

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041840**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.08

(51) Int. Cl. **G01N 33/569** (2006.01)

(21) Номер заявки
201691091

(22) Дата подачи заявки
2014.12.15

(54) **ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ УЛУЧШЕННОЙ IN VIVO ИЛИ IN VITRO
КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗА**

(31) **РА 2013 00698**

(56) **WO-A1-2012167307**

(32) **2013.12.16**

WO-A2-2012011144

(33) **DK**

WO-A1-2012057904

(43) **2016.12.30**

WO-A1-2010115989

(86) **PCT/DK2014/000062**

(87) **WO 2015/090322 2015.06.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СТАТЕНС СЕРУМ ИНСТИТУТ (DK)

(72) Изобретатель:
**Огорд Клаус, Хофф Сёрен Тетенс,
Розенкрандс Иса, Аггер Элсе Мария,
Андерсен Петер Лаветс (DK)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнагьев
А.В. (RU)**

(57) Изобретение раскрывает in vitro и in vivo способы диагностики с повышенной специфичностью и чувствительностью для выявления туберкулеза. Диагностические реагенты согласно настоящему изобретению могут замещать предыдущие смеси/коктейли/пулы антигенов, содержащие ESAT-6, однако включение ESAT6 улучшает диагностику дополнительно.

B1

041840

**041840
B1**

Настоящее изобретение раскрывает композиции для применения в качестве фармацевтического или диагностического реагента для улучшенной *in vivo* или *in vitro* клеточно-опосредованной иммунологической диагностики туберкулеза у человека или животного. Настоящее изобретение относится к антигенным комбинациям, которые повышают чувствительность (что дает меньше ложноотрицательных результатов) по сравнению с существующими антигенными комбинациями без нарушения специфичности (количества ложноположительных результатов). В частности, настоящее изобретение относится к антигенным композициям, не включая антиген, обозначающий ранний секреторный антиген 6 кДа (ESAT-6), который используется в настоящее время в зарегистрированных продуктах для выявления инфекции *Mycobacterium tuberculosis*. Альтернативно, новые диагностические или иммуногенные композиции можно применять в комбинации с ESAT-6 для дополнительного повышения чувствительности клеточно-опосредованной диагностики туберкулеза.

Предпосылки изобретения

Туберкулез (ТВ) является основной причиной заболеваемости и смертности в мире. По оценкам один человек заболевает ТВ каждые четыре секунды, а каждые 20-30 с кто-то умрет от этой болезни. Кроме того, примерно 1/3 населения мира латентно инфицировано *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*), возбудителем ТВ.

Иммунокомпетентные индивиды, инфицированные *M.tuberculosis*, как правило, имеют пожизненный риск 10% развития активной формы заболевания ТВ, при этом риск значительно повышается, например, если индивид одновременно инфицирован HIV (Sonnenberg, 2005) или имеет диабет (Young, 2009). Если заболевание не лечить, то каждый человек с активной легочной формой ТВ будет инфицировать 10-15 человек ежегодно (World Health Organization Tuberculosis Fact Sheet No 104, 2002). Таким образом, важно уметь выявить инфицированных *M.tuberculosis* индивидов на ранней стадии инфекции для того, чтобы предупредить развитие инфекции *M.tuberculosis* в активную контагиозную форму легочного ТВ. Этого можно достичь профилактическим лечением в самой ранней временной точке после постановки диагноза. Таким образом, быстрая и точная диагностика инфекции *M.tuberculosis* является важным элементом мероприятий по охране здоровья в мире с целью контроля заболевания.

Используемые в настоящее время диагностические анализы для определения инфекции *M.tuberculosis* включают посев, микроскопическое исследование и ПЦР материала соответствующего пациента, рентген грудной клетки, стандартную туберкулиновую кожную пробу (TST) и анализы высвобождения гамма-интерферона (IGRA). Первые три метода применяются для диагностики активной контагиозной формы ТВ и основаны на идентификации бактерий *M.tuberculosis* и, таким образом, зависят от присутствия бактерий в образце. Это требует определенной бактериальной нагрузки и доступа к инфекционному материалу, и эти методы, таким образом, не применимы для ранней диагностики инфекции, т.е. до наступления клинических проявлений заболевания. Рентген грудной клетки является нечувствительным и применим лишь для легочной формы ТВ и для выявления ТВ на более поздней стадии.

Стандартная туберкулиновая кожная проба, которая показывает реакцию гиперчувствительности замедленного типа (DTH), является простым и недорогим анализом, основанным на иммунологическом распознавании микобактериальных антигенов у подвергшихся воздействию индивидов. Однако, она далека от идеальной при выявлении инфекции *M.tuberculosis*. В ней используется внутривенное введение очищенного белкового деривата (PPD), который представляет собой грубую и слабо определяемую смесь микобактериальных антигенов, некоторые из которых являются общими с белками бациллы Кальметта-Герена (BCG) для вакцинации подштамма *M. bovis* и нетуберкулезных микобактерий окружающей среды. Такая широкая перекрестная реактивность PPD является причиной слабой специфичности TST, приводя к ситуации, когда вакцинация BCG и воздействие нетуберкулезных микобактерий дает результат теста, подобный тому, который наблюдается у инфицированных *M.tuberculosis* индивидов.

Инфекция *M.tuberculosis* опосредует выраженный клеточно-опосредованный иммунный (СМИ) ответ и выявление иммунных клеток и любого продукта, происходящего из таких клеток, которые образуются как часть специфического ответа на инфекцию *M.tuberculosis*, было бы подходящим способом для выявления инфекции (Andersen, 2000). Для того, чтобы получить такой специфический ответ, реагент должен 1) широко распознаваться инфицированными *M.tuberculosis* индивидами, и 2) быть специфическим в отношении *M.tuberculosis*, тем самым разграничивая инфекцию ТВ, вакцинацию BCG и воздействие нетуберкулезных микобактерий среды.

Геном *M.tuberculosis* предполагает 4018 открытых рамок считывания (<http://tuberculist.epfl.ch/>, выпуск R27 - март 2013 г.). Однако, лишь незначительная часть из них представляет собой Т-клеточные антигены с выраженным и широким распознаванием мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС) от пациентов-людей с ТВ. Были разработаны алгоритмы для прогноза эпитопов Т-клеток, однако необходима экспериментальная проверка для идентификации иммунодоминантных антигенов CFP10 и ESAT-6. Внеклеточные белки или белки культурального фильтрата (CF) *M.tuberculosis* составляют белковую фракцию, обогащенную Т-клеточными антигенами (Andersen 1994) и разделение белков CF при помощи подхода на основе двухмерной протеомики привело к идентификации 59 Т-клеточных антигенов человека, из которых 35 были описаны ранее (Deenadayalan, 2010). Хотя перечень может быть и не исчерпывающим, он подчеркивает, что лишь небольшая часть из примерно 900 белков CF (Albrethsen,

2013) представляет собой Т-клеточные антигены. По логике следует ожидать, что наиболее иммунодоминантные антигены, кодируемые геномом *M.tuberculosis*, представляли ли бы подмножество с наибольшей экспрессией и при помощи используемых в настоящее время технологий было бы возможным ранжировать гены в соответствии с уровнями транскрипции при определенных условиях роста. Однако, вклад, который уровень транскрипции вносит в иммуногенность, является невысоким и его нельзя использовать систематически для точного определения того, какие гены кодируют релевантные антигены (Sidders, 2008).

Кандидата для высокоспецифичного реагента можно было бы искать среди антигенов из участков RD (участки делеции) генома *M.tuberculosis*. Эти участки представляют геномные делеции из штамма *M. bovis* для вакцины BCG по отношению к вирулентному штамму *M.tuberculosis* (Behr, 1999). Таким образом, теоретически, белки, из этих участков (белки RD), были бы отличными кандидатами в качестве диагностических реагентов ТВ, т.е. они не распознавались бы здоровыми неинфицированными индивидами независимо от их статуса вакцинации BCG или воздействия непатогенных микобактериальных штаммов. Однако, из всех прогнозируемых геномных ORF (открытых рамок считывания), удаленных из BCG, по сути неизвестно, какие фактически экспрессируются в виде белков и, кроме того, иммунореактивность остается неизвестной до испытания сенсибилизированными лимфоцитами от индивидов с *M.tuberculosis*. Это можно выполнить, например, при анализе цельной крови, рестимуляцией РВМС или инъекцией в кожу веществ, подобных тем, которые вводят в пробе PPD/Манту. Например, при оценке Rv3872 были показаны небольшие ответы интерферона гамма (IFN- γ) у испытуемых пациентов-людей с ТВ (n=7) через 1-4 месяца после постановки диагноза (WO 99/24577), указывающие на то, что этот белок RD часто не распознается, а Rv3872, таким образом, далее не исследовался в качестве диагностического теста на основе СМІ.

Потенциальные специфические белки *M.tuberculosis* не ограничиваются белками RD, как, например, белок EspC (Rv3615c) специфически распознается у пациентов-людей с ТВ и инфицированного *M. bovis* скота, но не у вакцинированных/инфицированных BCG, даже несмотря на то, что ген присутствует в BCG (WO2009060184; Sidders, 2008; Millington, 2011). Отсутствие реакции у вакцинированных BCG индивидов наиболее вероятно связано с тем, что секреция Rv3615c прекращается в BCG, поскольку она зависит от системы секреции ESX-1, которая частично расположена в локусе RD1 и которая отсутствует в BCG. Этот антиген представляет собой реагент для СМІ диагностики, который считается таким же сильным, как ESAT-6 и CFP10, индуцируя выраженный ответ IFN- γ (там же).

Когда потенциальный специфический Т-клеточный антиген будет идентифицирован, то необходимо проверить, что антиген специфически распознается у инфицированных *M.tuberculosis* индивидов, но не у вакцинированных BCG лиц. В отношении Rv3873 из RD1, как оказалось, белок являлся членом семейства белков с консервативным мотивом в аминокислотах 118-135, также присутствующих в других белках *M.tuberculosis*. Поскольку широко распознаваемый Т-клеточный эпитоп присутствовал в этом мотиве, вакцинированные BCG индивиды также отвечали на пептид, включающий эту последовательность (Liu, 2004). Однако, перекрестная реактивность также наблюдалась в отношении Rv3878 и Rv3879c, хотя никакой гомологии не было выявлено при сравнении с последовательностями других известных микобактериальных белков (Liu, 2004) подчеркивая то, что специфичность потенциального кандидата для диагностики необходимо проверять экспериментально. Аналогичным образом, Rv2653c из RD13 распознавался как у вакцинированных BCG доноров, так и пациентов с ТВ, несмотря на то, что поиски в базах данных согласно алгоритму BLAST не показали никакого очевидного микобактериального белка, который мог объяснить наблюдаемую перекрестную реактивность (Aagaard, 2004).

Идентифицировав специфические белки *M.tuberculosis* с потенциалом для диагностики инфекции *M.tuberculosis* при помощи анализа на основе СМІ, остается исследовать, обеспечит ли пул таких белков/пептидов предпочтительную чувствительность для диагностического теста. Невозможно спрогнозировать вклад конкретного антигена в чувствительность после комбинации с уже определенными диагностическими антигенами; это необходимо экспериментально оценивать для каждого антигена, и предпочтительно у пациентов с ТВ из разных регионов с различным генетическим фоном.

Диагностический потенциал CFP10 (Rv3874), ESAT-6 (Rv 3875), двух низкомолекулярных белков из участка RD1 и TB7.7 (Rv2654) очень хорошо описан (Brock, 2004; Moon, 2013, WO2004099771) и в настоящее время используется в различных диагностических реагентах, зарегистрированных для применения у человека. Пептиды, включающие CFP10 и ESAT-6, используются в тесте T-SPOT®.TB, который представляет собой исследование клеток крови, которое выявляет иммунный ответ Т-клеток, обнаруженных в РВМС, которые были рестимулированы ESAT-6 и CFP10. Этот ответ выявляется при помощи высокочувствительного метода иммуноферментных пятен, обозначаемого ELISPOT, и коммерциализированного в виде теста T-SPOT.TB. Этот тест является высокочувствительным и независимым от статуса вакцинации BCG. Другим зарегистрированным тестом для выявления инфекции *M.tuberculosis*, является QuantiFERON®-TB Gold, который представляет собой технологию диагностики in-vitro, которая позволяет выявлять иммунные ответы в образцах цельной крови при ре-стимуляции пептидами, включающими ESAT-6, CFP10 и один пептид из TB7.7. Оба из этих тестов измеряют продукцию интерферона-гамма

(IFN- γ) в ответ на воздействие пулов селективных специфических антигенных пептидов и в настоящее время считаются самыми современными. Тест T-SPOT.TB и QuantiFERON®-TB в целом признаются в виде анализов высвобождения IFN- γ (IGRA).

Другие цитокины и хемокины, отличные от IFN- γ , также характеризовались релевантностью при контроле иммунологического ответа на микобактериальные антигены. Индуцированный IFN- γ белок (IP-10) экспрессируется при 100-кратных уровнях по сравнению с IFN- γ , а диагностические анализы на основании секреции IP-10 обладали диагностическими возможностями, сопоставимыми с анализами высвобождения IFN- γ (Ruhwald, 2009).

Кроме этих *in vitro* тестов, которые уже зарегистрированы для применения у человека и используются во всем мире, ESAT-6 и CFP10 также оказались эффективными в качестве реагентов для внутрикожных проб. Клинические исследования показали, что внутрикожную пробу, используемую также, как и PPD, но с применением ESAT-6 и CFP10, получаемых и доставляемых в виде рекомбинантных белков, можно использовать для диагностики инфекции *M.tuberculosis* и на нее не влияет статус вакцинации BCG (Aggerbeck, 2013).

Несмотря на широкое применение BCG и нескольких диагностических способов, в том числе IGRA, TB продолжает наносить урон в виде почти двух миллионов смертей в год, и, таким образом, существует дальнейшая потребность для развития иммунодиагностических тестов с повышенной чувствительностью. Пациенты с пониженным иммунитетом имеют повышенный риск развития TB и, к сожалению, как TST, так и IGRA в их настоящем виде проявляют субоптимальные свойства в этих группах. Группы пациентов с наибольшей потребностью в улучшенном тестировании включают: инфицированных HIV пациентов, пациентов с иммуноопосредованными воспалительными заболеваниями, пациентов, получающих иммуносупрессивное лечение (например, преднизолон или ингибиторы TNF- α) и пациентов с хронической почечной недостаточностью. Например, хорошо известно, что среди инфицированных HIV низкое количество клеток CD4 (например, <250 клеток/мкл) значительно связано с более высокими уровнями неопределенного результата тестов, нарушенной чувствительностью тестов на активный TB и сниженной вероятностью положительного ответа тестов у индивидов, претерпевших воздействие, что описано в (Redelman-Sidi, 2013).

Другой очень релевантной группой для целевого тестирования являются дети. Диагностика латентной инфекции TB (LTBI) и TB у детей является затруднительной, микробиологическое подтверждение инфекции часто не получают и лечение направлено лишь на клинические проявления. Как у активно, так и предположительно латентно инфицированных маленьких детей, иммунная система является незрелой, и это является вероятной причиной меньшего высвобождения цитокинов и нарушенным проведением IGRA. Недавно было показано, что тест QuantiFERON®-TB Gold характеризовался чувствительностью 53% у 81 ребенка с микробиологически подтвержденным TB, указывая на потребность в улучшенных иммунодиагностических тестах инфекции *M.tuberculosis* у детей (Schopfer, 2013).

Основной проблемой проведения теста IGRA в группах пациентов высокого риска, упомянутых выше (например, с пониженным иммунитетом, инфицированных HIV, детей) является то, что лежащее в основе иммуносупрессивное состояние, которое приводит к повышенному риску заболевания TB, само по себе характеризуется низкими CMI ответами и низким высвобождением IFN- γ в ответ на антигены. Поскольку результат IGRA определяется на основании сравнения величины высвобождения IFN- γ с граничной величиной, нарушенное высвобождение IFN- γ повышает риск того, что результат теста станет ложно-отрицательным. Таким образом, специалисту очевидно, что включение более специфических антигенов вовлечет больше специфических T-клеток и приведет к усиленному CMI ответу и высвобождению IFN- γ и впоследствии снижению риска ответа ниже граничной величины. Таким образом, добавление дополнительных специфических антигенов решает вопрос основного ограничения в тестах IGRA улучшением диагностической чувствительности.

Другим преимуществом диагностики инфекции *M.tuberculosis* на основе ответов более высокой величины является повышенная аналитическая точность и более надежные результаты тестов. В тесте QuantiFERON®-TB Gold граничная величина положительного теста составляет 0,35 ME/мл или 17,5 пг/мл, т.е. очень низкую концентрацию, которую сложно определить с высокой точностью - даже чувствительными методами, такими как ELISA. Например, в самом крупном на данный момент исследовании точности IGRA была обнаружена значительная вариабельность ответа при TB, измеренная при помощи QuantiFERON-TB Gold In-Tube при повторном исследовании образца одного и того же пациента. Вариабельность в пределах индивидов включала различия до 0,24 ME/мл в каждом направлении, в то время как первоначальный ответ составлял от 0,25 до 0,80 ME/мл. Это привело к заключению, что положительные результаты теста QuantiFERON TB Gold In-Tube менее 0,59 ME/мл следует интерпретировать осторожно (Metcalfe AJRCCM 2012).

Моделирующие исследования указывают на то, что без новых вакцин TB невозможно уничтожить, а новые и более эффективные вакцины представляют собой международный приоритет. Общая идея заключается в том, чтобы дополнить используемую в настоящее время вакцину BCG бустерной субъединичной вакциной или создать новую живую вакцину против TB для замещения BCG. В клинической раз-

работке имеется возрастающее число экспериментальных вакцин и перспективным общим мнением является то, что ESAT-6, по-видимому, является необходимым антигеном вакцины. Таким образом, многие из новых вакцин, находящихся в настоящее время на доклиническом этапе или в клинических испытаниях, содержат ESAT-6. Недавно, фонд Aeras анонсировал первое испытание на человеке содержащей ESAT-6 вакцины, разработанной для защиты людей, уже латентно инфицированных ТВ, от развития активной формы болезни ТВ (Aagaard, 2011). Некоторые кандидаты для живых вакцины также разработаны непосредственно рекомбинантными инженерными методами с целью экспрессии ESAT-6, например, rBCG:GE (Yang, 2011), rM.S-e6c10 (Zhang, 2010), Salraonella/Ag85B-ESAT-6 (Hall, 2009), rBCG-A(N)-E-A(C) (Xu, 2009) или слитые белки, включающие ESAT-6, например, HI (van Dissel, 2010; van Dissel, 2011). К сожалению, применение диагностических средств на основе ESAT-6 в тесте IGRA и вакцинация содержащей ESAT-6 вакциной, является точным повторением проблемы перекрестной реакции, связанной с параллельным применением TST и BCG.

Следовательно, существует большая потребность в специфическом диагностическом реагенте, который можно использовать параллельно с содержащими как BCG, так и ESAT-6, вакцинами. При применении *in vivo* или *in vitro* анализ реагент должен быть способным выявлять инфекции *M.tuberculosis* у людей и животных и разграничивать не только инфекцию ТВ и вакцинацию BCG или новыми содержащими ESAT-6 вакцинами, но также воздействие непатогенных микобактерий среды. Диагностический реагент должен характеризоваться по меньшей мере такой же чувствительностью, как и используемая в настоящее время комбинация ESAT-6, CFP10 и в некоторых диагностических анализах TB7.7.

В EP 2417456 описана такая система, где применение Rv3615c совместно с CFP-10 обеспечивает диагностическую чувствительность, которая очень похожа с комбинацией ESAT-6/CFP-10.

Поскольку уникальные характеристики ESAT-6 являются высокоиммуногенными и специфическими для инфекции *M.tuberculosis*, маловероятно, что замещение ESAT-6 одним антигеном повысит чувствительность по сравнению с ESAT при изучении различных популяционных групп. Это было продемонстрировано, например, Brock и др., которые показали, что распознавание одних антигенов составляло 14-43% у пациентов с ТВ по сравнению с ESAT-6, который давал ответ у 75% в той же группе пациентов. Учитывая, что большинство антигенов являются менее иммуногенными по сравнению с ESAT-6, более вероятно, что необходим пул антигенов для ответов более высокой величины и улучшенной диагностической чувствительности.

В соответствии с примерами сложно предсказать чувствительность и специфичность антигенных комбинаций; наоборот, для этого требуется подробная разработка специфических антигенных комбинаций. Кроме этого, при повышении числа пептидов в диагностическом пуле, вносится дополнительный риск снижения специфичности при повышении числа ложно-положительных результатов, подчеркивая то, что диагностические или иммуногенные композиции для специфической диагностики ТВ нуждаются в тщательном отборе и исследовании.

Таким образом, существует острая потребность в улучшенной *in vivo* или *in vitro* кле-точно-опосредованной иммунологической диагностике инфекции *M.tuberculosis* у человека или животного. Существует потребность в антигенных комбинациях, которые повышают чувствительность (что дает меньше ложно-отрицательных результатов) по сравнению с существующими антигенными комбинациями без нарушения специфичности (количества ложно-положительных результатов). Необходимые улучшенные антигенные комбинации относятся как к антигенным композициям, не включающим антиген ESAT-6 для прогноза ситуации при введении содержащей ESAT-6 вакцины, так и к антигенным комбинациям, содержащим ESAT-6 для улучшения существующих в уровне техники диагностических реагентов.

Данные демонстрируют, что комбинации CFP10/ESAT6 и CFP10/Rv3615 можно дополнительно улучшать добавлением пептидов, полученных из трех новых антигенов с диагностическим потенциалом. Этот новый результат является неожиданным по двум причинам:

а) Большинство (>99%) антигенов в отношении генома ТВ являются неспецифическими и общими у различных микобактериальных видов, поэтому идентификация значительно распознаваемых антигенов, которые являются специфическими для *Mycobacterium tuberculosis*, была очень сложной

б) Чувствительность диагностической комбинации CFP10/RV3615c и CFP10/ESAT6 уже является очень высокой, поэтому дополнительное повышение чувствительности становится все более сложным вследствие неспецифических ответов.

Настоящее изобретение, таким образом, является очень обнадеживающим, поскольку оно описывает пептиды со способностью не только повышать чувствительность комбинации CFP10/RV3615c, но также используемого в настоящее время диагностического коктейля, который включает ESAT6, при этом не нарушая специфичности.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к улучшенному выявлению инфекций, вызываемых видами ТВ комплекса (*M.tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), и разграничению инфекции ТВ и вакцинации. Улучшенная диагностическая композиция не должна нарушать эффекта антигенов из 1) новой содержащей ESAT-6 вакцины против ТВ, 2) BCG или 3) от воздействия непатогенных микобактерий среды. Настоя-

шее изобретение раскрывает улучшенные диагностические или иммуногенные композиции, которые можно использовать либо *in vivo*, либо *in vitro*, для выявления клеточного ответа на инфекцию *M.tuberculosis* и, тем самым, использовать для диагностики ТВ. Используя коктейль или пул антигенов, или коктейль или пул пептидов, включающих эти антигены, был разработан высокочувствительный тест, несмотря на отсутствие ESAT-6 в диагностических или иммуногенных композициях. Кроме того, дополнительно были улучшены содержащие ESAT-6 диагностические иммуногенные композиции, используемые в настоящее время.

Детальное описание изобретения

Данный диагностический способ основан на клеточно-опосредованном иммунологическом (СМІ) распознавании антигенов, экспрессируемых бактериями *M.tuberculosis* (или другими микобактериями из туберкулезного комплекса) во время инфекции. Таким образом, тест не требует присутствия бактерий в виде традиционной культуры, микроскопических или ПЦР-методов. Это означает, что тест можно использовать на ранней стадии инфекции и что тест применим независимо от анатомического расположения инфекции. Способ является идеальным при прослеживании контакта в качестве замещения используемого в настоящее время TST.

Выбирая специфические антигены *M.tuberculosis* с теоретическим диагностическим потенциалом и исследуя распознавание у ряда пациентов-людей с ТВ, стало возможным идентифицировать три диагностических пула, которые 1) не имеют ESAT-6 и, тем самым, могут также использоваться у вакцинированных ESAT-6 индивидов для разграничения инфекции *M.tuberculosis* и вакцинации, 2) характеризовались такой же высокой специфичностью, как и содержащие ESAT-6 диагностические пулы, и 3) характеризовались чувствительностью в отношении инфекции *M.tuberculosis*, превосходящей таковую, которая была получена комбинацией ESAT-6, CFP10 и TB7.7.

Настоящее изобретение раскрывает диагностическую или иммуногенную композицию, содержащую смесь практически чистых полипептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей, выбранных из:

а) Rv3874 (SEQ ID NO1), Rv3615 (SEQ ID NO 2) и дополнительных композиций, выбранных из Rv3865 (SEQ ID NO 3), Rv2348 (SEQ ID NO 4), Rv3614 (SEQ ID NO 5), Rv2654 (SEQ ID NO 6) и Rv3877 (SEQ ID NO 7); или б) смеси фрагментов указанных полипептидов; или в) где в выбранной смеси последовательности полипептидов или фрагментов указанных полипептидов по меньшей мере на 80% идентичны любому из полипептидов из набора а) или б), и при этом она является иммуногенной.

При обстоятельствах, когда содержащие ESAT-6 вакцины не будут зарегистрированы для применения у человека, в областях, где содержащие ESAT-6 вакцины не предполагается использовать, и при других обстоятельствах, например, для дополнительного повышения чувствительности диагностического теста, любую из упомянутых выше диагностических или иммуногенных композиций, можно дополнить ESAT-6 (SEQ ID NO 51) или ее одним или несколькими фрагментами.

Предпочтительная диагностическая композиция содержит смесь из фрагментов, содержащих иммуногенные эпитопы Rv3874, Rv3615 и необязательно ESAT-6, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 1, выбраны из SEQ ID NO 9-14 и фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 2, выбраны из SEQ ID NO 15-18 или SEQ ID NO 59-63 и фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 51, выбраны из SEQ ID NO 52-58, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 3, выбраны из SEQ ID NO 19-21 и фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 4, выбраны из SEQ ID NO 22-25 и фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 5, выбраны из SEQ ID NO 26-45 и где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 6 представляют собой SEQ ID NO 8 и фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 7 выбраны из SEQ ID NO 46-50.

Полипептиды в диагностической или иммуногенной композиции могут присутствовать в виде отдельных структур или когда некоторые или все из полипептидов слиты вместе необязательно посредством линкеров или спейсеров.

Предпочтительная диагностическая или иммуногенная композиция содержит пул или смесь из SEQ ID NO 9 -14, SEQ ID NO 15-18, SEQ ID NO 19-21 и SEQ ID NO 22-25, упомянутых в примерах в виде пептидного пула А.

Подробное описание предпочтительных полипептидов и фрагментов указанных полипептидов

CFP10 (SEQ ID NO 1) представляет собой основной белок ESX-1. Были выбраны следующие 6 пептидов, включающие все аминокислотные последовательности CFP10 (SEQ ID NO: 9-14)

Rv3615c (SEQ ID NO: 2) представляет собой белок, секретируемый системой ESX-1. Были выбраны 4 пептида, включающие аминокислоты 55-103 (SEQ ID NO: 15-18). Альтернативными пептидами, включающими С-концевую часть Rv3615, являются пять пептидов с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59-63.

Rv3865 (SEQ ID NO: 3) представляет собой белок, связанный с секрецией ESX-1: Были выбраны 3 пептида, включающие аминокислоты 9-44 (SEQ ID NO: 19-21). Rv2348c (SEQ ID NO: 4) расположен в участке RD7, который, как было показано, отсутствует в BCG: Были выбраны 4 пептида, включающие

аминокислоты 56-109 из последовательности белка полной длины (SEQ ID NO: 22-25).

Rv3614c (SEQ ID NO: 5) представляет собой секретируемый белок: Были выбраны 20 пептидов, включающие всю последовательность (SEQ ID NO 26-45). Rv2654c (SEQ ID NO: 6)) представляет собой белок с неизвестной функцией, кодируемый участком RD11: был выбран 4 пептид (SEQ ID NO: 8).

Rv3877 (SEQ ID NO: 7) расположен в участке RD1 и не присутствует в BCG: Были выбраны 5 пептидов, включающие аминокислоты 220-284 в белке полной длины (511 aa) (SEQ ID NO: 46-50)

ESAT-6 (Rv3875; SEQ ID NO: 51) представляет собой основной белок ESX-1. Были выбраны 7 пептидов, включающие всю последовательность (SEQ ID NO: 52-58).

Настоящее изобретение дополнительно раскрывает применение диагностических или иммуногенных композиций для получения фармацевтической композиции для диагностики ТБ, вызванного вирулентными микобактериями, например, *M.tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* или *Mycobacterium africanum*, или средства или набора для СМІ диагностики, содержащего диагностическую или иммуногенную композицию, упомянутую выше, для *in vitro* или *in vivo* диагностики ТБ.

Настоящее изобретение также раскрывает *in vitro* и *in vivo* способы диагностики ТБ, вызванного вирулентными микобактериями, например, *M.tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* или *Mycobacterium bovis*, у животного, в том числе, человека, при помощи упомянутых выше диагностических или иммуногенных композиций.

In vivo способ диагностики ТБ включает внутрикожную инъекцию животному, в том числе, человеку, фармацевтической композиции, определенной выше, где положительная кожная реакция в месте инъекции указывает на то, что у животного имеется ТБ, а отрицательная кожная реакция в месте инъекции указывает на то, что у животного отсутствует ТБ.

In vitro способ диагностики ТБ включает приведение в контакт образца, например, цельной крови, с диагностической композицией согласно настоящему изобретению для выявления положительной реакции, например, пролиферации клеток или высвобождения цитокинов, таких как IFN- γ .

Настоящие диагностические и иммуногенные композиции могут замещать композиции, которые используются в настоящее время в общепринятых тестах IGRA (CFP10/Rv3874 и ESAT-6/Rv3875 в тесте TB.SPOT®.TB и TB7.7/Rv2654c, CFP10/Rv3874 и ESAT-6/Rv3875 в QuantiFERON®-TB Gold).

Способ дополнительно включает следующее улучшение по сравнению с CFP10/Rv3874 и ESAT-6/Rv3875 в тесте TB.SPOT®.TB и TB7.7/Rv2654c, CFP10/Rv3874 и ESAT-6/Rv3875 в QuantiFERON®-TB Gold:

Если индивид был вакцинирован содержащей ESAT-6 вакциной, такой как субъединичная белковая вакцина, содержащая ESAT-6, или рекомбинантная живая вакцина, разработанная инженерными методами, или экспрессирующая ESAT-6 сама по себе, то в композиции избегают использование ESAT-6 и она, таким образом, при этом остается специфической для инфекции *M.tuberculosis*. Это не относится к CFP10 и ESAT-6 в тесте TB.SPOT®.TB и TB7.7, CFP10 и ESAT-6 в QuantiFERON®-TB Gold или любом другом тесте на основе ESAT-6.

Содержащие ESAT-6 композиции используются в СМІ тестах в отношении *M.tuberculosis*. В представленном тесте можно избежать применения ESAT-6 и он обладает преимуществом широкого распознавания, полученного в результате использования нескольких специфических для *M.tuberculosis* антигенов. В тесте при комбинации CFP10, Rv3615c, Rv3865 и Rv2348 (пептидный пул А) получают чувствительность 87% и специфичность 98% по сравнению с чувствительностью 74% и специфичностью 96% при использовании антигена квантиферона. Таким образом, несмотря на отсутствие ESAT-6, который, как известно, является высокочувствительным антигеном и распознается большей частью индивидов, имеющих инфекцию *M.tuberculosis*, исследуемые в данном документе композиции характеризуются уровнем чувствительности, который больше на 10% по сравнению с хорошо известными композициями на основе ESAT-6 и в настоящее время используемыми в анализах IGRA.

В данном документе также представлены данные, показывающие, что при добавлении ESAT-6 к пептидному пулу, состоящему из CFP10, Rv3615c, Rv3865 и Rv2348, можно дополнительно улучшать диагностические возможности. При добавлении ESAT-6 к определенному пептидному пулу можно повысить величину ответов, которые могли бы быть релевантными для диагностики у индивидов с различными иммуносупрессивными осложнениями, например, HIV, или для применения, например, у детей. Также при использовании комбинации пептидов от всех пяти антигенов (CFP10, ESAT-6, Rv3865, Rv2348 и Rv3615c) можно было бы увеличить частоту пациентов с подтвержденным диагнозом ТБ на 3% по сравнению с использованием только пула из CFP10, Rv3615c, Rv2348 и Rv3865.

Настоящее изобретение также раскрывает *in vivo* исследование диагностики ТБ. Его можно было бы провести в формате кожной пробы на животном, в том числе, человеке, при помощи композиций, упомянутых выше. При этом кожную пробу проводят путем внутрикожной инъекции животному или нанесения на кожу животных, например, при помощи пластыря или повязки, композиции согласно настоящему изобретению. Положительная кожная реакция в месте инъекции или нанесения указывает на то, что у животного или человека имеется ТБ, а отрицательная кожная реакция в месте инъекции или нанесения указывает на то, что у животного отсутствует ТБ.

Необязательно, чтобы пептидные пулы согласно настоящему изобретению содержали белки полной длины, поскольку последовательности всего из 6-9 аминокислот (Т-клеточный эпитоп) достаточно для возникновения иммунного ответа, однако, белки полной длины также будут применимы. Поскольку специалисту возможно определить точную и минимальную аминокислотную последовательность для Т-клеточного эпитопа, включенную в белок, то настоящее изобретение также относится к фрагментам (иммуногенным участкам) полипептидов, содержащих указанные Т-клеточные эпитопы (или их аналоги) без специфических дополнительных аминокислот в виде белков полной длины и слитых белков, содержащих указанные Т-клеточные эпитопы (необязательно соединенные посредством линкера или спейсера), и к коктейлям или пулам, содержащим такие полипептиды или слитые белки.

Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения описаны в примерах и в формуле изобретения.

Определения Полипептиды

Слово "полипептид" в настоящем изобретении должно иметь свое общепринятое значение. Оно означает аминокислотную цепь любой длины, в том числе первичный продукт трансляции, олигопептиды, короткие пептиды и их фрагменты, где аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями. Полипептид может быть химически модифицирован гликозилированием, образованием соединений с липидами, например, путем химической липидизации с палмитоилоксисукцинимидом, как описано Mowat и др. (Mowat, 1991), или с додеканоил хлоридом, как описано (Lustig, 1976), включением протетических групп, или содержанием добавочных аминокислот, таких как, например, меченный гистидином или сигнальный пептид.

Таким образом, каждый полипептид может быть охарактеризован специфическими аминокислотами, и кодироваться специфическими последовательностями нуклеиновых кислот. Будет понятно, что такие последовательности включают аналоги и варианты, полученные рекомбинантными или синтетическими способами, при которых такие полипептидные последовательности модифицируются замещением, вставкой, добавлением или делецией одного или нескольких аминокислотных остатков в рекомбинантном полипептиде, и все еще будут иммуногенными в каком-либо из биологических анализов, описанных в данном документе. Замещения предпочтительно являются "консервативными". Они определены согласно следующей таблице. Аминокислоты в одном и том же блоке во второй колонке и предпочтительно в одной и той же строке в третьей колонке можно заменить друг на друга. Аминокислоты в третьей колонке обозначены однобуквенным кодом.

Алифатические	Неполярные	GAP
		ILV
	Полярные-незаряженные	CSTM
		NQ
	Полярные-заряженные	DE
		KR
Ароматические		HFYW

Предпочтительный полипептид в рамках настоящего изобретения представляет собой фрагмент иммуногенного антигена из *M.tuberculosis*. Такой антиген можно получить, например, из клетки *M.tuberculosis* и/или культурального фильтрата *M.tuberculosis*. Таким образом, полипептид, содержащий иммуногенный участок одного из упомянутых выше антигенов, может полностью состоять из иммуногенного участка или может содержать дополнительные последовательности. Дополнительные последовательности можно получить из нативного антигена *M.tuberculosis* или они могут быть гетерогенными, и такие последовательности могут, но не должны, быть иммуногенными.

В настоящем контексте выражение "практически чистый полипептидный фрагмент" означает препарат полипептида, который содержит по большей мере 10% по весу вещества других полипептидов, с которыми он связан естественным образом (более низкое процентное содержание вещества других полипептидов является предпочтительным, например, по большей мере 4%, по большей мере 3%, по большей мере 2% и по большей мере 1). Предпочтительно, чтобы практически чистый полипептид был по меньшей мере на 96% чистым, т.е. чтобы полипептид составлял по меньшей мере 96% по весу от общего вещества полипептидов, присутствующих в препарате, и более высокое процентное содержание является предпочтительным, такое как, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,25%, по меньшей мере 99,5% и по меньшей мере 99,75%. Особенно предпочтительно, чтобы полипептидный фрагмент находился в "практически чистой форме", т.е. чтобы полипептидный фрагмент практически не содержал никакого другого антигена, с которым он связан естественным образом, т.е. не содержал никакого другого антигена из бактерий, принадлежащих к туберкулезному комплексу или вирулентной микобактерии. Это можно осуществить при помощи получения полипептидного фрагмента рекомбинантными методами в немикобактериальной клетке-хозяине, как будет подробно

описано ниже, или путем синтеза полипептидного фрагмента при помощи общепринятых способов твердо- или жидкофазного пептидного синтеза, например, при помощи способа, описанного (Merrifield 1963) или его вариаций.

Под "туберкулезом" (ТВ) понимают инфекцию, вызванную вирулентной микобактерией из туберкулезного комплекса, способной вызвать инфекцию ТВ и заболевание у животного или у человека. Примерами вирулентных микобактерий являются *M.tuberculosis*, *M. africanum* и *M. bovis*. Примерами релевантных животных являются крупный рогатый скот, посумы, барсуки и кенгуру.

Под "пациентом с ТВ" понимают индивида с культурально или микроскопически доказанной инфекцией вирулентными микобактериями, и/или индивида, клинически диагностированного ТВ, и который отвечает на химиотерапию против ТВ. Культуральная, микроскопическая и клиническая диагностика ТВ хорошо известна любому специалисту в данной области.

Под выражением "реакция гиперчувствительности замедленного типа" (ДТН) понимают опосредованный Т-клетками воспалительный ответ, возникший после инъекции полипептида в кожу или нанесения на кожу, при этом указанный воспалительный ответ появляется через 72-96 часов после инъекции или нанесения полипептида.

Под выражением "цитокин" понимают иммуномодулирующее средство, такое как интерлейкины и интерфероны, которое можно использовать в качестве показателя иммунологического ответа. Оно включает, например, интерферон-гамма "IFN-γ", интерферон-гамма индуцибельный белок 10, также известный как CXCL10 или "IP-10", и интерлейкин 2 (IL-2).

Везде в данном описании, если контекст не требует иного, выражение "содержать", или его варианты, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как включение определенного элемента, или целого, или группы элементов или целых, но без исключения какого-либо другого элемента или целого, или группы элементов или целых.

Идентичность последовательностей

Выражение "идентичность последовательностей" указывает количественную меру степени гомологии между двумя аминокислотными последовательностями равной длины или между двумя нуклеотидными последовательностями равной длины. Две последовательности, подлежащие сравнению, должны быть выравнены до наиболее точного соответствия, возможного при вставке гэпов или альтернативно усечении на концах белковых последовательностей. Идентичность последовательностей можно рассчиты-

вать в виде $\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$, где N_{dif} представляет собой число неидентичных остатков в двух последовательностях после выравнивания, и где N_{ref} представляет собой число остатков в одной из последовательностей. Следовательно, последовательность ДНК AGTCAGTC будет на 75% идентична последовательности AATCAATC ($N_{dif}=2$ и $N_{ref}=8$). Гэп рассчитывают в виде неидентичности специфического(их) остатка(остатков), т.е. последовательность ДНК AGTGTC будет на 75% идентична последовательности ДНК AGTCAGTC ($N_{dif}=2$ и $N_{ref}=8$). Идентичность последовательностей может быть альтернативно рассчитана при помощи программы BLAST, например, программы BLASTP (Pearson, 1988) (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). Согласно одному аспекту настоящего изобретения выравнивание выполняют при помощи способа выравнивания последовательностей ClustalW со стандартными параметрами, описанными Thompson, et al (Thompson, 1994), доступно на <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>.

Предпочтительный минимальный процент идентичности последовательностей -составляет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% и по меньшей мере 99,5%.

Иммуногенный эпитоп

Иммуногенный эпитоп полипептида представляет собой часть полипептида, которая вызывает иммунный ответ у животного или человека, и/или в биологическом образце, определяемый при помощи любого из биологических анализов, описанных в данном документе. Иммуногенный эпитоп полипептида может представлять собой Т-клеточный эпитоп или В-клеточный эпитоп. Иммуногенный эпитоп может быть связан с одной или несколькими относительно небольшими частями полипептида, они могут быть рассеяны по всей полипептидной последовательности или расположены в конкретных участках полипептида. Для нескольких полипептидов даже было показано, что эпитопы рассеяны по всему полипептиду, охватывая всю последовательность (Ravn, 1999).

Для того чтобы идентифицировать соответствующие Т-клеточные эпитопы, которые распознаются в ходе иммунного ответа, можно использовать способ "грубой силы": Поскольку Т-клеточные эпитопы являются линейными, делеционные мутанты полипептида будут, при систематическом их конструировании, указывать на то, какие области полипептида имеют принципиальное значение в иммунном распознавании, например, путем проведения для этих делеционных мутантов, к примеру, IFN-γ анализа, описанного в данном документе. В другом способе для обнаружения эпитопов МНС II класса применяют перекрывающиеся пептиды, предпочтительно синтетические, имеющие длину, например, 20 аминокис-

лотных остатков, полученных из полипептида. Эти пептиды можно исследовать при помощи биологических анализов (например, IFN- γ анализа, описанного в данном документе), и некоторые из них будут давать положительный ответ (и, таким образом, будут иммуногенными) в качестве доказательства присутствия в пептиде Т-клеточного эпитопа. Для обнаружения эпитопов МНС I класса возможно спрогнозировать пептиды, которые будут связываться (Stryhn, 1996) и затем производить эти пептиды синтетически, и исследовать их с помощью соответствующих биологических анализов, например IFN- γ анализа, описанного в данном документе. Пептиды предпочтительно имеют длину, например, от 8 до 11 аминокислотных остатков, полученных из полипептида.

Хотя минимальная длина Т-клеточного эпитопа, как показано, составляет, по меньшей мере 6 аминокислот, нормально, если такие эпитопы состоят из более длинных отрезков аминокислот. Следовательно, предпочтительно, чтобы полипептидный фрагмент по данному изобретению имел длину, по меньшей мере 7 аминокислотных остатков, например, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 14, по меньшей мере 16, по меньшей мере 18, по меньшей мере 20, по меньшей мере 22, по меньшей мере 24 и по меньшей мере 30 аминокислотных остатков. Следовательно, согласно важным вариантам осуществления способа по данному изобретению предпочтительно, чтобы полипептидный фрагмент имел длину, по большей мере 50 аминокислотных остатков, например, по большей мере 40, 35, 30, 25 и 20 аминокислотных остатков. Ожидается, что пептиды, имеющие длину от 10 до 30 аминокислотных остатков, будут наиболее эффективными как эпитопы МНС класса II, и поэтому особо предпочтительные длины полипептидного фрагмента, применяемого в способе по данному изобретению, составляют 18, например, 15, 14, 13, 12 и даже 11 аминокислотных остатков. Ожидается, что пептиды длиной от 7 до 12 аминокислотных остатков будут наиболее эффективными как эпитопы МНС класса I, и поэтому особо предпочтительные длины полипептидного фрагмента, применяемого в способе по данному изобретению, составляют 11, например, 10, 9, 8 и даже 7 аминокислотных остатков.

Иммуногенные участки (фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы) полипептидов, содержащие иммуногенный эпитоп, могут распознаваться большей частью (высокая частота) или незначительной частью (низкая частота) генетически гетерогенной человеческой популяции. Кроме того, некоторые иммуногенные участки индуцируют сильные иммунологические ответы (доминантные), в то время как другие индуцируют более слабые, но все же значимые, ответы (субдоминантные). Высокая частота <низкая частота может относиться к иммуногенному участку, связывающемуся с широко распространенными молекулами МНС (типа HLA) или даже несколькими молекулами МНС (Sinigaglia, 1988; Kilgus, 1991). Фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из указанных полипептидов, могут присутствовать в виде перекрывающихся пептидов длиной по меньшей мере 10 аминокислот, тем самым включая несколько эпитопов.

Варианты

Общей чертой полипептидов композиций по настоящему изобретению является их способность индуцировать иммунологический ответ, как показано в примерах. Подразумевается, что вариант полипептида по настоящему изобретению, полученный замещением, вставкой, добавлением или делецией, также является иммуногенным, как определено каким-либо из анализов, описанных в данном документе.

Иммунный индивид

Иммунный индивид определяется как человек или животное, которое избавилось от инфекции или контролирует инфекцию, вызванную вирулентными микобактериями, или получило вакцинацию BCG *M. bovis*.

Иммуногенный

Иммуногенный полипептид определяется как полипептид, который индуцирует иммунный ответ в биологическом образце или у особи, в настоящее время или ранее инфицированной вирулентной микобактерией. Иммуногенный полипептид является синонимом для антигена или антигенного полипептида, а два выражения иммуноген и антиген используются без различия в данном раскрытии; узким определением для антигена является то, что он способен связываться специфическим с Т- или В-клеточным рецептором, а узким определением для иммуногена является то, что он способен вызывать иммунный ответ, однако, если это касается диагностики, то содержание двух выражений является одинаковым и, таким образом, они используются в данном документе без различия.

СМІ диагностика

Иммунный ответ можно контролировать одним из следующих способов: *in vitro* СМІ ответ определяют по высвобождению релевантного цитокина, такого как IFN- γ , из лимфоцитов, изъятых из животного или человека, в настоящий момент или ранее инфицированного вирулентными микобактериями, или по выявлению пролиферации этих Т-клеток. Индукцию выполняют добавлением иммуногенной композиции к суспензии клеток крови, содержащей предпочтительно от 1×10^5 клеток до 1×10^6 клеток на лунку. Клетки выделяют из крови, селезенки, печени или легкого и добавляют иммуногенную композицию до концентрации, например, 1-200 мкг на мл суспензии, а стимуляцию выполняют от двух до пяти дней. Для контроля клеточной пролиферации клетки метят радиоактивным тимидином и через 16-22 ч инкуба-

ции пролиферацию измеряют подсчетом в жидком сцинтиллаторе или другими способами для выявления пролиферативного ответа. Высвобождение IFN- γ можно определить методом ELISA, хорошо известным специалисту в данной области. Другие цитокины и хемокины, отличные от IFN- γ , могли бы быть релевантными при контроле иммунологического ответа на полипептид, такие как IL-2, IL-12, TNF- α , IL-4, TGF- β , IP-10, MIP-1 β , MCP-1, IL-1RA и MIG. Другим и более чувствительным способом определения наличия цитокина (например, IFN- γ) является способ ELISPOT, в котором клетки, выделенные, например, из крови, разбавляют до концентрации предпочтительно $1-4 \times 10^6$ клеток/мл и инкубируют на 18-22 часов в присутствии диагностической или иммуногенной композиции до концентрации предпочтительно 1-200 мкг на мл. После этого клеточные суспензии разбавляют до $1-2 \times 10^6$ /мл и переносят в микротитрационные планшеты с поливинилиденфторидной мембраной, покрытые антителом к IFN- γ , и инкубируют предпочтительно на 4-16 ч. Продуцирующие IFN- γ клетки определяют при использовании меченого вторичного антитела к IFN- γ и релевантного субстрата, образующего пятна, которые можно подсчитать при помощи диссекционного микроскопа. Анализ FluoroSpot является модификацией анализа ELISPOT и основан на применении нескольких флуоресцентных антицитокинов, что делает возможным определять два цитокина в одном и том же анализе, потенциально способствуя улучшенному прогнозу риска заболевания, как описано ниже для совместного определения IL-2 и IFN- γ . Также возможно определять наличие цитокинового или хемокинового ответа при помощи иммунохроматографической технологии. Этот вид анализа, хорошо известный по экспресс-тестам на беременность, обеспечивает быстрое выявление уровня высвобожденного цитокина или хемокина, и обеспечивает диагностику инфекций и заболеваний, кроме того, в ограниченных по ресурсам условиях. Другие иммуноанализы, в том числе колориметрические анализы, такие как турбидиметрия, хорошо известны специалисту и могут использоваться для высокопроизводительного выявления уровней цитокинов или хемокинов. Также возможно определить присутствие mRNA, кодирующей релевантный цитокин, с помощью методики полимеразной цепной реакции (PCR). Выявление цитокина или хемокина по уровню mRNA обычно является более быстрым, чем по уровню белка, поскольку транскрипция mRNA предшествует синтезу белка. Например, уровни mRNA цитокина IFN- γ и хемокина IP-10 являются оптимальными при более коротких инкубационных периодах по сравнению с уровнем белка. Цитокиновые и хемокиновые сигналы, выявляемые по уровню mRNA, можно определять уже через 2 ч после стимуляции, а максимальные уровни достигаются через 6-10 ч. Обычно будут измерять один или несколько цитокинов при помощи, например, PCR, иммунохроматографического анализа, ELISPOT или ELISA. Специалисту в данной области будет понятно, что значимое увеличение или уменьшение количества любого из этих цитокинов, индуцированных специфическим пептидом, можно применять при оценке иммунологической активности полипептида. Также специалисту будет понятно, что определенные паттерны высвобождения цитокинов связаны с определенными клиническими состояниями. В частности, преобладание IFN- γ над IL-2, как предполагалось, указывало на раннюю активную форму заболевания TB, в то время как преобладание IL-2 над IFN- γ указывает на контроль инфекции и низкий риск развития заболевания TB, несмотря на присутствие инфекции у млекопитающего, подлежащего исследованию (Biselli, 2010; Sester, 2011).

In vitro СМІ ответ можно повысить добавлением цитокинов, таких как IL-7 и/или IL-15, также повышенное высвобождение можно выполнить блокированием ингибиторных веществ, таких как IL-10, IL-4, IL-5 и/или IL-13. Подобные СМІ ответы можно более надежно выявить, если условия культивирования in vitro являются оптимальными для клеток, испытывающих стимуляцию. Наступление таких условий можно ускорить добавлением питательных веществ, например, в форме простых или сложных сахаров.

Более простым и при этом чувствительным способом является использование образцов цельной крови без предварительного выделения мононуклеарных клеток. При помощи этого способа образец гепаринизированной цельной крови (с предварительным лизисом или без предварительного лизиса эритроцитов) в количестве 50-1000 мл инкубируют в течение от 18 ч до 6 дней при помощи диагностической или иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению до концентрации предпочтительно 1-200 мкг/мл суспензии. Супернатант собирают и высвобождение IFN- γ (или любого другого релевантного высвобожденного цитокина, например, IP-10, IL-2 или других) можно определить при помощи метода ELISA, который хорошо известен специалисту в данной области.

Другим, также простым и при этом чувствительным, in vitro способом определения СМІ ответа является покрытие образца пятнами - после инкубации с диагностической или иммуногенной композицией на фильтровальной бумаге, например ватмане 903 или ватмане FTA. После высушивания покрытый пятнами образец стабилизируют, а уровни цитокинов и хемокинов в образце можно определить на более поздней стадии. СМІ ответы легко выявляются при помощи упомянутых выше методик для измерения белка или mRNA. Этот способ особенно применим в ограниченных ресурсами условиях или для высокопроизводительного приготовления и анализа образцов.

Другой in vitro способ включает забор крови в пробирки с вакуумом, предварительно покрытые иммуногенными полипептидами или слитыми белками, к которым необязательно также добавляют стабилизатор крови, такой как гепарин, и/или питательные вещества. Предварительно покрытые пробирки для инкубации обеспечивают простой забор крови и устраняют риск воздействия гемоконтактной ин-

фекции во время приготовления образца для инкубации *in vitro*. Такие пробирки с вакуумом являются идеальными для высокопроизводительной обработки и автоматического анализа.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к *in vitro* способу диагностики текущей или предыдущей сенсбилизации у животного или человека, инфицированного вирулентной микобактерией, при этом способ включает получение образца крови от животного или человека, и приведение в контакт образца от животного с полипептидами или композицией согласно настоящему изобретению, при этом значимое высвобождение в межклеточную фазу по меньшей мере одного цитокина - мононуклеарными клетками в образце крови указывает на то, что животное является сенсбилизированным. При этом положительным ответом является ответ, который больше, чем высвобождение из образца крови, полученного от пациента без диагноза ТВ, плюс два стандартных отклонения.

In vitro СМІ ответ можно также определить при помощи Т-клеточных линий, полученных от иммунного индивида или инфицированного *M.tuberculosis* человека, где Т-клеточные линии активировали живыми микобактериями, экстрактами из бактериальной клетки или культуральным фильтратом в течение 10-20 дней с добавлением ИЛ-2. Индукцию выполняют добавлением предпочтительно 1-200 мкг полипептида на мл суспензии к Т-клеточным линиям, содержащим, например, от 1×10^5 до 3×10^5 клеток на лунку, а инкубацию выполняют от двух до шести дней. Индукцию IFN- γ или высвобождение другого релевантного цитокина определяют при помощи ELISA. Стимуляцию Т клеток также можно контролировать по выявлению клеточной пролиферации при помощи радиоактивно меченого тимидина, как описано выше. Для обоих анализов положительным ответом является ответ, превышающий фон, плюс два стандартных отклонения.

In vivo СМІ ответ (например, кожную пробу, внутрикожную пробу, кожную пробу после нанесения пластыря), который можно определить как положительный DTH ответ после внутрикожной инъекции или местного нанесения пластыря, предпочтительно 1-200 мкг каждого полипептида в диагностической или иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению индивиду, который клинически или субклинически инфицирован вирулентной бактерией, при этом положительный ответ заключается в диаметре по меньшей мере 5 мм через 72-96 ч после инъекции или нанесения.

Чувствительность любого конкретного диагностического теста определяет часть индивидов с положительным ответом, которые корректно идентифицированы или диагностированы при помощи теста, например, чувствительность равняется 100%, если все индивиды с определенным состоянием характеризуются положительным тестом. Специфичность конкретного скринингового теста отражает часть индивидов без состояния, которые корректно идентифицированы или диагностированы при помощи теста, например, специфичность равняется 100%, если все индивиды без состояния характеризуются отрицательным результатом теста.

Чувствительность определяют в виде части индивидов с определенным состоянием (например, активной формой инфекции ТВ), которые корректно идентифицированы при помощи описанных способов согласно настоящему изобретению (например, имеют положительный результат теста на IFN- γ).

Специфичность в данном документе определяют в виде части индивидов без состояния (например, без воздействия активной формы инфекции ТВ), которые корректно идентифицированы при помощи описанных способов согласно настоящему изобретению (например, имеют отрицательный результат теста на IFN- γ).

График зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов

Точность диагностического теста лучше всего описывают при помощи его графика зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC) (Zweig, 1993). График ROC представляет собой график всех пар чувствительность/специфичность, полученных в результате непрерывного изменения порога принятия решений во всем диапазоне наблюдаемых данных.

Клинические возможности лабораторного теста зависят от его диагностической точности, или способности правильно классифицировать субъектов в клинически релевантные подгруппы. Диагностическая точность измеряет способность теста правильно разграничивать два различных состояния исследуемых субъектов. Такими состояниями являются, например, здоровье и болезнь, латентная или недавняя инфекция или отсутствие инфекции, или доброкачественное или злокачественное заболевание.

В каждом случае график ROC показывает перекрытие между двумя распределениями при нанесении на графике чувствительности и 1 - специфичность для полного диапазона порогов принятия решений. На оси у представлена чувствительность, или истинно положительная доля [определенная в виде (число истинно положительных результатов теста) / (число истинно положительных + число ложно-отрицательных результатов теста)]. Ее также обозначали в виде положительной пробы в присутствии заболевания или состояния. Ее рассчитывают исключительно исходя из пораженной подгруппы. На оси x представлена доля ложно-положительных результатов, или 1 - специфичность [определенная в виде (число ложноположительных результатов)/(число истинно отрицательных + число ложноположительных результатов)]. Она является показателем специфичности и ее рассчитывают исключительно исходя из непораженной подгруппы.

Поскольку истинно и ложноположительные доли рассчитываются исключительно отдельно, при

использовании результатов тестов из двух различных подгрупп, то график ROC не зависит от частоты заболевания в выборке. Каждая точка на графике ROC представляет собой пару чувствительность /- специфичность, соответствующую определенному порогу принятия решений. Тест при совершенном разграничении (без перекрытия двух распределений результатов) характеризуется графиком ROC, который проходит через верхний левый угол, где истинно положительная доля составляет 1,0, или 100% (абсолютная чувствительность), а ложноположительная доля составляет 0 (абсолютная специфичность). Теоретический график для теста без разграничения (одинаковые распределения результатов для двух групп) представляет собой 45-ую диагональную линию из нижнего левого угла в верхний правый угол. Большинство графиков располагаются между этими крайними вариантами. (Если график ROC располагается полностью под 45-ой диагональю, то это легко исправляется обращением критерия "положительной пробы" из "более чем" в "менее чем" или наоборот.) В качественном отношении, чем ближе график располагается к верхнему левому углу, тем больше общая точность теста.

Одна удобная цель для количественного определения диагностической точности лабораторного теста заключается в выражении его возможностей одним числом. Наиболее распространенным общим показателем является площадь под графиком ROC. Для удобства эта площадь всегда $> 0,5$ (если нет, то можно обратить правило принятия решения с тем, чтобы сделать ее таковой). Величины находятся между 1,0 (абсолютное разделение величин теста двух групп) и 0,5 (никакого видимого различия распределений между двумя группами величин тестов). Площадь зависит не только от определенной части графика, такой как точка, ближайшая к диагонали, или чувствительность при 90% специфичности, но и от всего графика. Она является количественным, описательным выражением того, насколько близок график ROC к абсолютному графику (площадь = 1,0).

Клиническую пользу новых антигенных пулов можно оценивать при сравнении и в комбинации с другими диагностическими средствами для конкретной инфекции. В случае инфекции *M.tuberculosis* клиническую пользу CMI результата можно оценить при сравнении с общепринятыми диагностическим тестами, такими как IGRA или TST при помощи анализа кривой зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов.

Способы получения

Как правило, антигены *M. tuberculosis* и ДНК последовательности, кодирующие такие антигены, можно получить при помощи любой из множества процедур.

Их можно очистить в виде нативных белков из клетки *M.tuberculosis* или культурального фильтра при помощи процедур, таких как описаны выше. Иммуногенные антигены также можно получить рекомбинантно при помощи последовательности ДНК, кодирующей антиген, которая была вставлена в вектор экспрессии и экспрессируется в подходящем хозяине. Примерами клеток-хозяев являются *E. coli*. Полипептиды или их иммуногенную часть можно также получать синтетически, имея менее чем приблизительно 100 аминокислот, и, как правило, менее чем 50 аминокислот, и можно получать при помощи методик, хорошо известных специалистам в данной области, таких как коммерчески доступные твердофазные методики, где аминокислоты последовательно добавляют к растущей аминокислотной цепи.

При конструировании и подготовке плазмидной ДНК, кодирующей слитый полипептид, можно применять штамм-хозяин, такой как *E. coli*. Затем можно получать плазмидную ДНК из суточных культур штамма-хозяина, несущего плазмиду, представляющую интерес, и очищать ее с использованием, например, колонки из набора для выделения плазмид Qiagen Giga (Qiagen, Санта-Кларита, Калифорния, США), включая этап удаления эндотоксина.

Слитые белки

Несмотря на существование в виде отдельных структур, два или более из иммуногенных полипептидов можно также получать в виде слитых белков, при этих способах можно достичь лучших характеристик полипептидов согласно настоящему изобретению. Например, все партнеры слияния, которые облегчают экспорт полипептида при получении рекомбинантным способом, партнеры слияния, которые облегчают очистку полипептида, и партнеры слияния, которые усиливают иммуногенность полипептидного фрагмента согласно настоящему изобретению, представляют собой интересные возможности. Таким образом, настоящее изобретение также относится к слитому полипептиду, содержащему по меньшей мере два (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) полипептидных или иммуногенных фрагмента, определенных выше, и необязательно по меньшей мере одного дополнительного партнера слияния, и к композициям, содержащим слитые белки. Партнер слияния может с целью усиления иммуногенности представлять собой другой полипептид, полученный из *M.tuberculosis*, например, полипептидный фрагмент, полученный из бактерии, принадлежащей к туберкулезному комплексу, такой как ESAT-6, TB10.4, CFP10, RD1-ORF2, Rv1036, MPB64, MPT64, Ag85A, Ag85B (MPT59), MPB59, Ag85C, липопротеин 19 кДа, MPT32 и альфа-кристаллин, или по меньшей мере один T-клеточный эпитоп любого из упомянутых выше антигенов (WO0179274; WO01041519; Nagai, 1991; Rosenkrands, 1998; Skjot, 2000). Настоящее изобретение также относится к слитым полипептидам, содержащим взаимные слияния двух или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) из полипептидов (или их иммуногенных частей) по настоящему изобретению.

Подписи к фигурам

Фиг. 1. Тепловая карта, показывающая иммунное распознавание у 34 доноров-добровольцев из Египта, исходя из граничной величины 100 пг/мл IFN- γ . Два пациента характеризовались латентным ТВ (субъекты 1 и 2) и у 32 пациентов было диагностировано заболевание ТВ (субъекты 3-34). Символ белого цвета указывает на отсутствие ответа, символ серого цвета указывает на ответ и символ черного цвета указывает ответ на определенный антиген при отсутствии ответа либо на ESAT-6, либо на CFP10.

Фиг. 2. Тепловая карта, показывающая иммунное распознавание у 31 донора-добровольца из Гренландии, исходя из граничной величины 50 пг/мл IFN- γ . У 14 было диагностировано заболевание ТВ (субъекты 1-14) и 17 характеризовались латентным ТВ (субъекты 15-31). Символ белого цвета указывает на отсутствие ответа, символ серого цвета указывает на ответ и символ черного цвета указывает ответ на определенный антиген при отсутствии ответа либо на ESAT-6, либо на CFP10.

Фиг. 3. Тепловая карта, показывающая иммунное распознавание у 30 эндемичных контрольных доноров из Египта, исходя из граничной величины 100 пг/мл IFN- γ . Все доноры были вакцинированы BCG и не имели в анамнезе заболевания ТВ или известного контакта с пациентом с ТВ. Доноры были определены как "эндемичный контроль", поскольку они жили в Египте, который считается промежуточной эндемичной страной. Символ белого цвета указывает на отсутствие ответа и символ серого цвета указывает на ответ. Все исследованные антигены были высокоспецифическими в противоположность PPD, который был включен в качестве примера неспецифической антигенной стимуляции. Оба донора 31 и 77 распознавали широкий диапазон антигенов *M. tuberculosis*, указывая на латентную инфекцию, несмотря на упомянутые критерии отбора.

Фиг. 4. Ответы IP-10 на пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10, Rv2654c (пептид 4)) и на пептидный пул А у 73 пациентов с ТВ из Египта. Пунктирная линия указывает медианные ответы на 6 нг/мл для антигенов квантиферона и на 5,5 нг/мл для пептидного пула А.

Фиг. 5. Ответы IP-10 на пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10, Rv2654c (пептид 4)) и на пептидный пул А у 100 индивидов из Дании, не подвергшихся воздействию *M. tuberculosis*. Пунктирная линия указывает медианные ответы на 0 нг/мл для обоих антигенных пулов. Она показывает высокую специфичность (немного ложно-положительных результатов) всего пула пептидов, указывая на то, что каждый пептид характеризуется высокой специфичностью.

Фиг. 6. Ответы IFN- γ на пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10, Rv2654c (пептид 4)) и пептидный пул А у 100 индивидов из Дании, не подвергшихся воздействию *M. tuberculosis*. Пунктирная линия указывает медианный ответ на 0 пг/мл для пептидного пула А и на 4,9 пг/мл для антигенов квантиферона. Она показывает высокую специфичность (немного ложно-положительных результатов) всего пула пептидов, указывая на то, что каждый пептид характеризуется высокой специфичностью.

Фиг. 7. Анализ кривой зависимости чувствительности от частоты ложноположительных результатов (ROC), сравнивающий диагностический потенциал пептидного пула А в отношении антигенов квантиферона у 100 индивидов из Дании, не подвергшихся воздействию *M. tuberculosis*, и 73 пациентов с ТВ. Она показывает высокую специфичность (немного ложно-положительных результатов) всего пула пептидов, указывая на то, что каждый пептид характеризуется высокой специфичностью.

Фиг. 8. Ответы IP-10 (нг/мл) на пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10 и Rv2654c) и на пептидный пул А в 68 случаях пациентов с микробиологически подтвержденным ТВ и у 36 эндемичных контрольных пациентов из Танзании.

Фиг. 9. Ответы IP-10 (нг/мл) на пептидный пул А и пептидный пул А, обогащенный ESAT-6, у 73 пациентов с подтвержденным ТВ из Каира, Египет. Линия указывает медиану.

Примеры

Пример 1. Первоначальный выбор антигенов

Т-клеточные антигены, выбранные для иммунодиагностики ТВ, должны были быть специфическими в отношении инфекции *M. tuberculosis* с целью избежания интерференции от вакцинации BCG и наиболее распространенных атипических микобактерий. В то же время, важно было избегать ESAT-6, учитывая, что ESAT-6 присутствует во многих из новых вакцин против ТВ. Как было описано выше, в Предпосылках изобретения, в процессе тщательного и прямого отбора на основании теоретических положений, практического исследования и литературного поиска сотен потенциальных антигенов, выбирали не более 9 антигенов *M. tuberculosis* для дальнейшего исследования. Они представляют собой CFP10 (Rv3874). 10 кДа антиген культурального фильтрата вместе с ESAT-6 является основой используемых в настоящее время клеточных диагностических тестов крови на инфекцию *M. tuberculosis* при помощи анализов высвобождения IFN- γ (IGRA). CFP10 представляет собой иммунодоминантный антиген *M. tuberculosis*, а диагностическая специфичность CFP10 и ESAT-6 вызвана их геномным расположением в области различия гена 1 (RD1), участке, который отсутствует во всех штаммах BCG (Behr, 1999) и включен в патогенез *M. tuberculosis*. Гены, кодирующие компоненты пути секреции ESX-1, также расположены в RD1. В обзоре исследований анализов интерферона- γ описывали чувствительность CFP10 61-71% у пациентов с ТВ (Pai, 2004). В противоположность ESAT-6, CFP10 не является частью каких-либо из используемых в настоящее время кандидатов для вакцин в процессе оценки.

Rv3877

Как и CFP10, ген Rv3877 расположен в участке RD1 на хромосоме *M.tuberculosis* и не имеет близких гомологов где-либо еще в геноме *M.tuberculosis*. Белок не присутствует в BCG *M. bovis* или микобактериях среды *M. avium* и, таким образом, может быть использован для специфической диагностики *M.tuberculosis* без интерференции от возможной предшествующей вакцинации BCG или мощного воздействия микобактерий среды, таких как *M. avium*. Rv3877 представляет собой трансмембранный белок и ключевой компонент секрети ESX-1, поскольку он образует пору, через которую секретируются субстраты ESX-1 (Abdallah, 2007). Пул синтетических пептидов, включающий белок Rv3877, индуцировал положительные ответы в 33% РВМС, выделенных от пациентов-людей с ТВ (Mustafa, 2008).

Rv3614c и Rv3615c

Генный кластер *espA-espC-espD* (Rv3616c-Rv3615c-Rv3614c) необходим для ESX-1-зависимой секреции белков и вирулентности *M.tuberculosis* (Fortune, 2005; MacGurn, 2005), и недавно было описано, что эти три гена котранскрибируются (Chen, 2012). Rv3616c и Rv3615c секретируются совместно с ESAT-6 и CFP10 (Fortune, 2005; MacGurn, 2005), в то время как секреция Rv3614c не требует непосредственно функций ESX-1 (Chen, 2012). У крупного рогатого скота партнер Rv3615c *M. bovis*, Mb3645c, стимулировал ответы IFN- γ у 37% инфицированных *M. bovis* животных, но не у наивных и вакцинированных BCG животных (Sidders, 2008). Mb3645c и Rv3615c характеризовались 100% идентичностью аминокислот. У крупного рогатого скота С-концевая часть белка Mb3645c (аминокислоты 57-103) была наиболее иммуногенной (Sidders, 2008). У людей Rv3615c также выявляли в качестве потенциального кандидата для специфической иммунодиагностики *M.tuberculosis* на основе Т-клеток с распознаванием случаев ТВ и низких ответов у вакцинированных BCG (Millington, 2011). У пациентов с активной формой ТВ большинство часто распознаваемых пептидов располагались в С-концевой части молекулы (аминокислоты 66-90). Несмотря на то, что ген, кодирующий Rv3615c, присутствует в BCG, белок Rv3615c специфически распознается у инфицированных *M.tuberculosis* индивидов, но при ограниченном распознавании у вакцинированных BCG людей.

EspF (Rv3865)

Белок EspF, связанный с секрецией ESX-1, или Mb3895 *M. bovis* (идентичный Rv3865 из *M.tuberculosis*), был идентифицирован Ewer и др. (Ewer, 2006) в качестве многообещающего диагностического маркера у крупного рогатого скота, инфицированного экспериментально или естественным путем *M. bovis*. Пятьдесят процентов экспериментально инфицированного крупного рогатого скота отвечали на пептидный пул Mb3895, в то время как вакцинированные BCG телята не отвечали на этот пептидный пул.

Rv2348c

Rv2348c представляет собой гипотетический белок с неизвестной функцией. Ген Rv2348c расположен в участке RD7. Было показано, что этот участок отсутствовал в BCG (Behr, 1999) и белок, таким образом, может быть использован для диагностики ТВ без интерференции от предшествующей вакцинации BCG. Ген является высокотранскрибируемым *in vitro* (Arnvig, 2011), а белок идентифицирован в протеомных исследованиях (de Souza, 2011). Фрагмент аминокислот 23-50 в ORF Rv2348c (открытой рамке считывания) характеризуется высокой гомологией с геном Mav_2040 *M. avium*.

Rv3873 Участок из аминокислотной последовательности Rv3873, включающий аминокислоты 12-70, был покрыт перекрывающимися пептидами. Среди нескольких оцениваемых пептидных пулов RD этот пул из пептидов Rv3873, названный Rv3873A, идентифицировали в качестве одного из наиболее многообещающих пулов, распознаваемых 46% РВМС от пациентов с ТВ (Brock, 2004). Потенциальные перекрестно-реактивные отрезки не присутствовали в этой части молекулы.

Rv3878

Как описано выше для Rv3873, определяли и оценивали пептидный пул, названный Rv3878B, включающий аминокислоты 122-189 этого белка RD1. Он распознавался 32% РВМС от пациентов-людей с ТВ, и был предложен в качестве пептидного коктейля или пула, который можно было комбинировать с ESAT-6 и CFP10 до максимального повышения чувствительности (Brock, 2004).

Rv2654c

Ген Rv2654c кодировался участком RD11 и кодировал возможный белок профага PhiRv2 с неизвестной функцией. При скрининге перекрывающихся пептидов, включающих весь белковый продукт Rv2654c (обозначенный TB7.7), Brock и др. не обнаружили перекрестного распознавания у вакцинированных BCG индивидов и, кроме того, показали чувствительность 47% (Brock, 2004). Выбранный пептид (SEQ ID NO 8) был включен в тест QuantiFERON® TB Gold.

Таблица 1. Перечень последовательностей для выбранных пептидов

Белок	Пептид	SEQ ID NO.
Rv2654	P4	8
CFP10 (Rv3874)	P1-P6	9-14
Rv3615c	P1-P4	15-18
Rv3865	P1-P3	19-21
Rv2348	P1-P4	22-25
Rv3614	P1-P20	26-45
Rv3877	P1-P5	46-50

Пример 2. Выбор антигенов

Семь из антигенов, перечисленных в описании выше, исследовали в отношении распознавания у пациентов с ТВ или латентно инфицированных индивидов в двух независимых исследованиях в Египте и Гренландии. В обоих исследованиях ESAT-6 (Rv3875) также включали в качестве антигена для сравнения и эталонного антигена. Кроме того, PPD включали в Египте в качестве примера неспецифической антигенной стимуляции.

Свежеотобранную разбавленную цельную кровь рестимулировали выбранными пептидами от антигенов, как изложено, а ответ на пептидные пулы ESAT-6 и CFP10 включали в качестве эталона.

В египетское исследование включали 34 донора-добровольца (8 женщин и 26 мужчин) в качестве положительного контроля. У тридцати двух из них было диагностировано заболевание ТВ с подтвержденной положительной культурой мокроты (субъекты 3-34). Два пациента характеризовались латентной формой ТВ (субъекты 1 и 2). Кроме того, включали 30 эндемных доноров отрицательного контроля (5 женщин и 25 мужчин). Все они предположительно были вакцинированы BCG, не имели в анамнезе заболевания ТВ и не имели известного контакта с пациентом с ТВ. В гренландское исследование включали 31 субъект (15 женщин и 16 мужчин). У четырнадцати было диагностировано заболевание ТВ (субъекты 1-14); в 11 случаях с подтвержденной положительной культурой мокроты и в 4 случаях постановку диагноза ТВ выполняли на основании клинических данных. Оставшиеся 17 субъектов характеризовались латентной формой ТВ (субъекты 15-31).

В обоих исследованиях свежеотобранную разбавленную цельную кровь стимулировали в планшетах с выбранными антигенами (10 мкг/мл каждого пептида). Синтетические пептиды (полученные из Genecust) из антигенов ESAT-6, CFP10, Rv3873, Rv3878, Rv3615c, Rv3865, Rv3877 и Rv2348 подвергали скринингу в обоих исследованиях и также включали положительный (РНА) и отрицательный (только средний) контроль и (только в Египте) PPD (не показано). Разбавленную цельную кровь инкубировали при 37 градусах Цельсия в течение 5 дней, а затем супернатанты собирали и исследовали в отношении (IFN- γ) при помощи внутрилабораторного ELISA. Положительный ответ в этих исследованиях определяли в виде концентрации IFN- γ 100 или 50 пг/мл для египетского и гренландского исследования, соответственно.

На фиг. 1, 2 и 3 представлены графические представления (тепловые карты) данных, где отдельные содержащиеся величины представлены цветом, при этом белый цвет показывает отсутствие ответа, серый цвет указывает на ответ на определенный антиген и черный цвет представляет ответ на антиген, где тот же самый донор не отвечает на ESAT-6 и/или CFP10. Как показано, несколько из этих исследуемых антигенов распознавались у пациентов с ТВ или латентно инфицированных доноров, при этом наиболее распространенные ответы происходили в результате стимуляции Rv3615c (распознаваемым у 49% из доноров). Важно, что только ESAT-6 распознавали три пациента, при этом при стимуляции ими не распознавался CFP10 (пациент №9 и 17 на фиг. 1 и пациент №3 на фиг. 2) и из них Rv3615 мог распознаваться всеми тремя пациентами. Кроме того, рестимуляция Rv3615c характеризовалась распознаванием у 11 и 9 доноров, не распознаваемых ESAT-6 и CFP10, соответственно. В противоположность, два из антигенов распознавались у очень ограниченного числа доноров; Rv3873 распознавался лишь у двух из 65 доноров, а Rv3878 распознавался у семи из 65 доноров. Таким образом, несмотря на предыдущие данные по этим антигенам у пациентов с ТВ из Дании и Нидерландов с промежуточной чувствительностью (Rv3873 при 32% для Rv3878 и 46% для Rv3873 (Brock, 2004), данные, полученные в данном документе, указывали на то, что не все антигены, которые, как предполагалось, будут чувствительными, проявлялись во всех ситуациях. Rv3865, Rv3877 и Rv2348 характеризовались промежуточной чувствительностью и распознавались у 16, 12 и 15 из 65 доноров. Важно, что все антигены Rv3615c, Rv3865 и Rv2348 вызывали ответы у ряда доноров, которые не распознавали ESAT-6 и/или CFP10, дополнительно демонстрируя диагностический потенциал этих антигенов. Специфичность выбранных антигенов подтверждали в панели из 30 эндемных доноров отрицательного контроля из Египта (фиг. 3). Как показано, все исследованные антигены были высокоспецифическими в противоположность PPD, который был включен в качестве примера неспецифической антигенной стимуляции. Оба донора 31 и 77 распознавали широкий диапазон антигенов *M. tuberculosis*, в том числе ESAT-6 и CFP-10, выражено указывая на латентную инфекцию, несмотря на упомянутые критерии отбора.

Пример 3. CFP10 и 3615c сопоставимы с CFP10 и ESAT-6

Диагностические возможности комбинации CFP10 и Rv3615c затем сравнивали с таковыми комби-

нации CFP10 и ESAT-6. Включали образцы цельной крови от 35 индивидов из Гренландии, из которых 18 характеризовались латентной формой инфекции *M.tuberculosis*, определяемой в виде положительного квантиферонового теста и/или подтвержденного воздействия *M.tuberculosis* и изменением туберкулиновой кожной пробы, и 17 пациентов характеризовались микробиологически подтвержденным ТБ.

Отдельные аликвоты по 200 мкл неразбавленной цельной крови стимулировали перекрывающимися пептидами, представляющими CFP10 (SEQ ID 1) или Rv3615 (SEQ ID 15-18) или ESAT-6 (SEQ ID 51) в конечной концентрации 5 мкг/мл в увлажненном 37°C инкубаторе в течение 7 дней. Параллельно готовили образец отрицательного контроля (нулевой). После инкубации выделяли супернатант плазмы и уровень IFN- γ определяли при помощи ELISA.

Диагностическую способность трех антигенов оценивали добавлением измеряемого уровня антиген-специфической продукции IFN- γ (из уровня стимулированной цельной крови вычитали уровень в нестимулированной лунке) в ответ на стимуляцию отдельным(и) антигеном(ами), с последующим сравнением этой суммы с граничной величиной. Граничную величину определяли в виде объединенного антиген-специфического ответа по меньшей мере на 50 пг/мл и в 4 раза выше, чем нулевая величина у отдельного пациента. Антиген-специфические уровни выше граничной величины классифицировали отдельного пациента как антиген-положительного, а антиген-специфические уровни ниже граничной величины - как антиген-отрицательного.

В табл. 2 показана чувствительность отдельных антигенов CFP10, Rv3615c, ESAT-6 и комбинаций. Как показано, диагностические возможности комбинации CFP10 и Rv3615c были сопоставимы с таковыми CFP10 и ESAT-6, при этом обе комбинации характеризовались 60% чувствительностью. Комбинирование CFP10, Rv3615c и ESAT-6 дополнительно улучшало чувствительность с 60 до 69%.

Таблица 2. Сравнение чувствительности CFP10, Rv3615c и ESAT-6 и их комбинаций.

Антиген	% чувствительности
CFP10	49
Rv3615c	34
ESAT-6	31
CFP10 + Rv3615c	60
CFP10 + ESAT-6	60
CFP10 + Rv3615c + ESAT-6	69

Пример 4. Обогащение комбинации CFP10 и Rv3615c тремя антигенами: Rv2348, Rv3865 и Rv3877

Используя те же самые образцы цельной крови, как описано выше (35 индивидов из Гренландии; 18 с латентной формой инфекции *M.tuberculosis* и 17 пациентов с микробиологически подтвержденным ТБ), и те же самые условия анализа, оценивали эффект комбинирования CFP10 и Rv3615c с тремя различными антигенами; Rv2348, Rv3865 и Rv3877.

Диагностическую способность трех антигенов оценивали добавлением измеряемого уровня антиген-специфической продукции IFN- γ (из уровня стимулированной цельной крови вычитали уровень в нестимулированной лунке) в ответ на отдельный(ые) антигены), с последующим сравнением суммы с граничной величиной. Граничную величину определяли в виде объединенного антигенспецифического ответа по меньшей мере на 50 пг/мл и в 4 раза выше, чем нулевая величина у отдельного пациента. Антиген-специфические уровни выше граничной величины классифицировали отдельного пациента как антиген-положительного, а антиген-специфические уровни ниже граничной величины - как антиген-отрицательного.

В табл. 3 показана чувствительность отдельных антигенов Rv3865, CFP10, Rv3615c и комбинаций. Чувствительность Rv3865 была относительно небольшой, составляя лишь 20%, однако добавление Rv3865 к CFP10 и Rv3615c повышало общую диагностическую чувствительность на 6% по сравнению только с CFP10 и Rv3865.

Таблица 3. Сравнение CFP10, Rv3615c, Rv3865 и их комбинаций для диагностики инфекции *M.tuberculosis*

Антиген	% чувствительности
Rv3865	20
CFP10 + Rv3615c	60
CFP10 + Rv3615c + Rv3865	66

Аналогично, диагностическая способность Rv3877 составляла лишь 11%, однако этот антиген так-

же усиливал общую чувствительность CFP10 и Rv3615c с 60 до 69% (табл.4).

Таблица 4. Сравнение CFP10, Rv3615c, Rv3877 и их комбинаций для диагностики инфекции *M.tuberculosis*

Антиген	% чувствительности
Rv3877	11
CFP10 + Rv3615c	60
CFP10 + Rv3615c + Rv3877	69

В конечном итоге, также оценивали способность Rv2348 к повышению диагностической способности CFP10 и Rv3615c (табл. 5). Как показано, чувствительность Rv2348 составляла 29%, а добавление Rv2348 к CFP10 и Rv3615c повышало диагностическую чувствительность на 23% по сравнению с использованием только CFP10 и Rv3615c.

Таблица 5. Сравнение CFP10, Rv3615c, Rv2348 и их комбинаций для диагностики инфекции *M.tuberculosis*.

Антиген	% чувствительности
Rv2348	29
CFP10 + Rv3615c	60
CFP10 + Rv3615c + Rv2348	83

Для дополнительной оценки чувствительности и специфичности выбирали следующие антигены (CFP10, Rv3615c, Rv3865 и Rv2348), объединяя эти 4 антигена в один пептидный пул (пептидный пул А).

Пример 5. Исследование чувствительности и специфичности пептидного пула А

В данной области хорошо известно, что иммунодиагностический коктейль, содержащий ESAT-6, CFP10 и TB7.7p4, является предпочтительным способом диагностики инфекции *M.tuberculosis*. Антигенный коктейль считается как чувствительным, так и специфичным, и он составляет основу квантиферонового теста. Как стало ясно из предыдущих примеров, комбинация антигенов улучшает диагностическую чувствительность и надежность теста, поскольку лежащая в основе величина ответов IFN- γ выше и выявлялась более сильно по сравнению с наличием только антигенов.

Очень удобным в использовании подходом является применение пробирок с вакуумом, предварительно покрытых антигенами в коктейле. Например, в квантифероновом тесте лиофилизированные пептиды, представляющие антигенный коктейль, покрывают гепарином в пробирке с вакуумом. Кровь собирают в такую пробирку, обеспечивая взаимодействие пептидов с антиген-специфическими CD4- и CD8 Т-клетками. Через 16-24 часов инкубации пробирку центрифугируют, и полученный уровень IFN- γ может быть измерен в супернатанте плазмы и сравнен с образцами отрицательного и положительного контроля. Исследуемые субъекты могут быть дополнительно классифицированы либо на инфицированных, либо на неинфицированных, если уровень выше граничной величины для результата положительного теста.

Хорошо известно, что другие иммунные эффекторнeе молекулы, связанные с передачей сигналов IFN- γ применимы для диагностики инфекции *M.tuberculosis* (Chego ERJ 2014). Хемокин IP-10 образуется при очень больших уровнях и характеризуется сопоставимыми диагностическими возможностями с IFN- γ .

Для демонстрации пользы комбинирования нескольких антигенов в один антигенный коктейль, авторы настоящего изобретения объединяли следующие антигены в "пептидный пул А". Пептидный пул А состоял из следующих пептидов:

CFP10: 6 пептидов, включающие всю аминокислотную последовательность CFP10 (SEQ ID NO: 9-14)

Rv3615c: 4 пептида, включающие аминокислоты 55-103 (SEQ ID NO: 15-18)

Rv3865: 3 пептида, включающие аминокислоты 9-44 (SEQ ID NO: 19-21)

Rv2348c: 4 пептида, включающие аминокислоты 56-109 из последовательности белка полной длины (SEQ ID NO: 22-25).

Второе и независимое исследование в Египте проводили с целью исследования чувствительности 4 антигенов при объединении в пептидный пул А. В исследование включали 73 пациента с ТВ с подтвержденной положительной культурой мокроты и каждый субъект предоставлял образец крови, отобранный непосредственно в предварительно подготовленные покрытые антигенами пробирки с вакуумом. Пробирки покрывали либо пептидами ESAT-6+CFP10+Rv2654c (т.е. теми же самыми пептидами, как и в квантифероновом тесте, и использовали в качестве эталона, обозначенного пептидным пулом квантиферона) или пептидным пулом А (CFP10 + Rv3516c + Rv3865 + Rv2348, как указано выше). Через 16-24 ч

инкубации супернатанты собирали и исследовали в отношении высвобождения цитокина IP-10 при помощи внутрилабораторного анализа ELISA. Как показано на фиг. 4, большая часть пациентов с ТВ распознавала как пептидный пул А, так и пептидный пул квантиферона. Медианные ответы составляли 5,5 нг/мл IP10 для пептидного пула А и 6,0 для пептидного пула квантиферона.

Параллельно, независимое исследование проводили в Дании с тем, чтобы исследовать специфичность пептидного пула А. В исследование включали 100 субъектов, проживающих в области с очень низкой частотой ТВ (Дания) и без известного воздействия *M. tuberculosis*. В 17 случаях субъекты были подтверждены вакцинированы BCG, а в 19 случаях статус вакцинации BCG был неизвестным/неподтвержденным. Оставшиеся участники не были вакцинированы BCG. Подобно исследованию чувствительности, свежую цельную кровь отбирали непосредственно в пробирки с вакуумом, предварительно покрытые либо пептидным пулом А (CFP10 + Rv3615c + Rv3865 + Rv2348), либо эталонным пептидным пулом квантиферона (ESAT-6 + CFP10 + Rv2654c). Через 16-24 ч инкубации супернатанты собирали и исследовали в отношении содержания цитокина IP-10 и IFN- γ при помощи внутрилабораторного анализа ELISA. Хотя оба медианных ответа IP-10 на пептидный пул А и пептидный пул квантиферона составляли 0 нг/мл (фиг. 5), несколько не подвергшихся воздействию доноров характеризовались положительными ответами при рестимуляции антигенами квантиферона при уровнях IP-10 примерно 5 нг/мл. Ту же самую тенденцию с не подвергшимися воздействию донорами, показывающую ложноположительные ответы, наблюдали при анализе секреции IFN- γ (фиг. 6; пептидный пул А - медиана 0 пг/мл, интерк-квартильная широта (IQR) -0,5-5,2 пг/мл и пептидный пул квантиферона - медиана 4,9 пг/мл, IQR -0,6-32,45 пг/мл).

Объединение данных из исследований чувствительности и специфичности позволило провести анализ кривой зависимости чувствительности от частоты ложноположительных результатов (ROC), сравнивая диагностический потенциал пептидного пула А с антигенным пулом квантиферона (фиг. 7). Площадь под кривой (AUC) составила 0,979 для пептидного пула А и 0,947 для антигенного пула квантиферона. При помощи анализа кривой ROC определяли оптимальные граничные величины как для пептидного пула А, так и для пептидного пула квантиферона в виде 1,4 нг/мл для пептидного пула А (чувствительность 87,7% при специфичности 98,1%), и 2,3 нг/мл для пептидного пула квантиферона (чувствительность 75,3% при специфичности 96,2%).

При помощи этих граничных величин сравнивали непосредственно число положительных и отрицательных ответов при рестимуляции пептидным пулом квантиферона и пептидным пулом А (табл.6 и 7). Из 73 пациентов с ТВ 54 (74%), распознали пептидные пулы квантиферона, находились в указанном диапазоне чувствительности антигенов квантиферона 64-89% (Dewan, 2007). Для сравнения, пептидный пул А распознавал большую часть пациентов с ТВ в этом исследовании (64 из 73 пациентов), соответствуя оцененной чувствительности 88%. На основании критерия Мак-Нимара пептидный пул А характеризовался значимо более высокой чувствительностью в данном исследовании по сравнению с пептидным пулом квантиферона ($p < 0,012$).

Таблица 6. Прямое сравнительное исследование пептидного пула квантиферона и пептидного пула А у 73 пациентов с ТВ.

		Пептидный пул А		
		Отрицательный	Положительный	Всего
Антигенный пул квантиферона	Отрицательный	6	13	19
	Положительный	3	51	54
Всего		9	64	73

Таблица 7. Прямое сравнительное исследование пептидного пула квантиферона и пептидного пула А у 100 предположительно инфицированных контрольных пациентов

		Пептидный пул А		
		Отрицательный	Положительный	Всего
Антигенный пул квантиферона	Отрицательный	95	1	96
	Положительный	2	2	4
Всего		97	3	100

В заключение следует отметить, что пептидный пул А характеризовался значимо более высокой чувствительностью (больше истинно положительных результатов, табл. 6) по сравнению с антигенами для квантиферона и, кроме того, был, по меньшей мере, таким же специфическим (сопоставимые ложноположительные результаты, табл. 7). Эти результаты явно показали, что возможно 1) разработать пептидные пулы для диагностики ТВ, лишённые ESAT-6, с более высокой чувствительностью по сравнению с используемыми в настоящее время антигенами для квантиферона, 2) разработать антигенный пул, не содержащий ESAT-6, со специфичностью, сопоставимой с используемым в настоящее время квантифе-

роном.

Пример 6. Валидация пептидного пула А.

Специалисту хорошо известно, что валидация граничных величин для иммунодиагностических тестов требует подтверждения в независимых когортах. Для этой цели было включено 68 случаев пациентов с микробиологически подтвержденным ТВ и 36 эндемичных контрольных пациентов, т.е. индивидов, из которых некоторые имели ранее существующую, но контролируруемую инфекцию *M.tuberculosis* из Танзании.

От каждого донора забирали 1 мл крови в 5 пробирок с вакуумом, содержащих лиофилизированный гепарин (18 МЕ) и пептиды (5 мкг/пептид), приведенные ниже: пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10 и TB7.7p4 (пробирка 1), сопоставимый с квантифероновым тестом), пептидный пул А (CFP10, Rv3615, Rv3865 и Rv2348B (пробирка 2)) и пробирку для отрицательного контроля (пробирка 3).

На фиг. 8 показаны ответы в отношении пробирки отрицательного контроля (пробирки 3) за вычетом IP-10 (нг/мл) в случаях болезни и контрольных пациентов из пробирки 1 и пробирки 2. Очевидно, что пептидный пул квантиферона и пептидный пул А сопоставимы с точки зрения высокой величины ответа в случаях ТВ. Как ожидалось, ответы эндемичных контрольных пациентов были более гетерогенными, указывая на то, что некоторые обследованные индивиды были инфицированы.

Используя заранее определенную граничную величину, идентифицированную в примере 5 (1,4 нг/мл), диагностическую точность сравнивали как для пациентов с ТВ (табл.8), так и для эндемичных контрольных пациентов (табл.9). В группе пациентов с ТВ диагностическая чувствительность стандартного пептидного пула квантиферона составляла 66% (45 из 68 включенных пациентов определены в качестве положительных) и была более высокой для пептидного пула А с чувствительностью 72% (49 из 68 пациентов определены в качестве положительных). Как ожидалось, соответствие между двумя тестами было очень высоким, при этом соответствие составляло 91% (44 были положительными в обоих тестах, 18 были отрицательными в обоих тестах с общим соответствием 62 из 68).

Таблица 8. Соответствие между пептидным пулом квантиферона и пептидным пулом А после классификации ответов на стимуляцию антигеном от 68 пациентов с подтвержденным ТВ с использованием заранее определенной граничной величины для положительного теста

Пациенты с ТВ		Пептидный пул квантиферона		
		Положительный	Отрицательный	Сумма
Пептидный пул А	Положительный	44	5	49
	Отрицательный	1	18	19
	Сумма	45	23	68

В эндемичной контрольной популяции отсутствовал золотой стандарт для инфекции, в связи с этим частоту представляли в виде положительных респондеров. При помощи пептидного пула А было выявлено 39% (14/36) в качестве положительных, а при помощи стандартного пептидного пула квантиферона - 31% (11/36), что еще раз указывало на более высокую чувствительность. Соответствие также было очень высоким (92% соответствия в 33 случаях из 36 включенных).

Таблица 9. Соответствие между пептидным пулом квантиферона и пептидным пулом А после классификации ответов на стимуляцию антигеном от 36 эндемичных контрольных пациентов с использованием заранее определенной граничной величины для положительного теста

Пациенты с ТВ		Пептидный пул квантиферона		
		Положительный	Отрицательный	Сумма
Пептидный пул А	Положительный	11	0	11
	Отрицательный	3	22	25
	Сумма	14	22	36

Пример 7. Пептидный пул А можно дополнительно улучшать при объединении с ESAT-6

Дополнительно оценивали возможность добавления ESAT-6 к пептидному пулу А с целью дополнительного улучшения диагностических возможностей. В связи с этим исследовали пептидный пул А + ESAT-6 и пептидный пул А в когорте из 73 случаев подтвержденного ТВ в Каире, Египте, и с использованием тех же самых условий анализа, которые описаны в примере 5. Исходя из фиг. 9, очевидно, что величина ответов повышается при объединении пептидного пула А с ESAT-6, при этом пептидный пул А характеризовался медианным ответом 5,50 нг/мл IP-10 по сравнению с пептидным пулом А с ESAT-6, где медиана составляла 6,86 нг/мл IP-10. Используя граничную величину 0,75 нг/мл, сравнивали частоту респондеров в двух группах. В пептидном пуле А частота респондеров составляла 93%, при этом 68 из 73 обследованных пациентов были положительными, в то время как частота для пептидного пула А с ESAT-6 составляла 96% (70 из 73 пациентов - 96%). Таким образом, объединение пептидного пула А с ESAT-6 снижало частоту ложно-отрицательных результатов с 7 до 4%.

Ссылки

- Abdallah, A. M., N. C. Gey van Pittius, et al. (2007). Type VII secretion--mycobacteria show the way. Nature reviews. Microbiology **5**(11): 883-891.
- Aggerbeck, H., R. Giemza, et al. (2013). Randomised clinical trial investigating the specificity of a novel skin test (C-Tb) for diagnosis of *M. tuberculosis* infection. PLoS one **8**(5): e64215.
- Albrethsen, J., J. Agner, et al. (2013). Proteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems. Molecular & cellular proteomics : MCP **12**(5): 1180-1191.
- Andersen, P. (1994). Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. Infection and immunity **62**(6): 2536-2544.
- Andersen, P., M. E. Munk, et al. (2000). Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet **356**(9235): 1099-1104.
- Arnvig, K. B., I. Comas, et al. (2011). Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS pathogens **7**(11): e1002342.
- Behr, M. A., M. A. Wilson, et al. (1999). Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science **284**(5419): 1520-1523.
- Biselli, R., S. Mariotti, et al. (2010). Detection of interleukin-2 in addition to interferon- γ discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. Clinical Microbiology and Infection **16**(8): 1282-1284.
- Brock, I., K. Weldingh, et al. (2004). Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Journal of clinical microbiology **42**(6): 2379-2387.
- Chen, J. M., S. Boy-Rottger, et al. (2012). EspD is critical for the virulence-mediating ESX-1 secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of bacteriology **194**(4): 884-893.
- de Souza, G. A., M. O. Arntzen, et al. (2011). Proteogenomic analysis of polymorphisms and gene annotation divergences in prokaryotes using a clustered mass spectrometry-friendly database. Molecular & cellular proteomics : MCP **10**(1): M110 002527.
- Deenadayalan, A., D. Heaslip, et al. (2010). Immunoproteomic identification of human T cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis* that differentiate healthy contacts from tuberculosis patients. Molecular & cellular proteomics : MCP **9**(3): 538-549.
- Dewan, P. K., J. Grinsdale, et al. (2007). Low Sensitivity of a Whole-Blood Interferon- γ Release Assay for Detection of Active Tuberculosis. Clinical Infectious Diseases **44**(1): 69-73.
- Ewer, K., P. Cockle, et al. (2006). Antigen mining with iterative genome screens identifies novel diagnostics for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Clinical and vaccine immunology : CVI **13**(1): 90-97.
- Fortune, S. M., A. Jaeger, et al. (2005). Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(30): 10676-10681.

- Hall, L. J., S. Clare, et al. (2009). Characterisation of a live Salmonella vaccine stably expressing the Mycobacterium tuberculosis Ag85B-ESAT-6/ESAT-6 fusion protein. Vaccine **27**(49): 6894-6904.
- Harboe, M., A. S. Malin, et al. (1998). B-cell epitopes and quantification of the ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis. Infection and immunity **66**(2): 717-723.
- Kilgus, J., T. Jardetzky, et al. (1991). Analysis of the permissive association of a malaria T cell epitope with DR molecules. The Journal of Immunology **146**(1): 307-315.
- Liu, X. Q., D. Dosanjh, et al. (2004). Evaluation of T-cell responses to novel RD1- and RD2-encoded Mycobacterium tuberculosis gene products for specific detection of human tuberculosis infection. Infection and immunity **72**(5): 2574-2581.
- Lustig, J. V., H. L. Rieger, et al. (1976). Humoral and cellular responses to native antigen following oral and parenteral immunization with lipid-conjugated bovine serum albumin. Cellular immunology **24**(1): 164-172.
- MacGurn, J. A., S. Raghavan, et al. (2005). A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in Mycobacterium tuberculosis. Molecular microbiology **57**(6): 1653-1663.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. Journal of the American Chemical Society **85**(14): 2149-2154.
- Millington, K. A., S. M. Fortune, et al. (2011). Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for Mycobacterium tuberculosis infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(14): 5730-5735.
- Moon, H. W. and M. Hur (2013). Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an updated review. Annals of clinical and laboratory science **43**(2): 221-229.
- Mowat, A. M., A. M. Donachie, et al. (1991). Immune-stimulating complexes containing Quil A and protein antigen prime class I MHC-restricted T lymphocytes in vivo and are immunogenic by the oral route. Immunology **72**(3): 317-322.
- Mustafa, A. S., R. Al-Attayah, et al. (2008). Efficient testing of large pools of Mycobacterium tuberculosis RD1 peptides and identification of major antigens and immunodominant peptides recognized by human Th1 cells. Clinical and vaccine immunology : CVI **15**(6): 916-924.
- Nagai, S., H. G. Wiker, et al. (1991). Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. Infection and immunity **59**(1): 372-382.
- Pai, M., L. W. Riley, et al. (2004). Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. The Lancet infectious diseases **4**(12): 761-776.
- Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988). Improved tools for biological sequence comparison. Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(8): 2444-2448.
- Ravn, P., A. Demissie, et al. (1999). Human T Cell Responses to the ESAT-6 Antigen from Mycobacterium tuberculosis. Journal of Infectious Diseases **179**(3): 637-645.
- Redelman-Sidi, G. and K. A. Sepkowitz (2013). IFN-gamma release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults. American journal of respiratory and critical care medicine **188**(4): 422-431.
- Rosenkrands, I., P. B. Rasmussen, et al. (1998). Identification and characterization of a 29-kilodalton protein from Mycobacterium tuberculosis culture filtrate recognized by mouse memory effector cells. Infection and immunity **66**(6): 2728-2735.

- Ruhwald, M. and P. Ravn (2009). Biomarkers of latent TB infection. *Expert review of respiratory medicine* 3(4): 387-401.
- Schopfer, K., H. L. Rieder, et al. (2013). The sensitivity of an interferon-gamma release assay in microbiologically confirmed pediatric tuberculosis. *European journal of pediatrics*.
- Sester, U., M. Fousse, et al. (2011). Whole-Blood Flow-Cytometric Analysis of Antigen-Specific CD4 T-Cell Cytokine Profiles Distinguishes Active Tuberculosis from Non-Active States. *PLoS one* 6(3): e17813.
- Sidders, B., C. Pirson, et al. (2008). Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Infection and immunity* 76(9): 3932-3939.
- Sinigaglia, F., M. Guttinger, et al. (1988). A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. *Nature* 336(6201): 778-780.
- Skjot, R. L., T. Oettinger, et al. (2000). Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from Mycobacterium tuberculosis identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infection and immunity* 68(1): 214-220.
- Sonnenberg, P., J. R. Glynn, et al. (2005). How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *The Journal of infectious diseases* 191(2): 150-158.
- Stryhn, A., L. Ø. Pedersen, et al. (1996). Peptide binding specificity of major histocompatibility complex class I resolved into an array of apparently independent subspecificities: quantitation by peptide libraries and improved prediction of binding. *European Journal of Immunology* 26(8): 1911-1918.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.
- van Dissel, J. T., S. M. Arend, et al. (2010). Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in naive human volunteers. *Vaccine* 28(20): 3571-3581.
- van Dissel, J. T., D. Soonawala, et al. (2011). Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31(R) promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. *Vaccine* 29(11): 2100-2109.
- Xu, Y., W. Liu, et al. (2009). Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the chimeric protein of antigen 85B and ESAT-6 enhances the Th1 cell-mediated response. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 16(8): 1121-1126.
- Yang, X., L. Bao, et al. (2011). A novel recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin strain expressing human granulocyte macrophage colony-stimulating factor and Mycobacterium tuberculosis early secretory antigenic target 6 complex augments Th1 immunity. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 43(7): 511-518.
- Young, F., J. A. Critchley, et al. (2009). A review of co-morbidity between infectious and chronic disease in Sub Saharan Africa: TB and diabetes mellitus, HIV and metabolic syndrome, and the impact of globalization. *Globalization and health* 5: 9.
- Zhang, H., P. Peng, et al. (2010). Recombinant Mycobacterium smegmatis expressing an ESAT-6/ESAT-6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against Mycobacterium tuberculosis challenge in mice. *Scandinavian journal of immunology* 72(4): 349-357.
- Zweig, M. H. and G. Campbell (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical chemistry* 39(4): 561-577.
- Aagaard, C., I. Brock, et al. (2004). Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the Mycobacterium tuberculosis complex. *The Journal of infectious diseases* 189(5): 812-819.
- Aagaard, C., T. Hoang, et al. (2011). A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nature medicine* 17(2): 189-194.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Диагностическая композиция для диагностики туберкулеза, содержащая смесь практически чистых полипептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей, выбранных из:

a) Rv3874 (SEQ ID NO: 1), Rv3615 (SEQ ID NO: 2) и одного или нескольких из Rv3865 (SEQ ID NO: 3), Rv2348 (SEQ ID NO: 4), Rv3614 (SEQ ID NO: 5), Rv2654 (SEQ ID NO: 6) и Rv3877 (SEQ ID NO: 7) и

b) по меньшей мере одного фрагмента из Rv3874 (SEQ ID NO: 1), по меньшей мере одного фрагмента из Rv3615 (SEQ ID NO: 2) и по меньшей мере одного фрагмента из одного или нескольких из Rv3865 (SEQ ID NO: 3), Rv2348 (SEQ ID NO: 4), Rv3614 (SEQ ID NO: 5), Rv2654 (SEQ ID NO: 6) и Rv3877 (SEQ ID NO: 7), причем указанные фрагменты имеют длину по меньшей мере 7 аминокислотных остатков и содержат иммуногенные эпитопы из указанных аминокислотных последовательностей; и

c1) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичность последова-

тельности Rv3874 (SEQ ID NO: 1), аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичность последовательности Rv3615 (SEQ ID NO: 2), и одной или нескольких аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 80% идентичность последовательности одному или нескольким из Rv3865 (SEQ ID NO: 3), Rv2348 (SEQ ID NO: 4), Rv3614 (SEQ ID NO: 5), Rv2654 (SEQ ID NO: 6) и Rv3877 (SEQ ID NO: 7), причем указанные аминокислотные последовательности являются иммуногенными; или

с2) аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичность последовательности по меньшей мере одному фрагменту из Rv3874 (SEQ ID NO: 1), аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичность последовательности по меньшей мере одному фрагменту из Rv3615 (SEQ ID NO: 2), и аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 80% идентичность последовательности по меньшей мере одному фрагменту из одного или нескольких из Rv3865 (SEQ ID NO: 3), Rv2348 (SEQ ID NO: 4), Rv3614 (SEQ ID NO: 5), Rv2654 (SEQ ID NO: 6) и Rv3877 (SEQ ID NO: 7), причем указанные фрагменты имеют длину по меньшей мере 7 аминокислотных остатков и содержат иммуногенные эпитопы из указанных аминокислотных последовательностей.

2. Диагностическая композиция по п.1, содержащая Rv3874 (SEQ ID NO: 1), Rv3615 (SEQ ID NO: 2) и Rv3865 (SEQ ID NO: 3) или фрагменты, содержащие их иммуногенные эпитопы.

3. Диагностическая композиция по п.1, содержащая Rv3874 (SEQ ID NO: 1), Rv3615 (SEQ ID NO: 2) и Rv2348 (SEQ ID NO: 4) или фрагменты, содержащие их иммуногенные эпитопы.

4. Диагностическая композиция по п.1, содержащая Rv3874 (SEQ ID NO: 1), Rv3615 (SEQ ID NO: 2) и Rv3877 (SEQ ID NO: 7) или фрагменты, содержащие их иммуногенные эпитопы.

5. Диагностическая композиция по п.1, содержащая Rv3874 (SEQ ID NO: 1), Rv3615 (SEQ ID NO: 2), Rv3865 (SEQ ID NO: 3) и Rv2348 (SEQ ID NO: 4) или фрагменты, содержащие их иммуногенные эпитопы.

6. Диагностическая композиция по любому из пп.1-4, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO: 1, выбраны из SEQ ID NO: 9-14.

7. Диагностическая композиция по любому из пп.1-4, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO: 2, выбраны из SEQ ID NO: 15-18 или SEQ ID NO: 59-63.

8. Диагностическая композиция по любому из пп.1-7, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO: 3, выбраны из SEQ ID NO: 19-21.

9. Диагностическая композиция по любому из пп.1-7, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO: 4, выбраны из SEQ ID NO: 22-25.

10. Диагностическая композиция по любому из пп.1-7, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO: 7, выбраны из SEQ ID NO: 46-50.

11. Диагностическая композиция по любому из пп.1-9, дополнительно содержащая Rv3875 (SEQ ID NO: 51) или один или несколько его фрагментов.

12. Диагностическая композиция по п.11, где указанные фрагменты и фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO: 51, выбраны из SEQ ID NO: 52-58.

13. Диагностическая композиция по п.1, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из указанных полипептидов, присутствуют в виде перекрывающихся пептидов по меньшей мере из 10 аминокислот в длину.

14. Диагностическая композиция по п.5, где смесь содержит SEQ ID NO: 9-25.

15. Диагностическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где некоторые или все из полипептидов слиты вместе необязательно посредством линкеров или спейсеров.

16. Применение диагностических композиций по любому из предыдущих пунктов для получения фармацевтической композиции для диагностики ТБ, вызванного вирулентными микобактериями, например *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* или *Mycobacterium africanum*.

17. Набор для СМІ диагностики, содержащий диагностическую композицию по любому из пп.1-15.

18. Набор для СМІ диагностики по п.17, предназначенный для *in vitro* или *in vivo* диагностики туберкулеза.

19. Способ *in vitro* или *in vivo* диагностики туберкулеза, вызванного вирулентными микобактериями, например *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* или *Mycobacterium bovis*, у животного, в том числе человека, при помощи диагностической композиции по любому из пп.1-15.

20. Способ диагностики туберкулеза по п.19, включающий внутривенную инъекцию животному диагностической композиции, определенной выше, где положительная кожная реакция в месте инъекции указывает на то, что у животного имеется туберкулез, а отрицательная кожная реакция в месте инъекции указывает на то, что у животного отсутствует туберкулез.

21. Способ диагностики туберкулеза по п.19, включающий приведение в контакт образца, например образца крови, с диагностической композицией согласно настоящему изобретению для выявления положительной реакции, например пролиферации клеток или высвобождения цитокинов, таких как IFN- γ или IP-10.

Пациент №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34			
ESAT-6																																					
CFP-10																																					
Rv3873																																					
Rv3878																																					
Rv3615																																					
Rv3865																																					
Rv3877																																					
Rv2348																																					

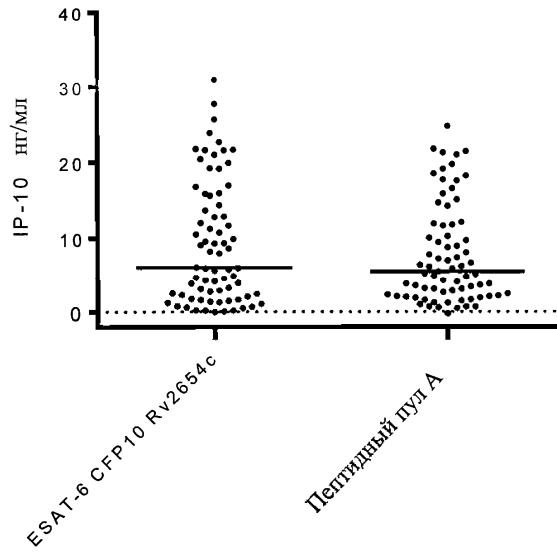
Фиг. 1

Пациент №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31						
ESAT-6																																					
CFP10																																					
Rv3873																																					
Rv3878																																					
Rv3615																																					
Rv3865																																					
Rv3877																																					
Rv2348																																					

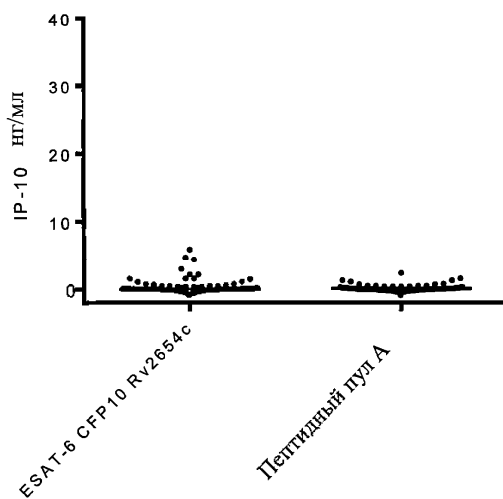
Фиг. 2

Контрольный донор	1	3	5	7	9	11	12	15	16	19	26	27	28	29	31	32	39	49	57	58	59	60	61	62	63	64	65	77	84	85							
ESAT-6																																					
CFP-10																																					
Rv3873																																					
Rv3878																																					
Rv3615																																					
Rv3865																																					
Rv3877																																					
Rv2348																																					
PPD																																					

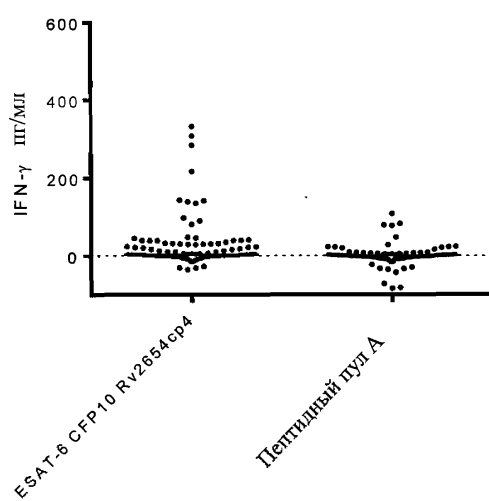
Фиг. 3



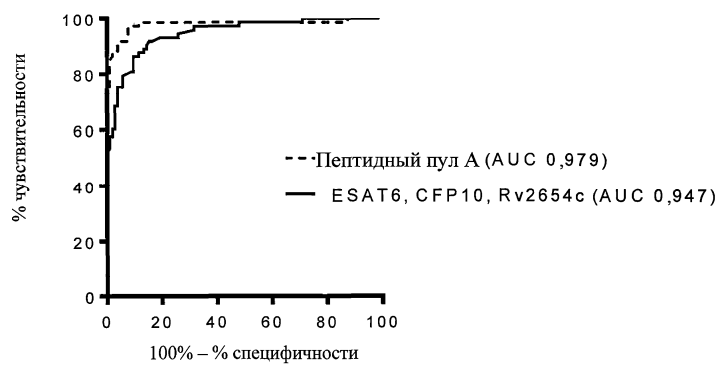
Фиг. 4



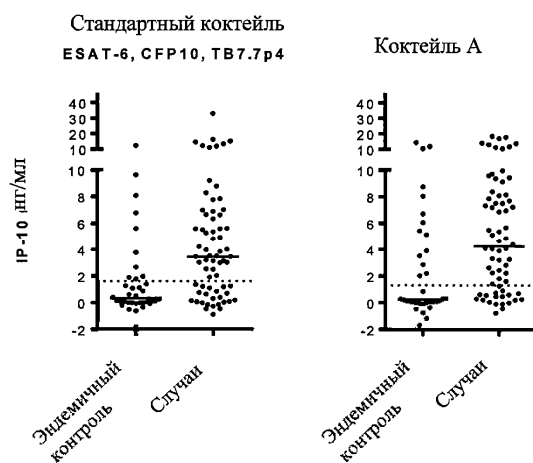
Фиг. 5



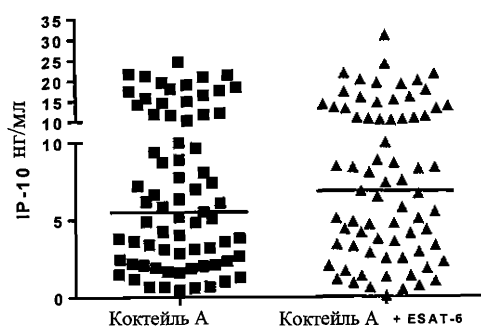
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

