv1196 штаму H37Rv Mycobacterium tuberculosis.

20 SEQ ID No: 3 Амінокислотна послідовність білка Rv1196 штаму F11 Mycobacterium tuberculosis.

SEQ ID No: 4 Нуклеотидна послідовність, що кодує білок Rv1196 штаму F11 Mycobacterium tuberculosis.

SEQ ID No: 5 Амінокислотна послідовність білка M72.

SEQ ID No: 6 Нуклеотидна послідовність, що кодує білок M72.

25 SEQ ID No: 7 Амінокислотна послідовність білка M72 з двома N-кінцевими His -залишками.

SEQ ID No: 8 Нуклеотидна послідовність, що кодує M72 білок з двома N-кінцевими His -залишками.

SEQ ID No: 9 Амінокислотна послідовність білка Mtb72f.

SEQ ID No:10. Нуклеотидна послідовність, що кодує білок Mtb72f.

30 SEQ ID No:11. Амінокислотна послідовність білка Mtb72f з шістьма N-кінцевими His -залишками.

SEQ ID No:12 Нуклеотидна послідовність, що кодує білок Mtb72f з шістьма N-кінцевими His -залишками.

SEQ ID No: 13 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 1 (CpG 1826).

35 SEQ ID No: 14 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 2 (CpG 1758).

SEQ ID No: 15 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 3.

SEQ ID No: 16 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 4 (CpG 2006).

SEQ ID No: 17 Нуклеотидна послідовність CpG Oligo 5 (CpG 1686).

40 У першому аспекті, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком Rv1196, де провідність композиції дорівнює 13 мСм/см або менше. Зокрема, заявлений стосується імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком Rv1196, 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 певному додатковому втіленні, провідність імуногенної композиції дорівнює 1.5-2.5 мСм/см.

50 У другому аспекті, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком Rv1196, де концентрація солей у вказаній композиції дорівнює 130 мМ або менше. Зокрема, заявлений винахід стосується імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком Rv1196, 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 окремому втіленні, концентрація солей у вказаній композиції дорівнює 20-40 мМ, як-то 25-35 мМ.

60 У третьому аспекті, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, що містить антиген, споріднений з білком Rv1196, де концентрація хлориду натрію дорівнює 130 мМ або менше. Зокрема, заявлений винахід стосується імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком Rv1196, 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 імуногенних композиціях 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 імуногенних композиціях 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 імуногенних композиціях 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 ізольована, 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).

5 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.

10 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 TB або реактивуванню легеневого захворювання у дорослому віці. На додачу до цього, деякі країни, як-то Сполучені Штати, не вакцинують

15 основну частину населення цим агентом. Було показано, що деякі білки, які сильно експресуються 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

20 контроль протягом латентної інфекції може вимагати присутності специфічних до певного антигену T – клітин, які повинні експресуватися на цьому етапі. У захисті проти реактивування TB 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

25 лікування латентного TB можуть значно та економічно скоротити глобальні показники TB 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

30 рекомбінантних штамів BCG). Білковий антиген Rv1196 має потенційну перевагу у лікуванні або запобіганні туберкульозу та описаний, наприклад, під назвою Mtb39a у Dillon et al (Infection and Immunity 1999 67(6): 2941-2950). Rv1196 є дуже консервативним білком, зі 100 % тотожністю послідовності між штамми H37Rv, C, Haarlem, CDC1551, 94-M4241A, 98-R604INH-RIF-EM, KZN605, KZN1435, KZN4207, KZNR506 та з одиначною точковою мутацією Q30K у штамі F11.

Білкові антигени Mtb72f та M72 є гібридними (злитими) білками, що містять Rv1196 та мають потенційну перевагу у лікуванні або запобіганні туберкульозу. Mtb72f, як було показано, забезпечує захист численних тваринних моделей (див., наприклад: Brandt et al Infect. Immun. 40 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). Також, Mtb72f є предметом клінічних досліджень (Von Eschen et al 2009 Human вакцини 5(7):475-482). M72 є покращеним антигеном, що має порівняно з Mtb72f одиначну мутацію заміщення серину на аланін, яка

45 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 Rv1196 “ має відношення до білка Rv1196, наведеного у SEQ ID No: 1 або його імуногенної похідної. Як тут застосовано, термін “ похідна ” має відношення до антигену, модифікованого відносно референсної

50 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.

55 Антиген, споріднений з білком Rv1196 може, наприклад, містити менш, ніж 1000 амінокислотних залишків, як-то менш, ніж 900 амінокислотних залишків, зокрема менш, ніж 800 амінокислотних залишків.

T – клітинними епітопами є короткі суміжні відрізки амінокислот, що впізнаються T - клітинами (наприклад, T-клітинами CD4+ або CD8+). Ідентифікацію T-клітинних епітопів можна

60 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 Rv1196 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 Rv1196, 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, вставлені додаткові амінокислоти. Відповідно, подібні вставки не виникають у епітопній ділянці, отже теж 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 вказаного 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. Natl. 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 вирівняних 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 співпадіння 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 самою" 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 цитофлуорометричним аналізом. Відповідно, під "істотно такою ж самою 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).

Відповідно антиген, споріднений з білком Rv1196 буде містити, як-то складатися з послідовності, що має принаймні 70 % тотожності до послідовності SEQ ID No: 1, як-то принаймні 80 %, зокрема принаймні 90 %, головним чином принаймні 95 %, наприклад, принаймні 98 %, як-то принаймні 99 % тотожності.

Специфічний приклад антигену, спорідненого з білком Rv1196 є білок Rv1196 зі штаму H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*, послідовність якого наведена у SEQ ID No: 1; отже, у одному втіленні винаходу, антиген, споріднений з білком Rv1196 є білком, що містить послідовність SEQ ID No: 1. У другому втіленні винаходу, антиген, споріднений з білком Rv1196 є білком, що складається з послідовності SEQ ID No: 1.

Додатковим прикладом антигену, спорідненого з білком Rv1196 є білок Rv1196 зі штаму F11 *Mycobacterium tuberculosis*, послідовність якого наведена у SEQ ID No: 3; отже, у одному втіленні винаходу, антиген, споріднений з білком Rv1196 є білком, що містить послідовність SEQ ID No: 3. У другому втіленні винаходу, антиген, споріднений з білком Rv1196 є білком, що складається з послідовності SEQ ID No: 3.

Типові антигени, споріднені з білком Rv1196 будуть містити, як-то складатися з імуногенної похідної послідовності SEQ ID No: 1, що має невелику кількість делецій, вставок та/або заміщень. Такими прикладами є послідовності, 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 Rv1196 містять, як-то складаються з фрагмента послідовності SEQ ID No:1, що має розмір принаймні 250 амінокислот у довжину, як-то принаймні 300 амінокислот у довжину або принаймні 350 амінокислот у довжину.

Додаткові імуногенні похідні Rv1196 містять, як-то складаються з фрагмента послідовності SEQ ID No: 3, що має розмір принаймні 250 амінокислот у довжину, як-то принаймні 300 амінокислот у довжину або принаймні 350 амінокислот у довжину або принаймні 380 амінокислот у довжину.

Антигени, споріднені з білком Rv1196 можна отримати за допомогою попередньо описаних способів (наприклад, Dillon et al *Infection and Immunity* 1999 67(6): 2941-2950; WO2006/117240), 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 Rv1196 з метою запобігання та лікування туберкульозу або додаткові антигени можуть бути пов'язаними з іншими патогенами

та призначеними для застосування зі спорідненим з білком Rv1196 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 полінуклеотиди (або полінуклеотидів).

5 Окремі імуногенні похідні білка Rv1196 охоплюють злиті (гібридні) білки, що містять послідовність, що має принаймні 70 % тотожності до послідовності SEQ ID No: 1, як-то принаймні 80 %, зокрема принаймні 90 %, головним чином принаймні 95 %, наприклад, принаймні 98 %, як-то принаймні 99 % тотожності.

10 Зразкові злиті білки, що містять білок Rv1196 також містять: M72 (SEQ ID No: 5) та його варіанти, як-то варіанти з додатковими His – залишками на N- кінці (наприклад, два His- залишка, як наведено у SEQ ID No: 7; або з полігістидиновою міткою з 5 або особливо 6 His - залишків, що може бути застосована для афінного очищення з іонами нікелю); Mtb72f (SEQ ID No: 9), що містить оригінальний сериновий залишок, який у білку M72 є підданим мутації, 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).

20 У окремих втіленнях, антиген, споріднений з білком Rv1196 містить, як-то складається з послідовності, що має принаймні 90 % тотожності до послідовності SEQ ID No: 5, головним чином принаймні 95 %, наприклад, принаймні 98 %, як-то принаймні 99 % тотожності. У інших втіленнях, антиген, споріднений з білком Rv1196 містить, як-то складається з послідовності, що має принаймні 90 % тотожності до послідовності SEQ ID No: 7, головним чином принаймні 95 %, наприклад, принаймні 98 %, як-то принаймні 99 % тотожності.

25 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.

30 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.

35 Звичайно, у якості ізотонічного агента застосовують хлорид натрію (NaCl). Винахідники спочатку показали, що антигени, споріднені з білком Rv1196 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.

40 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, споріднений з білком Rv1196 та додатково бути сумісним з іншими компонентами, як-то імуностимулятором (імуностимуляторами).

45 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 C3-6. 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.

50 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.

55 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 преобладаючих 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, холестериним. Існують також деякі окремі форми менш реактогенних композицій, де QS21 є "згашеним" холестериним. 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., page 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 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 безпосередньо шляхом генерації ендогенного 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

30 Якщо у 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.

40 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 WO96/02555, 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.

50 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.

55 Приклади прийнятних 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 Rv1196; та

б. відновлення ліофілізованого антигену, спорідненого з білком Rv1196 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 Rv1196; та

б. відновлення ліофілізованого антигену, спорідненого з білком Rv1196 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 Rv1196; та

б. відновлення ліофілізованого антигену, спорідненого з білком Rv1196 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) (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, сапонін у ліпосомному препараті та неіонний ізотонічний агент, як тут описано, як-то поліол. Зокрема, водні розчини можуть містити сорбіт.

5 Також передбачено набір, що містить:

- a. ліофілізований антиген, споріднений з білком Rv1196; та
- b. 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:

- a. ліофілізований антиген, споріднений з білком Rv1196; та
- b. 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:

- a. ліофілізований антиген, споріднений з білком Rv1196; та
- b. водний розчин, 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 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.

5 Також набори можуть додатково містити інструкції по відновленню ліофілізованого спорідненого з білком Rv1196 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.

10 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*.

15 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:

20 - 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

25 - 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.

30 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.

35 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).

40 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).

45 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*.

55 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 одиначної 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.

60 Кількість антигену, спорідненого з білком Rv1196, що знаходиться у одиначній дозі залежить від клінічних потреб, але одиначна доза, передбачена для застосування до людини буде

звичайно знаходиться 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 Rv1196.

Відповідно, композиції винаходу вважаються стійкими, якщо їх антигенність, виміряна за допомогою описаних тут способів після зберігання протягом 24 годин при 25 °С 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 °С. 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 °С.

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 монофосфори́л - ліпід А та QS21. Цю композицію отримали наступним чином:

А. спосіб отримання ліпосом:

Суміш ліпиду (DOPC), холестерину та 3-де-О-ацильованого монофосфори́л - 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 \pm 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 \pm 0.1.

Стерильну фільтрацію отриманого продукту здійснили за допомогою фільтру з поліетилсульфону (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 °С.

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 монофосфори́л - ліпід А та QS21. Цю композицію отримали наступним чином:

А. спосіб отримання ліпосом:

Суміш ліпиду (DOPC), холестерину та 3-де-О-ацильованого монофосфори́л - 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 (поліетилсульфонової) мембрани.

В. Отримання ASA:

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 відповідного досягнення концентрацій фосфатного буферу та NaCl у кінцевому препараті у 10 мМ та 150 мМ 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±0.1.

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

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.

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

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 %.

10 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 %*

15 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.

20 За своїм хімічним складом, 3D-MPL є сумішшю 3-де-О-ацильованого монофосфорил - 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.

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

30 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 змін 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 (ТБАОН) у якості іонопарного реагента. 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 мМ фосфат, 5 мМ 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 мМ NaCl та 10 мМ 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 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.

В. Отримання ASA:

Для розведення концентрованих ліпосом, десятикратно розбавлений 100 мМ Na₂/K фосфатний буфер (pH 6.1) додали до води для ін'єкцій до досягнення концентрації фосфатного буферу у кінцевому препараті у 10 мМ, 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 мМ NaCl та 10 мМ 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 мМ 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:

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.

5 В. Отримання ASA:

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.

Стерильну фільтрацію отриманого продукту здійснили за допомогою фільтру з поліетилсульфону (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.

20 Приклад 8: Дослідження “ висолювання ” у композиціях, що містили Rv1196 з різними сольовими концентраціями з pH 6.1, 7.5 та 8.5.

У цьому Прикладі, за допомогою оцінки за розміром, був досліджений вплив концентрації хлориду натрію та pH на стійкість антигену Rv1196.

Отриманий від Corixa Corporation білок Rv1196 (SEQ ID No: 1) розвели до концентрації 100 мкг /мл у трьох різних буферах (10 мМ фосфатний буфер з pH 6.1, 20 мМ Tris-буфер з pH 7.5 та 20 мМ Tris-буфер з pH 8.5), що містили кінцеві концентрації NaCl у 0, 150 та 450 мМ. Потім зразки зберігали протягом 24 год. при 4 °C або при 25 °C перед початком аналізу.

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 °C. Середній гідродинамічний діаметр та індекс полідисперсності (pl) обчислювали за допомогою програмного забезпечення приладу.

35 Результати цього експерименту наведені у Фіг. 3 та 4.

Нефелометрія демонструє загальну тенденцію зникнення прозорості зі збільшенням концентрації солей, вказуючи на те, що Rv1196 є чутливим до концентрації солі.

Для більшості зразків DLS, прилад був нездатним визначити точний розмір частинок (позначено, як NV у Фіг. 4). Тим не менш, при отриманні порівняльних даних (тобто 0 або 150 нМ NaCl з pH 8.5) стало ясно, що концентрація хлориду натрію впливає на виміряний розмір частинок у імуногенних композиціях Rv1196.

Приклад 9: Отримання білкових антигенів M72 з двома N-кінцевими залишками His (SEQ ID No: 7).

Для отримання вектора експресії M72, за допомогою послідовного зв'язку в тандемі відкритих рамок зчитування (ORF), що кодують C - кінцевий фрагмент Mtb32a до повнорозмірної ORF Mtb39a, що знаходиться на C – кінці з N – кінцевою часткою Mtb32a, була отримана плазмід, 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 C - кінцях (у випадку C - 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.

55 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 плазмід за допомогою ферментної реакції, очистили у гелі та лігували у вектор pET, після чого була здійснена перевірка послідовності отриманої рекомбінантної плазмід. Ця плазмід кодує M72 під контролем промотора T7. Експресія РНК - полімерази T7 керується з геномного інтегранта у

хазяїні експресії, який індукують з застосуванням системи на основі λ с - оперону (λ сl) та хімічного сигналу індукції ІПТГ. Експресія плазміди також охоплює експресію гена стійкості до канаміцину.

5 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.

10 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.

15

Інгредієнт	Концентрація		
KH_2PO_4	14,83 г/л		
K_2HPO_4	1,65 г/л		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	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		
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		3,3 г/л	
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		58 г/л	
розчин мікроелементів ⁽²⁾ :		116 мл/л	
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			7,65 г/л
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			5,28 г/л
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			1,1 г/л
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			1,1 г/л
- H_3BO_3			0,3 г/л
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			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	
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$		61.7 г/л	
рН середовища був доведений до 6,5 розчином NaOH (25 %)			
Середовище відфільтрували через 0,22 мкм фільтр			

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

(2) розчин відфільтрували через 0.22 мкм фільтр.

20

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 мл рідкої прекультури.

25

Композиція культурального середовища

Інгредієнт	Концентрація	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,63 г/л	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,056 г/л	
розчин мікроелементів ⁽¹⁾ :	1,91 мл/л	
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		7,65 г/л
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		5,28 г/л
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		1,1 г/л
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		1,1 г/л
- H_3BO_3		0,3 г/л

Композиція культурального середовища

Інгредієнт	Концентрація	
- 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; рН був доведений до 11,0 25 % розчином NaOH

- 5 Протягом фази зростання, значення рН підтримували у межах $6,8 \pm 0,2$ шляхом періодичного додавання 25 % NH₄OH та 25 % H₃PO₄ (все - в обсяговому співвідношенні). Після 16-годинного інкубування при 30°C було започатковано зростання культури з підживленням у відповідному для такого зростання середовищі.

Композиція середовища для зростання з підживленням		
Інгредієнт	Концентрація	
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,98 г/л	
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,178 г/л	
розчин мікроелементів ⁽¹⁾ :	6,02 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
- 37 % HCl	1,24 мл/л	
глутамат натрію	5 г/л	
дріжджовий екстракт	40 г/л	
87 % гліцерин	590 мл/л	
розчин біотину ⁽²⁾ :	2 мл/л	
- біотин		1 г/л
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,66 г/л	
розчин відфільтрували через 0,22 мкм фільтр,		

(1) розчин відфільтрували через 0,22 мкм фільтр.

(2) рН був доведений до 11,0 25 % розчином NaOH; розчин відфільтрували через 0,22 мкм фільтр

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. Тільця 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 10: 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: 7, отриманий, як наведено у Прикладі 9) 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 $^{\circ}\text{C}$).

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. Нефелометрию 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. 5-7 свідчать про те, що спочатку стійкість розчинів, що містять антиген, споріднений з білком Rv1196, особливо 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.

Отже, переваги заявленого винаходу поширюються також на послідовності, що містять антигени, споріднені з білком Rv1196, а не тільки на виключно антигенні послідовності Rv1196.

Приклад 11: Запобігання “ висолювання ” композицій, що містили M72 та імуностимулятори, де у якості ізотонічного агента було застосовано сорбіт.

Для порівняння стійкості імуногенних композицій, що містять 150 mM 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 pH:

(а) M72 з двома N-кінцевими His – залишками, бажане значення pH 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 pH 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:7), отриману, як наведено у Прикладі 9), до досягнення кінцевої концентрації білка у 25 мкг/мл. Потім суміш перемішували протягом 10 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки. Перевірене значення pH 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 pH 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 pH 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:7), отриману, як наведено у Прикладі 9), до досягнення кінцевої концентрації білка у 25 мкг/мл. Потім суміш перемішували протягом 10 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки. Перевірене значення pH суміші дорівнювало 8.8.

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

(c) M72 з двома N-кінцевими His – залишками, бажане значення pH 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 pH 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:7), отриману, як наведено у Прикладі 9), до досягнення кінцевої концентрації білка у 25 мкг/мл. Потім суміш перемішували протягом 10 хв. при кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки. Перевірене значення pH суміші дорівнювало 8.8.

Потім у скляні флакони обсягом 3 мл додали по 0.5 мл отриманої суміш 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) pH 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

10 мкг антигену (20 мкг/мл)

5 % (ваги/обсягу) цукрози

16 мМ 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 8.0
- (iii) M72 з двома N-кінцевими His - залишками – ASA(150 mM NaCl – 2) pH 7.5
- 5 10 мкг антигену (20 мкг/мл)
- 5 % (ваги/обсягу) цукрози
- 12.5 mM Tris
- 0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
- 500 мкг DOPC
- 10 125 мкг холестерину
- 25 мкг 3D-MPL
- 25 мкг QS21
- 150 mM NaCl
- 10 mM фосфату
- 15 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
- 40 mM Tris
- 20 0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
- 500 мкг DOPC
- 125 мкг холестерину
- 25 мкг 3D-MPL
- 25 мкг QS21
- 25 5 mM NaCl
- 4.7 % (ваги/обсягу) сорбіту
- 10 mM фосфат
- pH 8.5
- (v) M72 з двома N-кінцевими His - залишками – ASA (сорбіт – 2) pH 8.0
- 30 10 мкг антигену (20 мкг/мл)
- 5 % (ваги/обсягу) цукрози
- 16 mM Tris
- 0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
- 500 мкг DOPC
- 35 125 мкг холестерину
- 25 мкг 3D-MPL
- 25 мкг QS21
- 5 mM NaCl
- 4.7 % (ваги/обсягу) сорбіту
- 40 10 mM фосфат
- pH 8.0
- (vi) M72 з двома N-кінцевими His - залишками – ASA (сорбіт – 2) pH 7.5
- 10 мкг антигену (20 мкг/мл)
- 5 % (ваги/обсягу) цукрози
- 45 12.5 mM Tris
- 0.02 % (ваги/обсягу) Tween80
- 500 мкг DOPC
- 125 мкг холестерину
- 25 мкг 3D-MPL
- 50 25 мкг QS21
- 5 mM NaCl
- 4.7 % (ваги/обсягу) сорбіту
- 10 mM фосфат
- pH 7.5
- 55 Характеристичний аналіз вищеописаних відновлених імуногенних композицій проводили після їх зберігання при 25 °C або 30 °C (T0, T6 год. та T24 год.).
- Ексклюзійний ВЕРХ - аналіз проводили шляхом ін'єкції на колонці TOSOH TSK-Gel5000PwXl (з внутрішнім діаметром 7.8 мм x 30 см), врівноважений 20 mM буфером Tris, pH 8.5, УФ – визначення з довжиною хвилі у 210 нм та швидкістю потоку 0.5 мл/хв.
- 60 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.

5 Результати наведені у Фіг. 8a-8d та 9.

Профілі результатів ексклюзійного ВЕРХ - аналізу залишалися стійкими після відновлення у низькосольових композиціях з застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента з кожним значенням рН (тобто рН 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 °C або 30 °C. Ці змінення ставали більш інтенсивнішими при зменшенні рН композиції з 150 мМ NaCl.

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 рН (тобто рН 7.5, 8.0 та 8.5) протягом часу до 24 годин при 30 °C.

Приклад 12: 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.

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 9. Для дослідження частки самого антигену та будь-якого з матеріалів залишків у очищеній композиції, також були отримані ліофілізовані зразки осаду плацебо без антигенного компоненту.

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).

30 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. 10

Провідність тестових розчинів

35

Опис розчину	Концентрація NaCl (мМ)	Провідність (мСм/см)	Еквівалентна концентрація NaCl (мМ)
ASA (сорбіт – 2)	5	1,46	9
плацебо рН 8.0 / ASA(сорбіт – 2)	5	1,95	14
M72 рН 8.0 / ASA (сорбіт – 2)	5	1,96	14
плацебо рН 8.5 / ASA (сорбіт – 2)	5	2,36	18
M72 рН 8.5 / ASA (сорбіт – 2)	5	2,28	17
ASA(150 мМ NaCl – 2)	150	16	159
плацебо рН 8.5 / ASA(150 мМ NaCl – 2)	150	14,8	147
M72 рН 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 Rv1196 мали порівняно аналогічну провідність.

40

Приклад 13: 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:

- 5 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.

- 10 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 11). Викликані M72 - специфічні Т-клітинні відповіді (CD4 та CD8 Т-клітинні відповіді) вимірювали через 6 днів після останньої імунізації (6dPIII).

- 15 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
- 20 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.

- 25 Кожне вимірювання у Фіг. 11 та 12 являє собою M72- специфічну CD4 або, відповідно, CD8 Т – 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 Т – 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.

- 30 Результати, наведені у Фіг. 11 та 12 показали наявність індукування порівняльних CD4 та CD8 Т-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 Т-клітинних відповідей.

Приклад 14: Дослідження “висолювання” у композиціях, що містять M72 з CaCl₂ або MgSO₄ зі значеннями pH 6.1 та 8.0.

- 35 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.

- 40 Очищену партію антигену (M72 з двома N-кінцевими His - залишками, SEQ ID No: 7) розчинили до концентрації 100 мкг/мл у двох різних буферах (10 мМ сукцинатний буфер з pH 6.1 та 10 мМ Tris-буфер з pH 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.

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

45

Група	Сіль	Буфер	pH (теоретичне значення)	Провідність (мСм/см) (виміряна)	pH (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

Група	Сіль	Буфер	pH (теоретичне значення)	Провідність (мСм/см) (виміряна)	pH (виміряне значення)	Візуальне спостереження
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

Результати вказують на те, що розчини, що містять антигени, споріднені з білком Rv1196 можуть бути чутливими до інших, ніж хлорид натрію, солей. Вплив CaCl₂ або MgSO₄ здається більш виразним, ніж вплив NaCl з порівняльними концентраціями або провідністю.

5 Приклад 15: Дослідження “ висолювання ” у композиціях, що містили Mtb72f з різними сольовими концентраціями та значеннями pH, що дорівнювали 6.1, 7.5 та 8.5.

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

10 Очищену партію антигену (Mtb72f з 6 His -залишками, SEQ ID No: 11) розчинили до концентрації 100 мкг/мл у трьох різних буферах (10 мМ фосфатний буфер, pH 6.1; 20 мМ Tris-буфер, pH 7.5 та 20 мМ Tris-буфер, pH 8.5), які містили кінцеві концентрації NaCl, що дорівнювали 0, 150 та 450 мМ.

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

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

20 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 °C. Середній гідродинамічний діаметр та індекс полідисперсності (PI) обчислювали за допомогою програмного забезпечення приладу.

Результати цього експерименту наведені у Фіг. 13 та 14.

25 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 мають відношення до антигенів, споріднених з білком Rv1196, а не тільки з самою послідовністю Rv1196.

У ряді зразків DLS - способу, прилад був нездатним визначити деякі розміри частинок (показано, як NV у Фіг. 14).

30 Приклад 16: Запобігання “ висолювання ” у композиціях, що містять M72 та імуностимулятори з застосуванням сорбіту у якості ізотонічного агента.

Для порівняння стійкості імуногенних композицій, що містили 150 мМ 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 11 (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 мМ NaCl – 2) pH 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 (сорбіт – 2) pH 8.5

10 мкг антигену (20 мкг/мл)

5 % (ваги/обсягу) цукрози

40 мМ Tris

0.02 % (ваги/обсягу) Tween 80

500 мкг DOPC

125 мкг холестерину

25 мкг 3D-MPL

25 мкг QS21

5 мМ NaCl

4.7 % (ваги/обсягу) сорбіту

10 мМ фосфат

pH 8.5

Характеристичний аналіз вищеописаних відновлених імуногенних композицій проводили після їх зберігання при 30 °C (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 °C протягом ночі. Після чотирьох промивань реакцію на планшетах призупиняли шляхом інкубування протягом години при 37 °C 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 планшета 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 °C. Після промивання, імунний комплекс знову інкубували 1 год. при 37 °C 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.15. Ромбами вказані особливі вимірювання для кожного з трьох

тестових зразків, разом з лінією, якою позначено середнє значення.

5 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 % (Т0 87.1 % означає, що підтримується 95.9 % відносної антигенності), у той час, як відновлення у ASA NaCl-2) через 24 год. дорівнювало 54.5 % (Т0 81.0 % означає, що після зберігання підтримується тільки 67.3 % відносної антигенності).

10 Таким чином, Приклад 8 вперше демонструє згубний вплив значення рН та концентрації NaCl на стійкість імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком Rv1196. Приклад 14 доповнює це, показуючи, що інші солі також можуть негативно впливати на стійкість імуногенних композицій, що містять антиген, споріднений з білком Rv1196. Приклади 10, 11, 12, 15 та 16 демонструють, що цей ефект також може бути застосованим до інших послідовностей.

15 Змінення складу імуногенних композицій з неіонними ізотонічними агентами спрямовано на вирішення проблем стійкості антигену. На додачу до цього, Приклади 3, 4, 13 та 16 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.

20 Стійкість імуногенних композицій є ключовим фактором та може бути особливо актуальною у ізольованих 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.

25 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> Глаксосмітклاین Байолоджікалз С.А.
 Годарт Стефан
 Ланан Аміна
 Лемоін Домінік

<120> Нові сполуки

<130> VB64442A

<150> US61/422723
 <151> 2010-12-14

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 391
 <212> білок
 <213> штам H37Rv Mycobacterium tuberculosis

<400> 1

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

Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp
 20 25 30

Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser
 35 40 45

Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly
 50 55 60

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

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

Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala
 100 105 110

Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly
 115 120 125

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

Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala
 145 150 155 160

Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr
 165 170 175

Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser
180 185 190

Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu
195 200 205

Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu
210 215 220

Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn
225 230 235 240

Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val
245 250 255

Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala
260 265 270

Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala
275 280 285

Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly
290 295 300

Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val
305 310 315 320

Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg
325 330 335

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

Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly
355 360 365

Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met
370 375 380

Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
385 390

<210> 2
<211> 1173
<212> ДНК
<213> штам H37Rv Mycobacterium tuberculosis

<400> 2	
atggtggatt tcggggcggt accaccggag atcaactccg cgaggatgta cgccggcccg	60
ggttcggcct cgctggtggc cgcggctcag atgtgggaca gcgtggcgag tgacctgttt	120
tcggccgcgt cggcgtttca gtcggtggtc tggggtctga cggtggggtc gtggataggt	180


```

tcgtcggcgg gtctgatggt ggcggcggcc tcgccgtatg tggcgtggat gagcgtcacc 240
gcggggcagg ccgagctgac cgccgcccag gtccgggttg ctgcggcggc ctacgagacg 300
gcgtatgggc tgacggtgcc cccgccgtg atcgccgaga accgtgtga actgatgatt 360
ctgatagcga ccaacctctt ggggcaaaac accccggcga tcgcgtcaa cgaggccgaa 420
tacggcgaga tgtgggcccc agacgccgcc gcgatgtttg gctacgccgc ggcgacggcg 480
acggcgacgg cgacgttgct gccgttcgag gaggcggcgg agatgaccag cgcgggtggg 540
ctcctcgagc aggccgccgc ggtcgaggag gcctccgaca ccgccgcggc gaaccagttg 600
atgaacaatg tgccccaggc gctgcaacag ctggcccagc ccacgcaggg caccacgcct 660
tcttccaagc tgggtggcct gtggaagacg gtctcgccgc atcggtcgcc gatcagcaac 720
atggtgtcga tggccaacaa ccacatgtcg atgaccaact cgggtgtgtc gatgaccaac 780
accttgagct cgatgttgaa gggctttgct ccggcggcgg ccgccaggc cgtgcaaacc 840
gcggcgcaaa acgggggtccg ggcgatgagc tcgctgggca gctcgctggg ttcttcgggt 900
ctgggcggtg ggggtggccgc caacttgggt cgggcggcct cggtcggttc gttgtcggtg 960
ccgcaggcct gggccgcggc caaccaggca gtcaccccgg cggcgcgggc gctgccgctg 1020
accagcctga ccagcgccgc ggaagaggg cccgggcaga tgctgggcgg gctgccggtg 1080
gggcagatgg gcgccagggc cggtggtggg ctcagtgtg tgctgcgtgt tccgccgcga 1140
ccctatgtga tgccgcattc tccggcggcc ggc 1173

```

```

<210> 3
<211> 391
<212> білок
<213> штам F11 Mycobacterium tuberculosis

```

```
<400> 3
```

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

```
Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Lys Met Trp
20          25          30
```

```
Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser
35          40          45
```

```
Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly
50          55          60
```

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

```
Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala
85          90          95
```

```
Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala

```

100	105	110
Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly	115	120 125
Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met	130	135 140
Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala	145	150 155 160
Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr	165	170 175
Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser	180	185 190
Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu	195	200 205
Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu	210	215 220
Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn	225	230 235 240
Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val	245	250 255
Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala	260	265 270
Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala	275	280 285
Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly	290	295 300
Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val	305	310 315 320
Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg	325	330 335
Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly	340	345 350
Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly	355	360 365
Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met		

370 375 380

Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
385 390

<210> 4
<211> 1173
<212> ДНК
<213> штам F11 Mycobacterium tuberculosis

<400> 4
atggtggatt tcggggcggt accaccggag atcaactccg cgaggatgta tgccggcccg 60
ggttcggcct cgctggtggc cggcgcaag atgtgggaca gcgtggcgag tgacctgttt 120
tcggccgcgt cggcggtttca gtcggtggtc tggggtctga cgggtgggtc gtggataggt 180
tcgtcggcgg gtctgatggt ggcggcggcc tcgccgtatg tggcgtggat gagcgtcacc 240
gcggggcagg ccgagctgac cggcgcccag gtccgggttg ctgcggcggc ctacgagacg 300
gcgtatgggc tgacggtgcc cccgccggtg atcgccgaga accgtgctga actgatgatt 360
ctgatagcga ccaacctctt ggggcaaaac accccggcga tcgcggtcaa cgaggccgaa 420
tacggcgaga tgtgggcccc agacgccgcc gcgatgtttg gctacgccgc ggcgacggcg 480
acggcgacgg cgacgttgct gccgttcgag gaggcgccgg agatgaccag cgcgggtggg 540
ctctcgagc aggccgccgc ggtcgaggag gcctccgaca ccgcccgggc gaaccagttg 600
atgaacaatg tgccccaggc gctgcaacag ctggcccagc ccacgcaggg caccacgcct 660
tcttccaagc tgggtggcct gtggaagacg gtctcgccgc atcggtcgcc gatcagcaac 720
atggtgtcga tggccaacaa ccacatgtcg atgaccaact cgggtgtgtc gatgaccaac 780
accttgagct cgatgttgaa gggctttgct ccggcggcgg ccgccaggc cgtgcaaacc 840
gcggcgcaaa acgggggtccg ggcgatgagc tcgctgggca gctcgctggg ttcttcgggt 900
ctgggcgggtg ggggtggccgc caacttgggt cgggcggcct cggtcggttc gttgtcgggtg 960
ccgcaggcct gggccgcggc caaccaggca gtcaccccgg cggcgcgggc gctgccgctg 1020
accagcctga ccagcgccgc ggaagaggg cccgggcaga tgctgggcgg gctgccgggtg 1080
gggcagatgg gcgccagggc cgggtgggtgg ctcagtgggt tgctgcgtgt tccgccgcga 1140
ccctatgtga tgccgcattc tccggcggcc ggc 1173

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

<220>
<223> злитий (гібридний) білок M72

<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
 305 310 320
 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 Lys₅₆₅ Leu Gly Tyr Asn Asn₅₇₀ Ala Val Gly Ala Gly₅₇₅ Thr
 Gly Ile Val Ile₅₈₀ Asp Pro Asn Gly Val₅₈₅ Val Leu Thr Asn Asn₅₉₀ His Val
 Ile Ala Gly₅₉₅ Ala Thr Asp Ile Asn₆₀₀ Ala Phe Ser Val Gly₆₀₅ Ser Gly Gln
 Thr Tyr Gly₆₁₀ Val Asp Val Val₆₁₅ Gly Tyr Asp Arg Thr₆₂₀ Gln Asp Val Ala
 Val₆₂₅ Leu Gln Leu Arg Gly₆₃₀ Ala Gly Gly Leu Pro₆₃₅ Ser Ala Ala Ile Gly₆₄₀
 Gly Gly Val Ala Val₆₄₅ Gly Glu Pro Val Val₆₅₀ Ala Met Gly Asn Ser₆₅₅ Gly
 Gly Gln Gly Gly₆₆₀ Thr Pro Arg Ala Val₆₆₅ Pro Gly Arg Val Val₆₇₀ Ala Leu
 Gly Gln Thr₆₇₅ Val Gln Ala Ser Asp₆₈₀ Ser Leu Thr Gly Ala₆₈₅ Glu Glu Thr
 Leu Asn Gly₆₉₀ Leu Ile Gln Phe₆₉₅ Asp Ala Ala Ile Gln₇₀₀ Pro Gly Asp Ala
 Gly Gly Pro Val Val₇₁₀ Asn Gly Leu Gly Gln Val₇₁₅ Val Gly Met Asn Thr₇₂₀
 Ala Ala Ser

<210> 6
 <211> 2172
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

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

<400> 6	
atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tcccaggggtg ggcagggatt cgccattccg	60
atcggggcagg cgatggcgat cgcgggccag atccgatcgg gtgggggggtc acccaccgtt	120
catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgtgtctg acaacaacgg caacggcgca	180
cgagtccaac gcgtggtcgg gagcgctccg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac	240
gtgatcaccg cggtcgacgg cgctccgata aactcggcca ccgcatggc ggacgcgctt	300
aacggggcatc atcccggtga cgatcatctg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg	360
cgtacagggg acgtgacatt ggccgagggg cccccggccg aattcatggt ggatttcggg	420
gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccgggttc ggcctcgctg	480

```

gtggccgcgg ctcatatgtg ggacagcgtg gcgagtacc tgttttcggc cgcgtcggcg 540
tttcagtcgg tggctctggg tctgacggtg gggtcgtgga taggttcgtc ggcgggtctg 600
atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgcggg gcaggccgag 660
ctgaccgccg cccaggtccg ggttgctgcg gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg 720
gtgccccgcg cggatgatcg cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac 780
ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg 840
gccaagacg cgcgcgcat gtgttgctac gccgcggcga cggcgacggc gacggcgacg 900
ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcgcg gttgggtcct cgagcaggcc 960
gccgcggtcg agggaggctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgccc 1020
caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt 1080
ggcctgtgga agacgggtct gccgcatcgg tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140
aacaaccaca tgtcatgac caactcgggt gtgtcatga ccaacacctt gagctcatg 1200
ttgaagggtc ttgctccggc ggcggccgcc caggcggtgc aaaccgcggc gcaaaacggg 1260
gtccggcgga tgagctcgct gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtgggtg 1320
gccgccaact tgggtcgggc ggcctcggtc ggttcgttgt cggtgccgca ggcctgggcc 1380
gcggccaacc aggcagtcac cccggcgcg cgggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc 1440
gccgcggaaa gagggcccg gcagatgctg ggcgggctgc cggtggggca gatgggcgcc 1500
agggccggtg gtgggctcag tgggtgtgct cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg 1560
cattctccgg cagccggcga tatcgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcgccgac 1620
ttccccgcgc tgccccctga 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 cgggtgctga gctgcgcggt gccgggtggc tgccgtcggc ggcgatcggc 1920
ggcggcgctc cggttgggtg gcccgctcgc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcgga 1980
acgccccgtg cgggtgcctg cagggtggtc gcgctcgcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040
tcgctgaccg gtgcccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
cccgtgatg cgggcggggc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160
gccgcgtcct ag 2172

```

<210> 7
 <211> 725
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> злитий (гібридний) білок M72 з двома додатковими His- залишками

<400> 7

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 Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala
145 150 155 160
Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu
165 170 175
Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val
180 185 190
Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser
195 200 205
Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr
210 215 220
Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly
225 230 235 240
Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met
245 250 255
Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala
260 265 270

Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala
275 280 285

Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu
290 295 300

Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu
305 310 315 320

Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln
325 330 335

Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr
340 345 350

Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val
355 360 365

Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn
370 375 380

His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser
385 390 395 400

Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln
405 410 415

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
500 505 510

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> 8
<211> 2178
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> кодуюча послідовність злитого (гібридного) білка M72 з двома додатковими His-

залишками

<400> 8
atgcatcaca cggccgcgtc cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc 60
attccgatcg ggcaggcgat ggcgatcgcg ggccagatcc gatcgggtgg ggggtcaccc 120
accgttcata tcgggcctac cgccttcctc ggcttggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180

ggcgacgag	tccaacgcgt	ggtcgggagc	gctccggcgg	caagtctcgg	catctccacc	240
ggcgacgtga	tcaccgcggt	cgacggcgct	ccgatcaact	cggccaccgc	gatggcggac	300
gcgcttaacg	ggcatcatcc	cggtgacgtc	atctcgggtga	cctggcaaac	caagtcgggc	360
ggcacgcgta	caggggaacgt	gacattggcc	gagggacccc	cggccgaatt	catggtggat	420
ttcggggcgt	taccaccgga	gatcaactcc	gcgaggatgt	acgccggccc	gggttcggcc	480
tcgctggttg	ccgcggctca	gatgtgggac	agcgtggcga	gtgacctgtt	ttcggccgcg	540
tcggcgtttc	agtcggtggt	ctgggtcttg	acggtggggt	cgtggatagg	ttcgtcggcg	600
ggctctgatg	tggcggcggc	ctcgccgtat	gtggcggtga	tgagcgtcac	cgcggggcag	660
gccgagctga	ccgccgccc	ggtcggggtt	gctgcggcgg	cctacgagac	ggcgtatggg	720
ctgacgggtc	ccccgccggt	gatcgccgag	aaccgtgctg	aactgatgat	tctgatagcg	780
accaacctct	tggggcaaaa	caccccggcg	atcgcggtca	acgaggccga	atacggcgag	840
atgtgggccc	aagacgccgc	cgcatgtttt	ggctacgccg	cggcgacggc	gacggcgacg	900
gcgacgttgc	tggcgttcga	ggaggcgccg	gagatgacca	gcgcgggtgg	gctcctcgag	960
caggccgcg	cggtcgagga	ggcctccgac	accgccgcgg	cgaaccagtt	gatgaacaat	1020
gtgccccagg	cgctgcaaca	gctggcccag	cccacgcagg	gcaccacgcc	ttcttccaag	1080
ctgggtggcc	tgtggaagac	ggtctcgcgc	catcggtcgc	cgatcagcaa	catggtgtcg	1140
atggccaaca	accacatgtc	gatgaccaac	tcgggtgtgt	cgatgaccaa	caccttgagc	1200
tcgatgttga	agggctttgc	tccggcggcg	gccgcccagg	ccgtgcaaac	cgcggcgcaa	1260
aacggggtcc	gggcgatgag	ctcgctgggc	agctcgctgg	gttcttcggg	tctgggcggt	1320
ggggtggccg	ccaacttggg	tcgggcggcc	tcggtcggtt	cgtgtcggtt	gccgcaggcc	1380
tgggcgcg	ccaaccaggc	agtcaccccg	gcggcgcg	cgctgccgct	gaccagcctg	1440
accagcgccg	cggaaagagg	gcccgggcag	atgctggg	ggctgccggt	ggggcagatg	1500
ggcgccagg	ccggtggttg	gctcagtgg	gtgctgcgtg	ttccgccgcg	accctatgtg	1560
atgccgcatt	ctccggcagc	cggcgatatc	gccccgccgg	cctgtgcga	ggaccggttc	1620
gccgacttcc	ccgcgctgcc	cctcgacccg	tccgcgatgg	tcgcccaggt	ggggccacag	1680
gtggtcaaca	tcaacaccaa	actgggctac	aacaacgccg	tgggcgcggg	gaccggcatc	1740
gtcatcgatc	ccaacggtgt	cgtgctgacc	aacaaccacg	tgatcgcg	cgccaccgac	1800
atcaatgcgt	tcagcgtcgg	ctccggccaa	acctacggcg	tcgatgtggt	cgggtatgac	1860
cgcacccagg	atgtcgcggt	gctgcagctg	cgcggtgccg	gtggcctgcc	gtcggcgcg	1920
atcggtggcg	gcgtcgcggt	tggtgagccc	gtcgtcgcg	tgggcaacag	cggtgggcag	1980
ggcggaacgc	cccgtgcggt	gcctggcagg	gtggtcgcg	tcggccaaac	cgtgcaggcg	2040
tcggattcgc	tgaccggtgc	cgaagagaca	ttgaacgggt	tgatccagtt	cgatgccgcg	2100
atccagcccc	gtgatgcggg	cgggcccgtc	gtcaacggcc	taggacaggt	ggtcggtatg	2160
aacacggccg	cgctcctag					2178

<210> 9
 <211> 723
 <212> білок
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> злиття (гібрид) Mtb72f
 <400> 9
 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
				245		
				Glu	Asn	Arg
				250		
				Ala	Glu	Leu
				Met	Ile	Leu
				255		
				Ile	Ala	Thr
				260		
				Leu	Leu	Gly
				Gln	Asn	Thr
				265		
				Pro	Ala	Ile
				270		
				Ala	Val	Asn
				275		
				Glu	Ala	Glu
				280		
				Tyr	Gly	Glu
				Met	Trp	Ala
				285		
				Gln	Asp	Ala
				290		
				Ala	Ala	Met
				295		
				Thr	Ala	Thr
				300		
				Leu	Leu	Pro
				305		
				Glu	Gln	Ala
				310		
				Met	Thr	Ser
				315		
				Gly	Leu	Leu
				320		
				Ala	Ala	Val
				325		
				Glu	Glu	Ala
				330		
				Ser	Asp	Thr
				335		
				Ala	Ala	Ala
				340		
				Asn	Gln	Leu
				345		
				Gln	Leu	Ala
				350		
				Pro	Thr	Gln
				355		
				Gly	Leu	Trp
				360		
				Lys	Thr	Val
				365		
				Ser	Pro	
				370		
				His	Arg	Ser
				375		
				Met	Val	Ser
				380		
				Asn	Asn	His
				385		
				Met	Ser	Met
				390		
				Thr	Leu	Ser
				395		
				Ser	Ser	Met
				400		
				Leu	Lys	Gly
				405		
				Phe	Ala	Pro
				410		
				Ala	Gln	Ala
				415		
				Val	Gln	Thr
				420		
				Ser	Ser	Leu
				425		
				Gly	Ser	Leu
				430		
				Arg	Ala	Ala
				435		
				Gly	Val	Ala
				440		
				Asn	Leu	Gly
				445		
				Pro	Gln	Ala
				450		
				Trp	Ala	Ala
				455		
				Ala	Ala	Asn
				460		
				Gln	Thr	Ser
				465		
				Leu	Thr	Ser
				470		
				Pro	Leu	Thr
				475		
				Met	Gln	Gly
				480		
				Arg	Glu	Ala
				485		
				Val	Gly	Leu
				490		
				Pro	Val	Gly
				495		
				Gln	Met	Gly
				500		
				Ala	Arg	Ala
				505		
				Gly	Gly	Gly
				510		
				Leu	Ser	Gly
				515		
				Val	Leu	Arg
				520		

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> 10
 <211> 2172
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> кодує послідовність злиття (гібриду) mtb72f
 <400> 10

atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tcccaggggtg ggcaggggatt cgccattccg	60
atcgggcagg cgatggcgat cgcgggccag atccgatcgg gtgggggggtc acccaccgtt	120
catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgtgtcgc acaacaacgg caacggcgca	180
cgagtccaac gcgtagtcgg gagcgtccg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac	240
gtgatcaccg cggtcgacgg cgctccgatc aactcggcca ccgcgatggc ggacgcgctt	300
aacgggcatac atcccgggtga cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg	360
cgtacagggg acgtgacatt ggccgagggg cccccggccg aattcatggt ggatttcggg	420
gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccgggttc ggctcgcgtg	480
gtggcccgcg ctcagatgtg ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcggcg	540
tttcagtcgg tggctcgggg tctgacgggt gggctcgtga taggttcgtc ggcgggtctg	600
atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgcggg gcaggccgag	660
ctgaccgcgg cccaggtccg ggttgcgtcg gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg	720
gtgccccgcg cggtgatcgc cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac	780
ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg	840
gcccagacg cgcgcgcgat gtttggtac gccgcggcga cggcgacggc gacggcgacg	900
ttgtgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcgcgg gtgggctcct cgagcaggcc	960
gccgcggtcg aggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgcc	1020
caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt	1080
ggctgtgga agacggcttc gccgcacgcg tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc	1140
aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg	1200
ttgaagggct ttgctccggc ggcgcccgcc caggccgtgc aaaccgcggc gcaaaacggg	1260
gtccgggcga tgagctcgct gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cggtaggggtg	1320
gccgccaact tgggtcgggc ggctcggtc ggttcgttgt cggtgccgca ggctgggccc	1380
gcggccaacc aggcagtcac cccggcgcg gcggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc	1440
gccgcggaag gagggcccgg gcagatgctg ggcgggctgc cggtagggga gatgggcgcc	1500
agggcccgtg gtgggctcag tgggtgtctg cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg	1560
cattctccgg cagccggcga tatcgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcgcggac	1620
ttccccgcgc tgccccctga cccgtccgcg atggtcgccc aagtggggcc acaggtggtc	1680
aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gccgtgggcg ccgggaccgg catcgtcatc	1740
gatccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat	1800
gcgttcagcg tcggctccgg ccaaactac ggctcgtatg tggtcgggta tgaccgcacc	1860
caggatgtcg cgggtctgca gctgcgcggt gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcgg	1920
ggcggcgtcg cggttggtga gccgctcgtc gcgatgggca acagcggtag gcagggcgga	1980
acgccccgtg cggtagcctg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat	2040

tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac ggggtgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
 cccggtgatt cgggcgggcc cgctgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160
 gccgcgtcct ag 2172

<210> 11
 <211> 729
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> злиття (гібрид) Mtb72f з 6 додатковими His- залишками

<400> 11

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 Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly
 100 105 110
 Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr
 115 120 125
 Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp
 130 135 140
 Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly
 145 150 155 160
 Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val
 165 170 175
 Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp
 180 185 190
 Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val
 195 200 205

Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln
210 215 220

Ala Glu Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu
225 230 235 240

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

Ala Glu Leu Met Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr
260 265 270

Pro Ala Ile Ala Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln
275 280 285

Asp Ala Ala Ala Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr
290 295 300

Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly
305 310 315 320

Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala
325 330 335

Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu
340 345 350

Ala Gln Pro Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu
355 360 365

Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser
370 375 380

Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr
385 390 395 400

Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala
405 410 415

Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser
420 425 430

Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala
435 440 445

Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala
450 455 460

Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro
465 470 475 480

Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu
 485 490 495
 Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu
 500 505 510
 Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser
 515 520 525
 Pro Ala Ala Gly Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe
 530 535 540
 Ala Asp Phe Pro Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln
 545 550 555 560
 Val Gly Pro Gln Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn
 565 570 575
 Ala Val Gly Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val
 580 585 590
 Leu Thr Asn Asn His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe
 595 600 605
 Ser Val Gly Ser Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp
 610 615 620
 Arg Thr Gln Asp Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu
 625 630 635 640
 Pro Ser Ala Ala Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val
 645 650 655
 Ala Met Gly Asn Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro
 660 665 670
 Gly Arg Val Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu
 675 680 685
 Thr Gly Ala Glu Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala
 690 695 700
 Ile Gln Pro Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln
 705 710 715 720
 Val Val Gly Met Asn Thr Ala Ala Ser
 725

<210> 12
 <211> 2190
 <212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> кодує послідовність злиття (гібриду) M72 з 6 додатковими His - залишками

<400> 12

atgcatcacc atcaccatca cacggccgcg tccgataact tccagctgtc ccagggtggg	60
cagggtattcg ccattccgat cgggcaggcg atggcgatcg cgggccagat ccgatcgggt	120
gggggggtcac ccaccgttca tatcgggcct accgccttcc tcggcttggg tgtgtcgcac	180
aacaacggca acggcgcacg agtccaacgc gtggtcggga gcgctccggc ggcaagtctc	240
ggcatctcca cggcgacgt gatcaccgcg gtcgacggcg ctccgatcaa ctcgccacc	300
gcgatggcgg acgcgcttaa cgggcatcat cccggtgacg tcatctcggg gacctggcaa	360
accaagtcgg cgggcacgcg tacagggaaac gtgacattgg ccgagggacc cccggccgaa	420
ttcatggtgg atttcggggc gttaccaccg gagatcaact ccgcgaggat gtacgccggc	480
ccgggttcgg cctcgctggt ggccgcggct cagatgtggg acagcgtggc gaggacctg	540
ttttcggccg cgtcggcgtt tcagtcgggt gtctggggtc tgacgggtgg gtcgtggata	600
ggttcgtcgg cgggtctgat ggtggcggcg gcctcgccgt atgtggcgtg gatgagcgtc	660
accgcggggc aggccgagct gaccgcggcc caggctcggg ttgctgcggc ggcctacgag	720
acggcgtatg ggctgacggt gccccgccg gtgatcgccg agaaccgtgc tgaactgatg	780
attctgatag cgaccaacct ctggggcga aacaccccg cgatcgcggt caacgaggcc	840
gaatacggcg agatgtgggc ccaagacgcc gccgcgatgt ttggctacgc cgggcgacg	900
gcgacggcga cggcgacgtt gctgccgttc gaggaggcgc cggagatgac cagcgcgggt	960
gggctcctcg agcaggccgc cgcggtcgag gaggcctcg acaccgccgc ggcgaaccag	1020
ttgatgaaca atgtgcccc ggcgctgcaa cagctggccc agcccacgca gggcaccacg	1080
ccttcttcca agctgggtgg cctgtggaag acggtctcgc cgcacgggtc gccgatcagc	1140
aacatgggtgt cgatggccaa caaccacatg tcgatgacca actcgggtgt gtcgatgacc	1200
aacaccttga gctcgatgtt gaagggtttt gtcgggcgg cggccgccca ggccgtgcaa	1260
accgcggcgc aaaacggggg ccgggcgatg agctcgctgg gcagctcgct gggttcttcg	1320
ggtctgggcg gtgggggtgg cgccaacttg ggtcgggcgg cctcggtcgg ttcgttgtcg	1380
gtgccgcagg cctgggccgc ggccaaccag gcagtcaccc cggcggcgcg ggcgtgccg	1440
ctgaccagcc tgaccagcgc cgcggaaaga gggccgggc agatgctggg cgggctgccg	1500
gtggggcaga tgggcgccag ggccggtggt gggctcagtg gtgtgtgctg tgttccgccg	1560
cgacctatg tgatgccgca ttctccggca gccggcgata tcgccccgcc ggccttgtcg	1620
caggaccggt tcgccgactt ccccgcgctg cccctcgacc cgtcccgat ggtcgcccaa	1680
gtggggccac aggtggtcaa catcaacacc aaactgggt acaacaacgc cgtgggcgcc	1740
gggaccggca tcgtcatcga tcccaacggt gtcgtgctga ccaacaacca cgtgatcgcg	1800
ggcgccaccg acatcaatgc gttcagcgtc ggctccggcc aaacctacgg cgtcgatgtg	1860

```
gtcgggtatg accgcaccca ggatgtcgcg gtgctgcagc tgcgcggtgc cgggtggcctg 1920
ccgtcgcgcg cgatcgggtg cggcgtcgcg gttggtgagc ccgtcgtcgc gatgggcaac 1980
agcgggtggg agggcggaac gccccgtgcg gtgcctggca ggggtggtcgc gctcggccaa 2040
accgtgcagg cgtcggattc gctgaccggt gccgaagaga cattgaacgg gttgatccag 2100
ttcgtatgcc cgatccagcc cgggtgattcg ggcgggcccg tcgtcaacgg cctaggacag 2160
gtggtcggta tgaacacggc cgcgtcctag 2190
```

```
<210> 13
<211> 20
<212> ДНК
<213> штучна послідовність
```

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

```
<400> 13
tccatgacgt tcctgacgtt 20
```

```
<210> 14
<211> 18
<212> ДНК
<213> штучна послідовність
```

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

```
<400> 14
tctcccagcg tgcgccat 18
```

```
<210> 15
<211> 30
<212> ДНК
<213> штучна послідовність
```

```
<220>
<223> CpG oligo 3
```

```
<400> 15
accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30
```

```
<210> 16
<211> 24
<212> ДНК
<213> штучна послідовність
```

```
<220>
<223> CpG oligo 4 - CpG 2006
```

```
<400> 16
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24
```

```
<210> 17
<211> 20
<212> ДНК
<213> штучна послідовність
```

```
<220>
```

```
<223> CpG oligo 5 - CpG 1686
```

```
<400> 17
tccatgacgt tcctgatgct 20
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Імуногенна композиція, яка містить антиген, споріднений з Rv1196, де антиген, споріднений з Rv1196, включає (а) послідовність, що має принаймні 90 % ідентичності з послідовністю SEQ ID NO: 1 або (б) фрагмент послідовності SEQ ID NO: 1, який містить принаймні 350 амінокислот у довжину, та де електропровідність композиції складає 5 мСм/см або менше, а рН вказаної композиції лежить в інтервалі від 7,0, до 9,0.

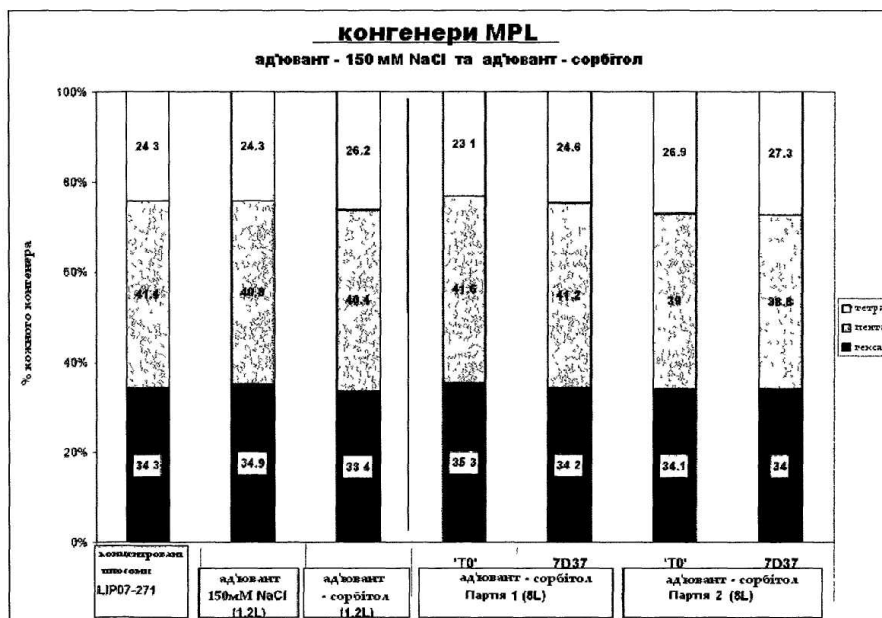
10

2. Імуногенна композиція згідно з п. 1, де електропровідність композиції складає 4 мСм/см або 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 мМ або менше.
6. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-5, яка додатково включає неіонний агент, що регулює тонічність.
10. 7. Імуногенна композиція згідно з п. 6, в якій неіонний агент, що регулює тонічність, являє собою поліол.
8. Імуногенна композиція згідно з п. 7, в якій поліол являє собою сорбіт.
9. Імуногенна композиція згідно з п. 8, в якій концентрація сорбіту складає від приблизно 4 до приблизно 6 % (ваг./об.).
15. 10. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-9, в якій концентрація сахарози складає від приблизно 4 до приблизно 6 % (ваг./об.).
11. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-10, яка додатково включає один або декілька імуностимуляторів.
12. Імуногенна композиція за п. 11, в якій імуностимулятор є сапоніном та/або агоністом TLR4.
20. 13. Імуногенна композиція за п. 12, в якій імуностимулятор(и) має(мають) форму ліпосом.
14. Імуногенна композиція за п. 12 або п. 13, в якій сапонін є QS21.
15. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 12-14, в якій агоніст TLR4 являє собою 3-де-О-ацилований монофосфорилліпід А.
16. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-15, в якій осмоляльність дорівнює 250-750 мОсм/кг.
25. 17. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-16, де композиція забезпечується у вигляді одиничної дози, що складає 50 мкл - 1 мл.
18. Імуногенна композиція згідно з п. 17, де одинична доза складає від 100 до 750 мкл.
19. Імуногенна композиція за п. 17 або п. 18, де одинична доза містить 1-100 мкг білка, спорідненого з Rv1196.
30. 20. Імуногенна композиція за п. 19, де одинична доза містить 5-50 мкг білка, спорідненого з Rv1196.
21. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-20, де значення рН вказаної композиції знаходиться у діапазоні від 7,5 до 8,5.
35. 22. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-21, в якій антиген, споріднений з Rv1196, включає послідовність, що має принаймні 90 % ідентичності з послідовністю SEQ ID NO: 1.
23. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-21, в якій антиген, споріднений з Rv1196, включає фрагмент послідовності SEQ ID NO: 1, що має принаймні 350 амінокислот у довжину.
24. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-23 для застосування у медицині.

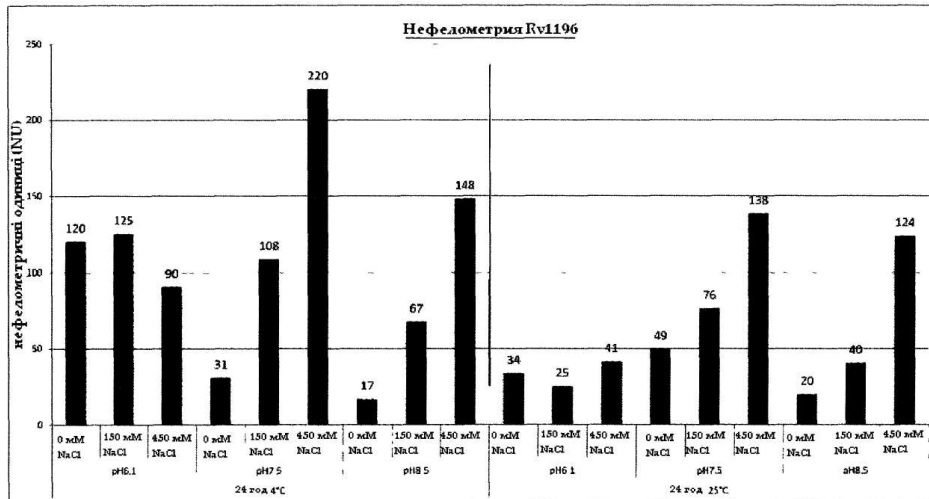
25. Застосування імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-23 у виробництві лікарського засобу.
26. Імуногенна композиція згідно з п. 24 або п. 25 для введення людині.
27. Спосіб профілактики, лікування або послаблення мікобактеріальних інфекцій, таких як
- 5 інфекції, спричинені *Mycobacterium tuberculosis*, що включає введення безпечної та ефективної кількості імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-23.



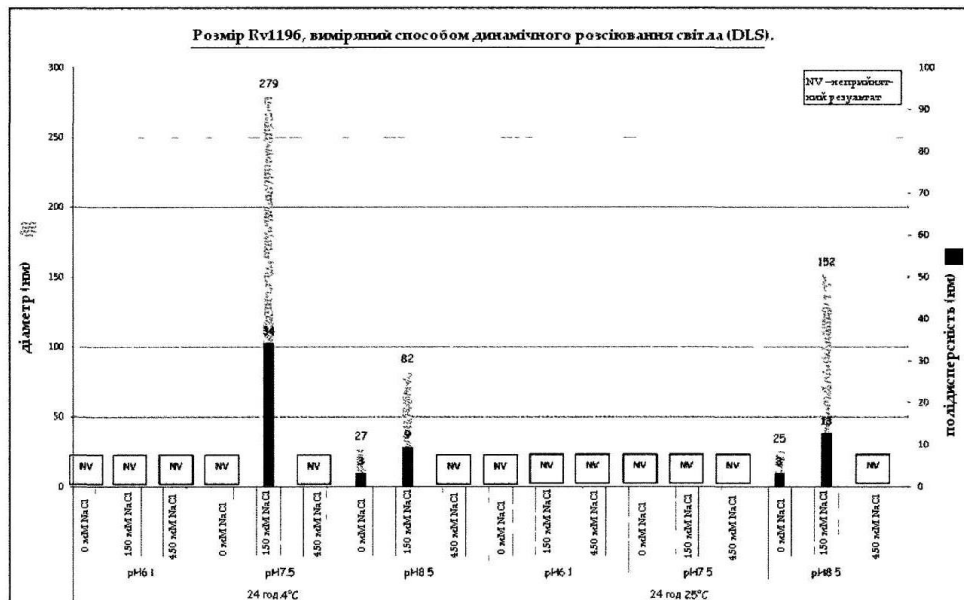
Фіг. 1



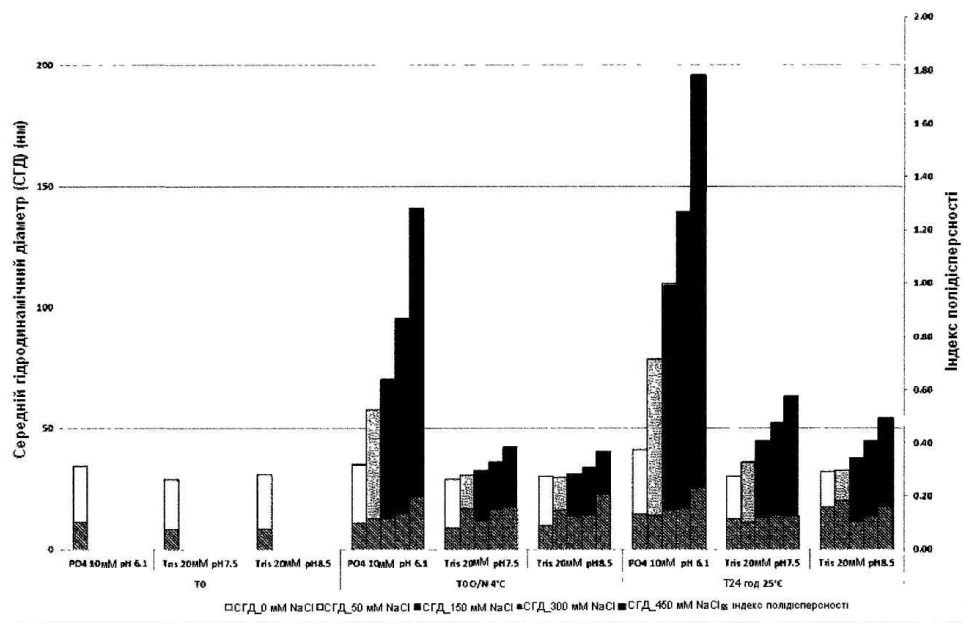
Фіг. 2



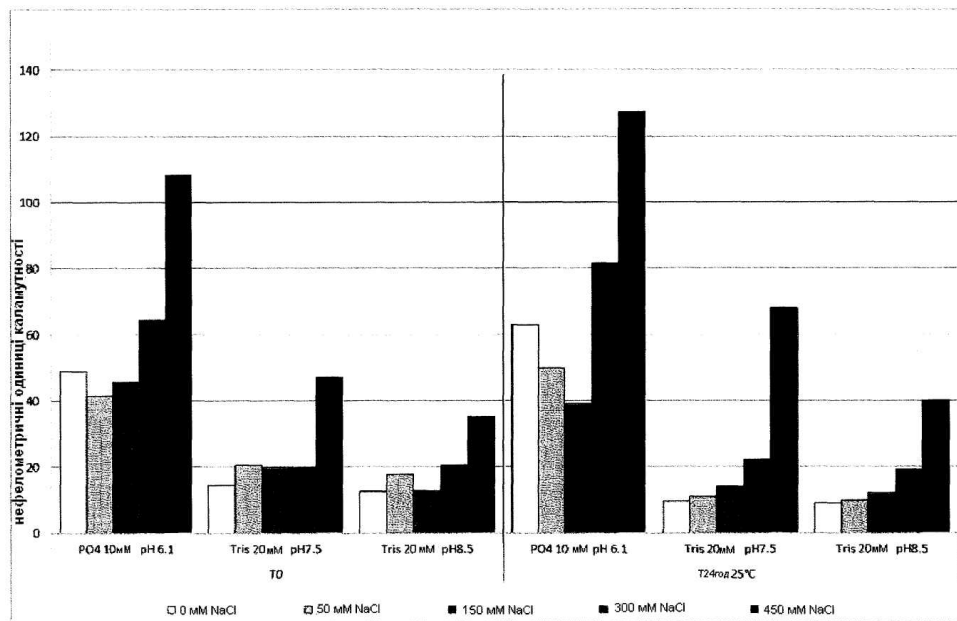
Фіг. 3



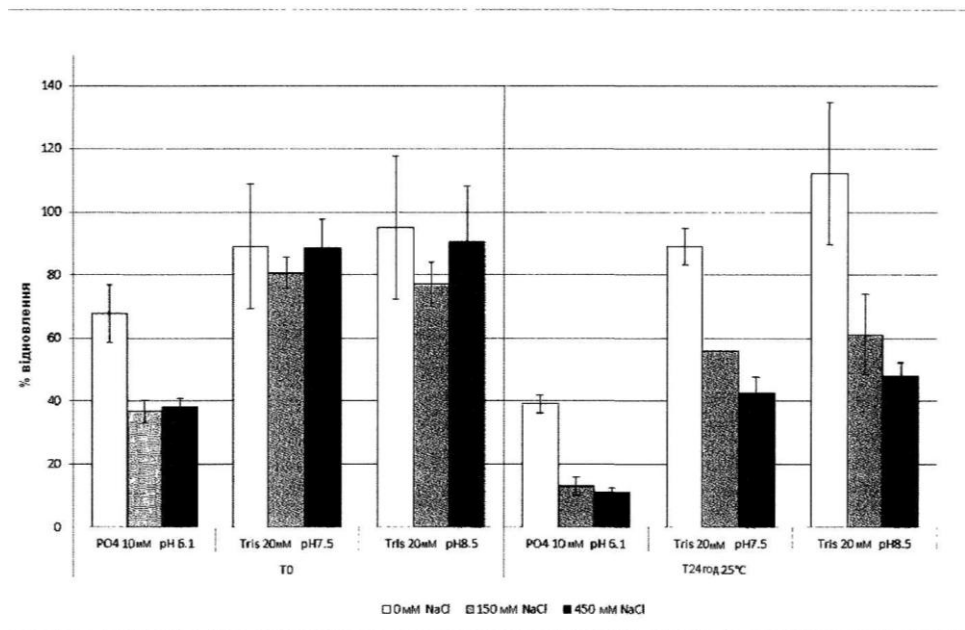
Фіг. 4



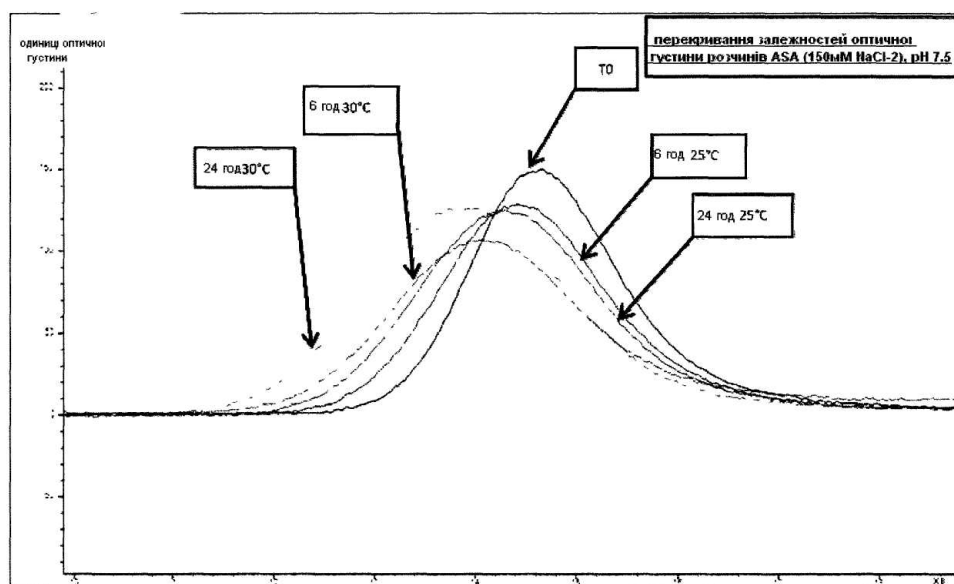
Фіг. 5



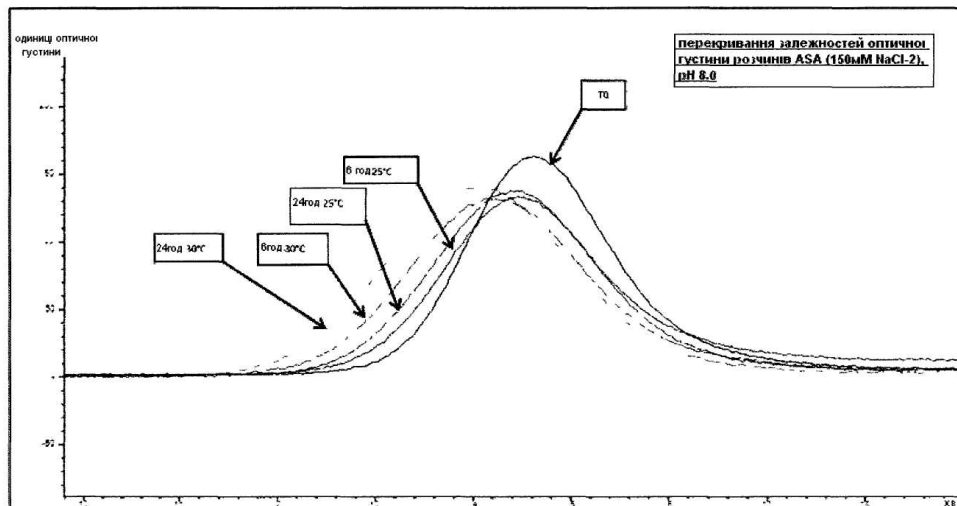
Фіг. 6



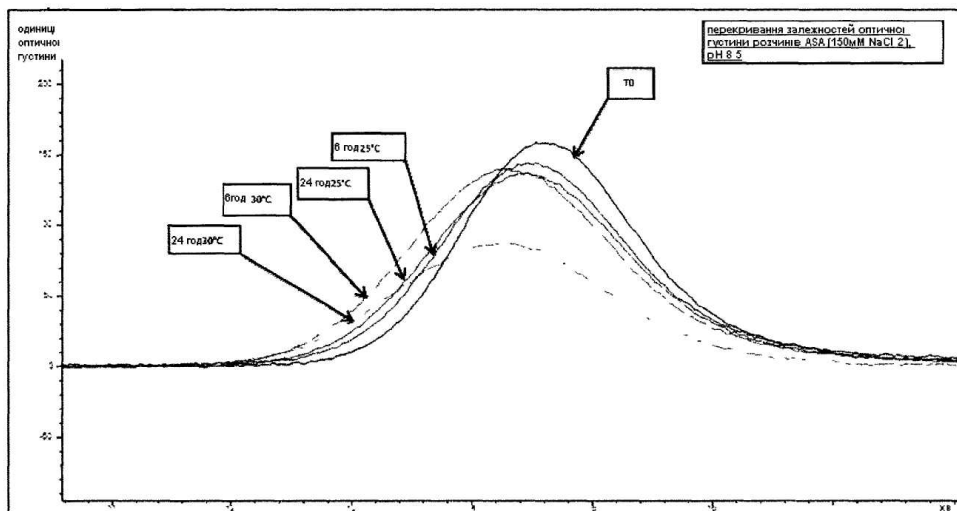
Фіг. 7



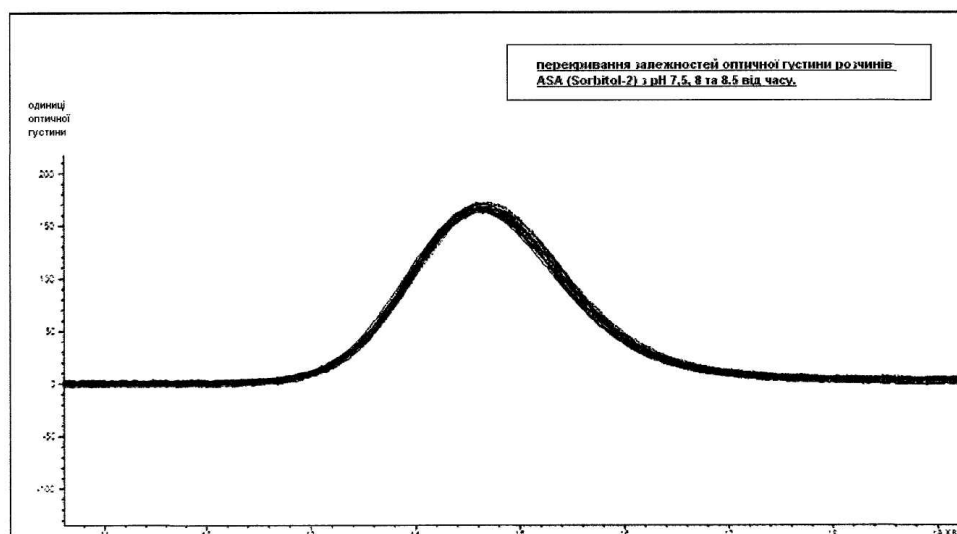
Фіг. 8а



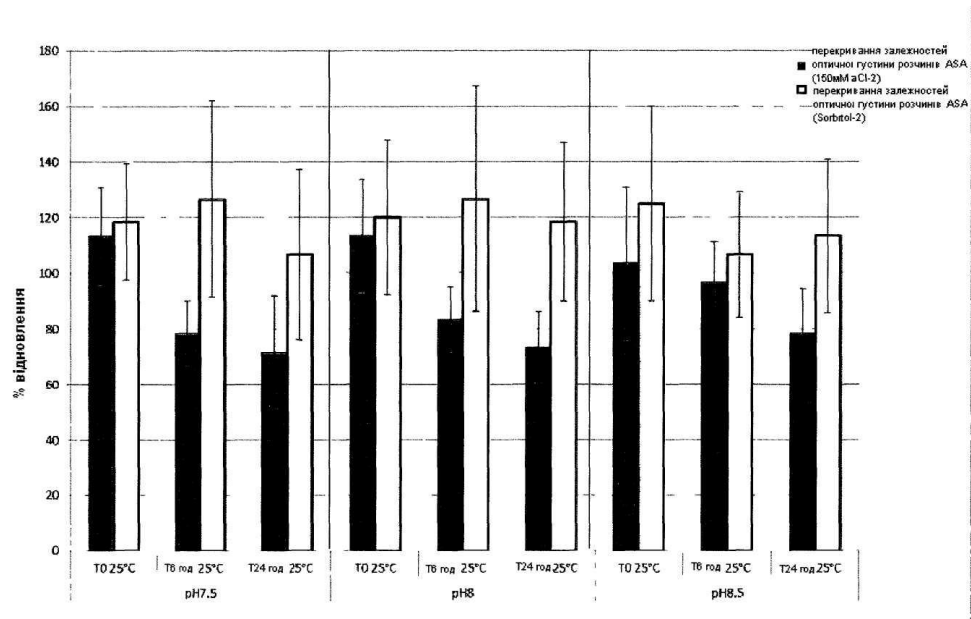
Фіг. 8b



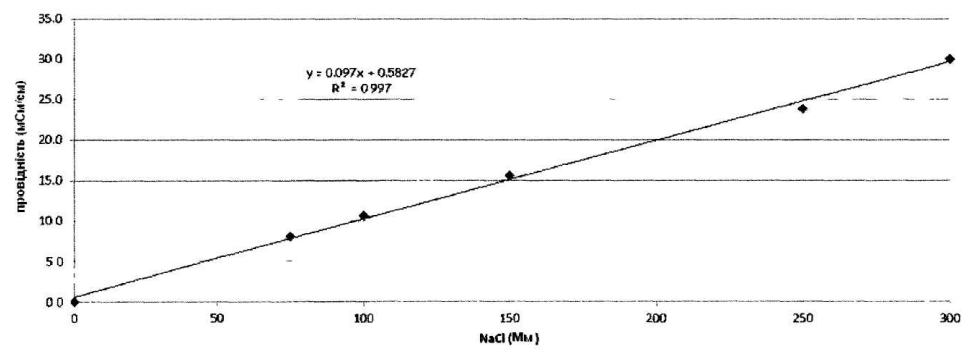
Фіг. 8c



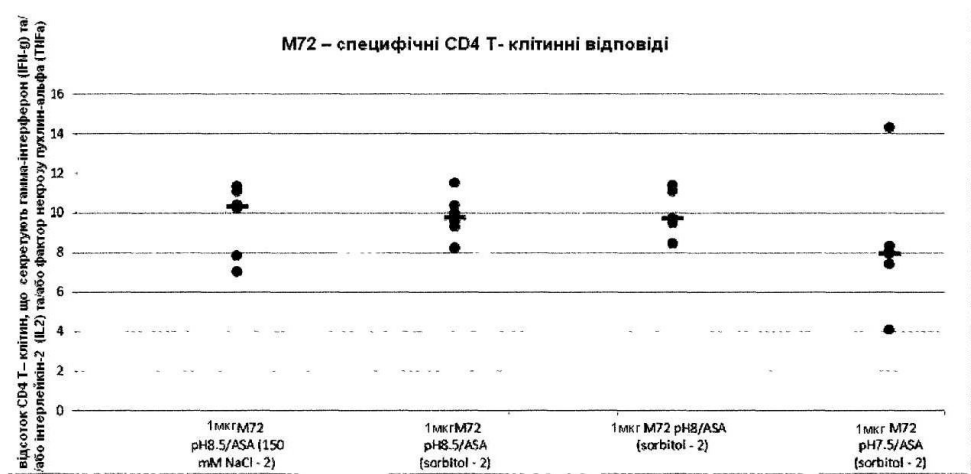
Фіг. 8d



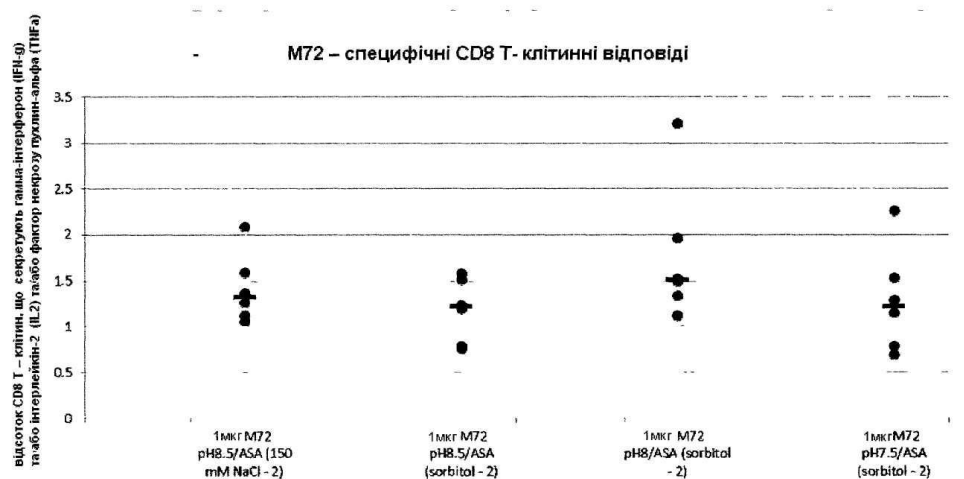
Фіг. 9



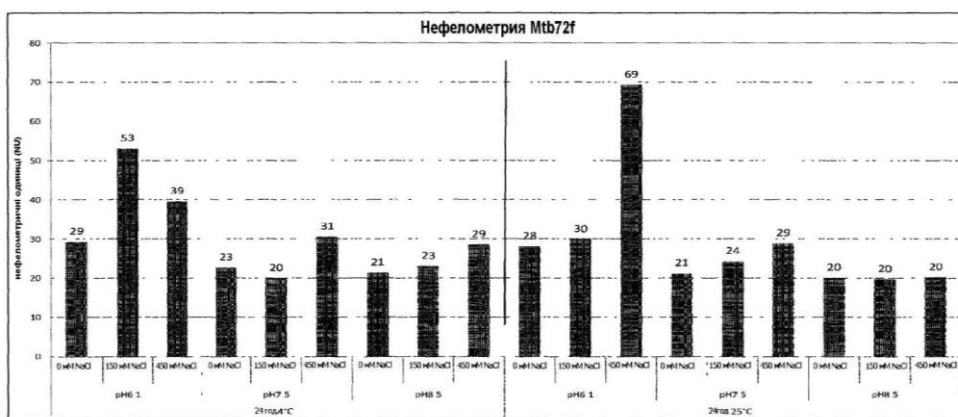
Фіг. 10



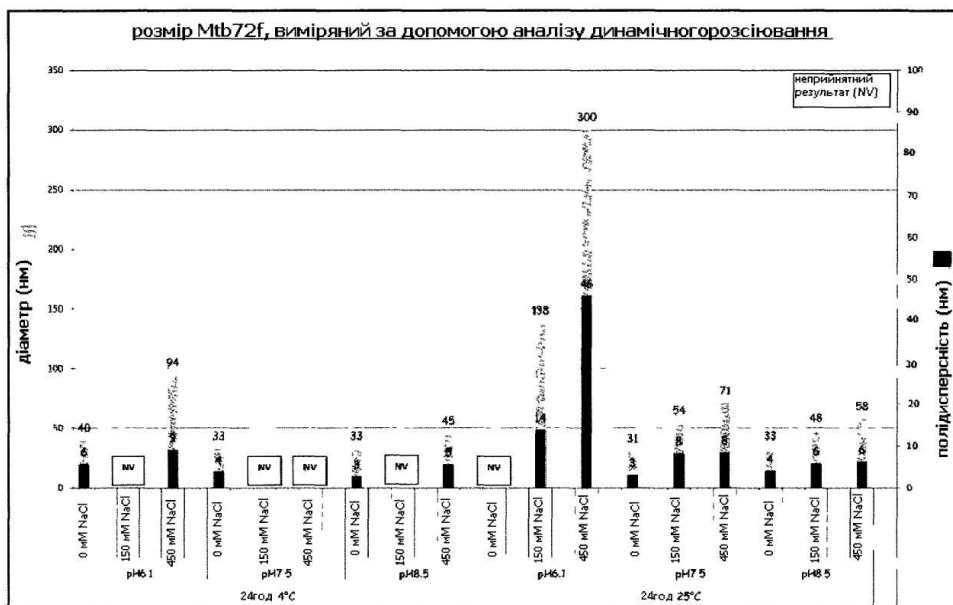
Фіг. 11



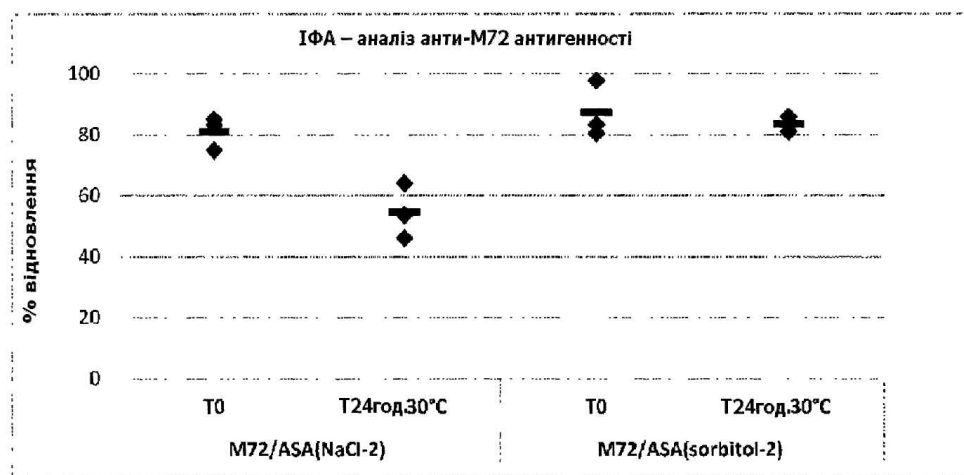
Фіг. 12



Фіг. 13



Фіг. 14



Фіг. 15

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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