

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290053 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.05.16

(51) Int. Cl. *A61K 39/04* (2006.01)  
*A61P 31/06* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.06.12

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ВАКЦИН

(31) 19180280.0

(72) Изобретатель:

(32) 2019.06.14

Мортенсен Рasmus, Огорд Клаус,  
Андерсен Петер Лаветс (DK)

(33) EP

(86) PCT/EP2020/066343

(74) Представитель:

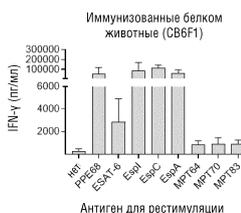
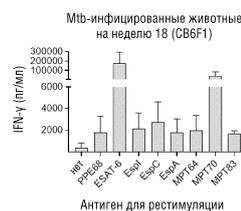
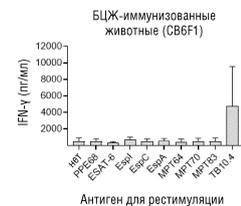
(87) WO 2020/249756 2020.12.17

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

СТАГЕНС СЕРУМ ИНСТИТУТ (DK)

(57) Изобретение относится к слитым белкам, полученным на основе антигенных полипептидов *Mycobacterium tuberculosis* для профилактики, ингибирования или лечения инфекций и/или заболеваний, вызываемых туберкулезными комплексами различных видов. В частности, настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим антигены, которые не инициируют иммунный ответ против БЦЖ и/или повторов ESAT-6. Слитые белки могут содержать комбинацию ранних и поздних антигенов. Кроме того, настоящее изобретение относится к вакцинам, иммуногенным композициям и фармацевтическим композициям, содержащим слитые белки.



A1

202290053

202290053

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572566EA/061

### СЛИТЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ВАКЦИН

#### Область техники

Настоящее изобретение относится к слитым белкам, полученным на основе антигенных полипептидов *Mycobacterium tuberculosis* для профилактики, ингибирования или лечения инфекций и/или заболеваний, вызываемых видами туберкулезного комплекса. В частности, настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим антигены, которые не инициируют иммунный ответ против БЦЖ и/или повторов ESAT-6. Слитые белки могут содержать комбинацию ранних и поздних антигенов. Кроме того, настоящее изобретение относится к вакцинам, иммуногенным композициям и фармацевтическим композициям, содержащим слитые белки.

#### Предпосылки к созданию изобретения

Туберкулез у человека, вызываемый *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), представляет собой тяжелое распространенное во всем мире заболевание, ежегодно приводящее к миллионам смертей, по данным ВОЗ. В 1960-ые и 1970-ые годы, число новых случаев туберкулеза шло на спад, но положительная тенденция была нарушена, отчасти из-за появления СПИДа и появления штаммов *M. tuberculosis*, резистентных ко многим лекарственным средствам.

Единственной вакциной, доступной в настоящее время для клинического применения, является БЦЖ (бацилла Кальметта-Герена), то есть, вакцина, эффективность которой остается предметом споров. БЦЖ представляет собой живую аттенуированную вакцину, которую повсеместно вводят детям в большинстве регионов, эндемичных по туберкулезу. БЦЖ обычно индуцирует высокий уровень приобретенной резистентности у животных с моделью туберкулеза, а у детей, она защищает от диссеминированных форм туберкулеза, таких как менингит и милиарный туберкулез. При назначении детям младшего возраста, эта вакцина защищает от туберкулеза в течение многих лет, но затем ее эффективность ослабевает. Сравнение различных испытаний в контролируемых условиях показало, что защитная эффективность БЦЖ у взрослых резко варьируется в диапазоне от неэффективной до 80% защиты. А поэтому, разработка новой улучшенной вакцины против *M. tuberculosis* является неотложной задачей, которой ВОЗ уделяет очень большое внимание.

В настоящее время проводятся клинические испытания нескольких новых противотуберкулезных вакцин. Поскольку существует общее мнение, что для защиты от туберкулезной инфекции и заболевания необходим сильный клеточный иммунный ответ, то большинство существующих в настоящее время клинических кандидатов на противотуберкулезные вакцины нацелены на индуцирование классических цитокинов TH1, таких как IFN- $\gamma$  или TNF- $\alpha$ , либо из CD4<sup>+</sup>- либо из CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, и не решают вопросов улучшения качества Т-клеток, которое играет важную роль в протективном иммунитете. Имеющиеся в настоящее время кандидаты на противотуберкулезные

вакцины включают различные вакцинные платформы, такие как инактивированные целые клетки или экстракты целых клеток; вакцины на основе вирусных векторов; живые рекомбинантные вакцины БЦЖ; или аттенуированные вакцины БЦЖ и ДНК-вакцины. Однако, ни одна из вышеперечисленных вакцинных платформ пока не дала убедительных клинических результатов.

Альтернативная стратегия создания эффективной противотуберкулезной вакцины основана на субъединичных вакцинах на основе слитых белков антигенов *M. tuberculosis*. Считается, что субъединичный подход обладает рядом преимуществ, таких как повышенная безопасность и стабильность, а также возможность усиления предшествующей БЦЖ-вакцинации. Были предприняты усилия по объединению слитых белков различных антигенов *M. tuberculosis* с подходящими адъювантами для индуцирования сильных клеточных иммунных ответов.

В WO 2010006607 A2 было продемонстрировано, что простой слитый белок, состоящий только из двух антигенов *M. tuberculosis*, может действовать как противотуберкулезная вакцина при ее введении вместе с адъювантом IC31. В WO 2006136162 A2, WO 2014063704 A2 и WO 2015161853 A1 раскрываются слитые белки против туберкулезной инфекции и туберкулезного заболевания, где различные антигены *M. tuberculosis* были смешаны для получения субъединичных вакцин, способных индуцировать сильные иммунные ответы. Однако, общим для вышеупомянутых слитых белков является то, что ни одна из соответствующих субъединичных вакцин еще не привела к получению коммерчески доступной вакцины против туберкулеза.

Следовательно, было бы желательно получить улучшенную противотуберкулезную вакцину, из которой может быть получена клинически приемлемая вакцина. В частности, особенно предпочтительным было бы получение слитых белков, способных индуцировать сильный иммунный ответ высокого качества и, следовательно, усиливать защиту.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к слитым белкам, которые концептуально отличаются от ранее разработанных слитых белков, для профилактики, ингибирования или лечения туберкулезной инфекции и/или туберкулеза. Слитые белки, описанные в настоящей заявке, основаны на антигенах, которые не иницируют иммунный ответ против БЦЖ (далее называемых «БЦЖ-антигенами») и/или «повторов ESAT-6», где в слитом белке присутствует более одной копии антигена ESAT-6. Слитые белки могут содержать комбинацию ранних и поздних антигенов. Слитые белки согласно изобретению дают улучшенные иммунные ответы по сравнению с существующими противотуберкулезными вакцинами.

Таким образом, настоящее изобретение относится к получению слитых белков, содержащих БЦЖ-антигены и/или повторы ESAT-6, которые индуцируют сильный клеточный иммунный ответ и повышают качество Т-клеток.

Другой целью настоящего изобретения является получение слитых белков, содержащих комбинацию раннего и позднего туберкулезных антигенов, которые

одновременно ускоряют иммунный ответ после Mtb-инфицирования и индуцируют T-клетки с возможным специфическим распознаванием бактерий на поздней хронической фазе инфекции.

Еще одной целью настоящего изобретения является получение слитых белков, которые могут быть эффективно использованы в вакцине или в иммуногенной композиции для профилактики, ингибирования или лечения туберкулезной инфекции и/или туберкулеза либо в виде отдельной вакцины, либо в комбинации с БЦЖ.

Таким образом, в одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере пять антигенов, происходящих от *M. tuberculosis*.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит ранние и поздние антигены.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены были deletированы, не секретируются или имеют низкую экспрессию в БЦЖ.

В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит по меньшей мере два повтора ESAT-6, например, по меньшей мере три повтора ESAT-6, например, по меньшей мере четыре повтора ESAT-6, например, как по меньшей мере пять повторов ESAT-6.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к к вакцине или иммуногенной композиции, содержащей описанный здесь слитый белок.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, или к описанной здесь вакцине или иммуногенной композиции для их применения в целях вакцинации или иммунизации индивидуума против инфекций и/или заболеваний, вызываемых вирулентными микобактериями.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к набору, включающему:

- i) Описанный здесь слитый белок или описанную здесь вакцину или иммуногенную композицию,
- ii) БЦЖ, и
- iii) необязательно, инструкции по их применению.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую описанный здесь слитый белок.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, содержащему описанную здесь нуклеотидную последовательность, функционально связанную с одной или несколькими регуляторными последовательностями, подходящими для регуляции продуцирования слитого белка в подходящем хозяине.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантной

клетке-хозяину, содержащей описанный здесь экспрессионный вектор.

### **Краткое описание чертежей**

На фигуре 1 показано иммунное распознавание выбранных антигенов, против которых Датская БЦЖ *M. bovis* не индуцирует Т-клеточный ответ (БЦЖ<sup>-</sup>-антигены). Показаны иммунные ответы после (А) иммунизации Датской БЦЖ *M. bovis*, (В) инфицирования *M. tuberculosis* Эрдмана или (С) иммунизации отдельными антигенами.

На фигуре 2 схематично показаны выбранные слитые белки, содержащие БЦЖ<sup>-</sup>-антигены.

На фигуре 3 представлен схематический обзор дополнительных выбранных слитых белков, описанных в настоящей заявке.

На фигуре 4 показано иммунное кинетическое распознавание ESAT-6 и MPT70 во время инфицирования *Mtb*. (А) Высвобождение антиген-специфического интерферона- $\gamma$  или (В) кратное увеличение частоты антиген-специфических CD4<sup>+</sup>Т-клеток было оценено в легких через 3, 12 и 20 недель после инфицирования *Mtb* Эрдмана.

На фигуре 5 показано, что вакцины, содержащие экспрессированные антигены на поздних стадиях, дают долговременную защиту. Показаны КОЕ в легких у *Mtb*-инфицированных животных, которые были иммунизованы Н104 или Н105 или которым вводили инъекцию физиологического раствора (А) через 4 недели и (В) через 18 недель после инфицирования аэрозольной *Mtb*. Н105 включает антигены MPT64, MPT70 и MPT83.

На фигуре 6 показано, что совместное введение БЦЖ и Н107/CAF01 усиливало специфический иммунный ответ на Н107 у двух моделей вакцинации. Частота Н107-специфических CD4<sup>+</sup>Т-клеток была оценена в селезенке через три недели после иммунизации Н107/CAF01 (А) у стандартной профилактической модели и (В) модели повторной вакцинации БЦЖ, где Датская БЦЖ *M. bovis* была введена за 12 месяцев до вакцинации вакциной Н107.

На фигуре 7 показано, что совместное введение БЦЖ влияет на дифференцировку CD4<sup>+</sup>Т-клеток, специфичных к слитому белку, в зависимости от того, содержит ли слитый белок БЦЖ<sup>-</sup>-антигены (Н107) или БЦЖ<sup>+</sup>-антигены (Н65). (А) Обзор, показывающий дифференцировку Т-клеток на основе экспрессии цитокинов отдельной клеткой, адаптированной как описано Seder et al (2008). (В) Профиль экспрессии цитокинов в CD4<sup>+</sup>клетках, расположенных в селезенке, оцененный по экспрессии цитокинов IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и/или IL-2 в отдельных клетках. (С) Частота специфичных к слитому белку CD4<sup>+</sup>Т-клеток, экспрессирующих KLRG1.

На фигуре 8 показано, что защита от *Mtb*-инфекции повышалась в том случае, когда слитый белок, содержащий БЦЖ<sup>-</sup>-антигены (Н107), вводили вместе с БЦЖ. Показаны КОЕ в легких через четыре (А) и восемнадцать недель (В) после инфицирования *Mtb* Эрдмана.

На фигуре 9 показано, что совместная вакцинация БЦЖ *M. bovis* и слитыми белками Н104-Н107, приготовленными в CAF01, индуцировала значительную защиту от

Mtb-инфекции. Показаны КОЕ легких через четыре недели после инфицирования Mtb Эрсмана.

На фигуре 10 показано, что добавление свободного белка ESAT-6 в состав вакцины не увеличивало иммунный ответ, инициированный вакциной, и не снижало количество микобактерий после инфицирования Mtb. Количество ESAT-6-специфических CD4-T-клеток определяли в группах вакцинации (A) через три недели после иммунизации и (B) через три недели после инфицирования Mtb. (C) Через шесть недель после заражения определяли количество микобактерий в легких.

На фигуре 11 показано, что повторы ESAT-6 в слитом белке приводили к усилению иммунных ответов против ESAT-6 и к лучшей защите у модели профилактической вакцинации. (A) Антиген-специфические ответы оценивали после иммунизации H64 (одна копия ESAT-6) и H76 (пять копий ESAT-6) в селезенке через три недели после иммунизации. (B) Количество микобактерий определяли в легких через шесть недель после инфицирования Mtb.

На фигуре 12 показано, что повторы ESAT-6 в слитой молекуле улучшали рекрутинг ESAT-6-специфических T-клеток на участок инфицирования и улучшали протективную эффективность вакцины у модели постконтактной вакцинации. Животных, инфицированных Mtb Эрсмана, лечили антибиотиками. За две недели до окончания лечения начинали иммунизацию H83/CAF01 (одной копией ESAT-6) и H84/CAF01 (четырьмя копиями ESAT-6). (A) Количество ESAT-6-специфических CD4-T-клеток в легких через две недели после иммунизации. (B) Количество микобактерий в легких через 22 и 35 недель после заражения (через 6 и 19 недель после последней иммунизации).

На фигуре 13 показано, что повторы ESAT-6 в слитом белке усиливали иммунные ответы и улучшали протективную эффективность вакцины. Показаны специфические ответы ESAT-6 в селезенке, выделенной у (A) вакцинированных мышей 129sc и (B) у мышей CB6F1. Показаны (C) ESAT-6-специфические иммунные ответы в селезенке мышей, совместно иммунизированных БЦЖ и субъединицей, и защитная эффективность в легких после четырехнедельной инфекции.

На Фигуре 14 показано, что слитый белок H107, приготовленный в адъюванте CAF01, был более эффективной вакциной, чем H56, приготовленной в CAF01. Защитную эффективность ( $\Delta \log_{10} \text{КОЕ}_{\text{физиологический раствор}} - \log_{10} \text{КОЕ}_{\text{иммунизация}}$ ) определяли в легких через 4-12 недель после инфицирования Mtb. Результаты представляют собой объединенные данные пяти независимых экспериментов.

На фигуре 15 показано, что уже через три недели после первой иммунизации (через неделю после второй H107) в группе БЦЖ+H107 наблюдался повышенный ответ на ТВ10.4 по сравнению с группой, получавшей только БЦЖ, что означает, что совместное введение H107+БЦЖ повышает БЦЖ-специфические иммунные ответы и, следовательно, H107 действует как адъювант для БЦЖ.

На фигуре 16 представлена схематическая диаграмма состава слитых белков H107 и H107e. На фигуре 16A показаны электрофорез в ПААГ-ДСН и Вестерн-блот-анализ на

экспрессию слитых белков H107 и H107e из *E. coli*. H107e имеет повышенную экспрессию белка по сравнению с H107.

На фигуре 17: иммуногенность оценивали по экспрессии цитокинов CD4-T-клетками (фигура 17А, слева), и по высвобождению IFN $\gamma$  с помощью ELISA (фигура 17А, справа) после совместной вакцинации с БЦЖ. H107 и H107e индуцировали схожие по величине иммунные ответы. На фигуре 17В показано, что H107e индуцирует иммунные ответы на такие же отдельные антигены, как и H107. На фигуре 17С показано, что после инфицирования, H107e обеспечивает защиту, аналогичную или лучшую, чем в случае БЦЖ, а совместная вакцинация БЦЖ+H107e приводит к значительному увеличению защиты по сравнению с введением одной БЦЖ или одного H107e. На фигуре 17D показано, что у мышей с БЦЖ-памятью, вакцинация H107e (БЦЖ<sup>-</sup>) дает менее дифференцированные CD4-T-клетки (лучшего качества) по сравнению с H65 (БЦЖ<sup>+</sup>), как было оценено по показателю функциональной дифференцировки, FDS, а также по числу IL-17-продуцирующих CD4-T-клеток.

Далее приводится более подробное описание настоящего изобретения.

### **Подробное описание изобретения**

#### **Определения**

Перед более подробным обсуждением настоящего изобретения сначала будут определены нижеследующие термины и условные обозначения:

#### *Антиген*

В контексте настоящего изобретения, термин «антиген» означает молекулу, такую как иммуногенный полипептид, который способен индуцировать иммунный ответ. Иммунный ответ, генерируемый антигеном, может запускаться В-клетками (иммунный ответ, опосредованный антителами) и/или Т-клетками (клеточный иммунный ответ).

Описанные здесь антигены происходят от *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis* или *Mtb*).

#### *Ранние и поздние антигены*

Течение инфекции *M. tuberculosis* проходит в основном за 3 фазы: (i) острую фазу, (ii) латентную/хроническую фазу и, возможно, (iii) фазу реактивации. Характер экспрессии генов *M. tuberculosis* меняется в процессе этих фаз.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения, термин «ранний антиген» относится к антигенам, экспрессирующимся главным образом во время острой фазы, тогда как «поздние антигены» относятся к антигенам, экспрессирующимся главным образом во время латентной/хронической фазы.

#### *Слитый белок*

В контексте настоящего изобретения, термин «слитые белки» относится к полипептидам, содержащим, в случайном порядке, два или более антигенов *M. tuberculosis* или их аналогов. Антигены могут быть слиты вместе посредством аминокислотных линкеров различной длины и с различными последовательностями или без них.

Слитые белки могут быть получены путем функционального связывания двух или более гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотные последовательности представляющих интерес антигенов. Во избежание агрегации белка при последующем продуцировании, все цистеины в слитом белке могут быть заменены любой аминокислотой, но предпочтительной заменой является серин из-за его высокого структурного сходства с цистеином.

Слитые белки или антигены могут содержать соответствующие метки для очистки (или аффинные метки), что будет обеспечивать очистку из неочищенного биологического источника (например, рекомбинантной экспрессионной системы). Метки для очистки включают, но не ограничиваются ими, His-метку, хитин-связывающий белок (СВР), белок, связывающийся с мальтозой (МВР) и глутатион-S-трансферазу (GST).

Используемый здесь термин «слитый белок» может использоваться как синоним термина «субъединичная вакцина».

### *Полипептид*

В контексте настоящего изобретения, термин «полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных природных структурных вариантов и/или их синтетических не-природных аналогов, связанных пептидными связями. В настоящей заявке, для обозначения полипептидных последовательностей используются общепринятые обозначения: левый конец полипептидной последовательности представляет собой амино-конец (N-конец); а правый конец полипептидной последовательности представляет собой карбоксильный конец (С-конец).

Полипептид может быть химически модифицирован путем гликозилирования, липидизации, введения простетических групп или добавления дополнительных аминокислот, таких как, например, метка для очистки (например, гистидиновая метка) или сигнальный пептид. Метки для очистки используют для получения в высокой степени чистых белковых препаратов. His-метка может содержать метионин в качестве первой аминокислоты, за которой следуют 6-8 гистидинов, если она присутствует на N-конце, и 6-8 гистидинов, за которыми следует стоп-кодон, если она присутствует на С-конце. При использовании N-концевой метки, старт-кодон метионина в гене, кодирующем слитый полипептид, может быть делегирован во избежание образования ложных сайтов инициации трансляции.

Каждый полипептид кодируется определенной последовательностью нуклеиновой кислоты. Следует отметить, что такие последовательности включают их аналоги и варианты, при этом, такие последовательности нуклеиновых кислот были модифицированы путем замены, инсерции, добавления или удаления одной или более нуклеиновых кислот. Замены предпочтительно представляют собой консервативные замены при использовании кодонов, которые не будут приводить к какому-либо изменению аминокислотной последовательности, но могут быть введены для усиления экспрессии белка.

Полипептиды могут быть получены рекомбинантным или синтетическим

способом, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов.

#### *M. tuberculosis*

В контексте настоящего изобретения, термин «*M. tuberculosis*» относится к патогенным видам бактерий *Mycobacterium tuberculosis* семейства *Mycobacteriaceae*, которые могут быть возбудителями туберкулезной инфекции и туберкулеза. *Mycobacterium tuberculosis* может обозначаться здесь аббревиатурой *Mtb*.

Как описано в настоящей заявке, инфицирование бактерией *M. tuberculosis* проходит в 3 фазы. В контексте настоящего изобретения, термин «инфицирование» относится к любой из этих 3 фаз, то есть, к вакцинации или иммунизации против заболевания, вызванного вирулентной микобактерией, и может включать острую фазу, латентную/хроническую фазу и фазу реактивации.

#### *Бацилла Кальметта-Герена (БЦЖ)*

В контексте настоящего изобретения, термин «бацилла Кальметта-Герена (БЦЖ)» относится к штамму живых аттенуированных туберкулезных бактерий, происходящих от *Mycobacterium bovis*. В настоящее время, БЦЖ является единственной коммерчески доступной вакциной против туберкулезной инфекции и туберкулеза.

БЦЖ была разработана путем аттенуации *Mycobacterium bovis* в Институте Пастера почти 100 лет назад, и в ходе этого процесса, вирулентный штамм потерял один важный сегмент гена, кодирующий антигены, связанные с вирулентностью, такие как ESAT-6. Эта исходная мутация обозначается как RD1. В последующие 30-40 лет, вакцина БЦЖ была распределена по различным лабораториям и производственным предприятиям по всему миру. Это привело к появлению различных субштаммов вакцины, часто называемых в честь местонахождения лаборатории, в которой они производятся (Датская БЦЖ, Пражская БЦЖ, Токийская БЦЖ и т.п.). Поскольку многие из этих штаммов первоначально размножались непрерывными культурами, то наблюдалось большое число делеций в исходном геноме с различными распределениями в различных субштаммах. Сообщалось, что среди проанализированных вакцинных штаммов БЦЖ имеется всего по меньшей мере 12 основных модификаций/делеций (RD1-11 и мутация SigK). Некоторые из этих делеций содержат иммунологически важные антигены с вакцинным потенциалом, а некоторые делеции являются иммунологически молчащими.

Первоначальная делеция RD1 является примером области, которая содержит иммунодоминантные антигены, имеющие большое значение для вакцин. В настоящей заявке раскрыты антигены, которые хорошо распознаются во время природного инфицирования; RD1, RD2 и антигены, экспрессия которых регулируется SigK. Включение антигенов из всех трех регионов обеспечило достаточно большое количество антигенов для создания эффективной полипротеиновой вакцины, а также антигенов, экспрессируемых на разных стадиях инфицирования.

В контексте настоящего изобретения, штаммы БЦЖ можно подразделить на две основные группы: ранние штаммы БЦЖ и поздние штаммы БЦЖ. Ранние и поздние штаммы БЦЖ не следует путать с ранними и поздними антигенами.

Ранние штаммы БЦЖ не имеют области RD1. К ранним штаммам БЦЖ относятся Российская БЦЖ, Японская БЦЖ, БЦЖ Моро, Шведская БЦЖ и БЦЖ Биркхога.

У поздних штаммов БЦЖ отсутствуют области RD1 и RD2, и они имеют мутацию в sigK. Поздние штаммы БЦЖ включают БЦЖ Тайса, БЦЖ Фрапье, пастеровскую БЦЖ, Датскую БЦЖ, БЦЖ Глахо, Пражскую БЦЖ, Китайскую БЦЖ, а также генетически модифицированный штамм БЦЖ VPM1002.

Поздние и ранние штаммы БЦЖ не обладают идентичными генотипами и фенотипами. Так, например, в поздних штаммах БЦЖ, некоторые антигены, кодируемые областью RD2, делетированы, а другие антигены плохо экспрессируются или вообще не секретируются. Следовательно, для этих отсутствующих, плохо экспрессируемых или несекретируемых антигенов, иммунный ответ не будет индуцироваться при вакцинации поздними штаммами БЦЖ.

#### *БЦЖ<sup>+</sup>-антиген*

В данном контексте изобретения, термин «БЦЖ<sup>+</sup>-антиген» означает антиген, который экспрессируется данным штаммом БЦЖ и инициирует иммунный ответ (оцененный по высвобождению IFN- $\gamma$  (например, с помощью ELISA) в культурах стимулированных клеток) после вакцинации данным штаммом БЦЖ. Таким образом, слитые белки, содержащие БЦЖ<sup>+</sup>-антигены, при их введении после начальной вакцинации данным штаммом БЦЖ, могут быть использованы для усиления иммунного ответа, ранее индуцированного указанным данным штаммом БЦЖ.

В настоящем изобретении, БЦЖ<sup>+</sup>-антигены могут быть определены в отношении штаммов БЦЖ, выбранных из группы, состоящей из Датской БЦЖ, БЦЖ Пастера и Пражской БЦЖ и/или любых производных этих штаммов (например, VPM1002). Таким образом, БЦЖ<sup>+</sup>-антигены включают, но не ограничиваются ими, Rv1886c (Ag85b), Rv3804c (Ag85a), Rv0288 (TB10.4), Rv0287 (EsxG), Rv3478 (PPE60), Rv0475 (HVA), Rv3890c (EsxC), Rv3891c (EsxD), Rv1284 (CanA), Rv3019c (EsxR), Rv3020c (EsxS), Rv3017c (EsxQ), Rv2031c (HspX), Rv0983 (PepD), Rv1196 (PPE18), Rv2608 (PPE42), Rv3619 (EsxV) и Rv3620 (EsxW) и их варианты.

#### *БЦЖ<sup>-</sup>-антиген*

В контексте настоящего изобретения, термин «БЦЖ<sup>-</sup>-антиген» означает антиген, который не вызывает иммунный ответ (оцениваемый по высвобождению IFN- $\gamma$ ) после вакцинации данным штаммом БЦЖ, поскольку он является либо делетированным, либо не секретируется, либо имеет низкий уровень экспрессии. Таким образом, слитые белки, содержащие БЦЖ<sup>-</sup>-антигены, при их введении после начальной вакцинации данным штаммом БЦЖ, не будут усиливать иммунный ответ, ранее индуцированный указанным данным штаммом БЦЖ. Таким образом, БЦЖ<sup>-</sup>-антигены могут быть определены как функционально негативные.

В настоящей заявке, БЦЖ<sup>-</sup>-антигены могут быть определены в отношении штаммов БЦЖ, выбранных из группы, состоящей из Датской БЦЖ, БЦЖ Пастера и Пражской БЦЖ и/или любых производных этих штаммов (например, VPM1002).

Следовательно, БЦЖ-антигены могут быть определены как функционально негативные по отношению к этим штаммам БЦЖ.

Таким образом, БЦЖ-антигены включают, но не ограничиваются ими, Rv3875 (ESAT-6), Rv3873 (PPE68), Rv3876 (espI), Rv3615c (espC), Rv3616c (espA), Rv1980c (MPT64), Rv2875 (MPT70), Rv2873 (MPT83) и их варианты.

БЦЖ-антигены могут быть использованы для запуска комплементарного иммунного ответа, то есть, иммунного ответа против антигенов *Mtb*, отличающихся от антигенов начальной вакцинации БЦЖ.

#### *Иммуногенный эпитоп*

Иммуногенный эпитоп полипептида представляет собой часть полипептида, которая вызывает иммунный ответ у животного или у человека и/или в биологическом образце, определяемом с помощью любого из описанных здесь биологических анализов. Иммуногенный эпитоп полипептида может быть Т-клеточным эпитопом или В-клеточным эпитопом. Иммуногенный эпитоп может быть связан с одной или несколькими относительно небольшими частями полипептида, либо они могут быть разбросаны по всей последовательности полипептида или могут располагаться в определенных частях полипептида. Было даже показано, что для некоторых полипептидов, эпитопы рассеяны по всему полипептиду, включая полноразмерную последовательность (Ravn, 1999).

Для идентификации релевантных Т-клеточных эпитопов, которые распознаются во время иммунного ответа, может быть применен метод «грубой силы»: поскольку Т-клеточные эпитопы являются линейными, делеционными мутантами полипептида, то если их конструировать систематически, можно выявить, какие области полипептида необходимы для иммунного распознавания, например, подвергая эти делеционные мутанты, например, анализу на IFN- $\gamma$ , описанному в настоящей заявке. В другом методе используются перекрывающиеся пептиды для обнаружения эпитопов МНС класса II, предпочтительно синтетических эпитопов, имеющих длину, например, 20 аминокислотных остатков, происходящих от полипептида. Эти пептиды могут быть протестированы в биологических анализах (например, в анализе на IFN- $\gamma$ , описанном в настоящей заявке), и некоторые из них дадут положительный ответ (и, таким образом, будут иммуногенными), что может служить доказательством присутствия Т-клеточного эпитопа в пептиде. Для обнаружения эпитопов МНС класса I можно предсказать пептиды, которые будут связываться (Stryhn, 1996), а затем, эти пептиды могут быть получены путем синтеза и протестированы в соответствующих биологических анализах, например, в описанном здесь анализе на IFN- $\gamma$ . Предпочтительно, пептиды имеют длину, например, от 8 до 11 аминокислотных остатков, происходящих от полипептида.

Хотя было показано, что минимальная длина Т-клеточного эпитопа составляет по меньшей мере 6 аминокислот, однако, обычно такие эпитопы состоят из более длинных аминокислотных фрагментов. Следовательно, предпочтительно, чтобы полипептидный фрагмент согласно 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, в важных вариантах осуществления изобретения, предпочтительно, чтобы фрагмент полипептида имел длину максимум 50 аминокислотных остатков, например, максимум 40, 35, 30, 25 и 20 аминокислотных остатков. Ожидается, что пептиды, имеющие длину от 10 до 30 аминокислотных остатков, окажутся наиболее эффективными в качестве эпитопов МНС класса II, и поэтому особенно предпочтительными длинами полипептидного фрагмента, используемого в способе согласно изобретению, являются длины, составляющие 18, например, 15, 14, 13, 12 и даже 11 аминокислотных остатков. Ожидается, что пептиды, имеющие длину от 7 до 12 аминокислотных остатков, окажутся наиболее эффективными в качестве эпитопов МНС класса I, а поэтому особенно предпочтительными длинами полипептидного фрагмента, используемого в способе согласно изобретению, являются длины, составляющие 11, например, 10, 9, 8 и даже 7 аминокислотных остатков.

Иммуногенные части (фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы) полипептидов, содержащие иммуногенный эпитоп, могут распознаваться у большей части (с высокой частотой) или у незначительной части (с низкой частотой) генетически гетерогенной популяции клеток человека. Кроме того, некоторые иммуногенные участки вызывают высокие иммунологические ответы (доминантные), тогда как другие участки вызывают более низкие, но все же значимые ответы (субдоминантные). Высокая частота >> низкая частота может быть связана с иммуногенной частью, связывающейся с широко распространенными молекулами МНС (типа HLA) или даже с несколькими молекулами МНС (Sinigaglia, 1988; Kilgus, 1991). Фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы, происходящие от указанных полипептидов, могут присутствовать в виде перекрывающихся пептидов длиной по меньшей мере 10 аминокислот, охватывая, таким образом, несколько эпитопов.

#### *Варианты*

В контексте настоящего изобретения, термин «вариант» относится к описанным здесь антигенам, полипептидам или слитым белкам, которые являются «по существу гомологичными» и/или сохраняют по меньшей мере значительную степень иммуногенности исходных антигенов, полипептидов или слитых белков.

В контексте настоящего изобретения, термин «по существу гомологичный» относится к аминокислотной последовательности антигена, полипептида или слитого белка, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична последовательности исходного антигена, полипептида или слитого белка. В контексте настоящего изобретения, термин «значительная степень иммуногенности» относится к антигену, полипептиду или слитому белку, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере

мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% сохраняют иммуногенность исходного антигена, полипептида или слитого белка.

Таким образом, описанные здесь варианты антигенов, полипептидов или слитых белков могут иметь такую же иммуногенность или по меньшей мере такую же иммуногенность, как и исходный антиген, полипептид или слитый белок. Аналогично, антигены, полипептиды или слитые белки, последовательность которых в определенной степени идентична последовательности антигена, полипептида или слитого белка, описанных в настоящей заявке, могут иметь такую же иммуногенность или по меньшей мере такую же иммуногенность, как и исходный антиген, полипептид или слитый белок.

#### *Повторы антигена*

В контексте настоящего изобретения, термин «антигенный повтор» относится к антигенам, в которых более чем одна копия антигена присутствует в слитом белке. Отдельные антигенные копии антигенного повтора могут быть расположены (i) последовательно, (ii) попеременно с антигенами, отличающимися от антигенного повтора, или (iii) разделены антигенами, отличающимися от антигенного повтора, в слитом белке. Повторы антигена могут содержать по меньшей мере два повтора антигена, например, по меньшей мере три повтора антигена, например, по меньшей мере четыре повтора антигена, например, по меньшей мере пять повторов антигена. Таким образом, слитый белок, содержащий, например, по меньшей мере три антигенных повтора, содержит по меньшей мере три копии указанного антигена.

В данном случае, предпочтительными являются слитые белки, содержащие антигенные повторы ESAT-6, то есть, повторы ESAT-6.

#### *Линкерная молекула*

В контексте настоящего изобретения, термин «линкерная молекула» или «линкер» относится к пептидным последовательностям, которые расположены между антигенами в слитом белке. Линкеры часто состоят из гибких остатков, таких как глицин и серин, а поэтому, соседние домены слитого белка могут свободно перемещаться относительно друг друга и независимо образовывать правильную укладку во время секреции/продуцирования. При необходимости, могут быть использованы более длинные линкеры для гарантии того, что два соседних домена слитого белка не будут стерически влиять друг на друга.

Следует отметить, что линкеры на генетическом уровне состоят из нуклеиновых кислот. Таким образом, нуклеиновые кислоты, кодирующие слитые белки, как описано в настоящей заявке, могут содержать линкеры, представленные последовательностями нуклеиновых кислот.

#### *Совместная вакцинация*

В контексте настоящего изобретения, термин «совместная вакцинация» означает либо одновременное введение двух различных вакцин и/или иммуногенных композиций, например, одновременное введение субъединичной вакцины (или слитого белка), как

описано в настоящей заявке, и вакцины БЦЖ, либо БЦЖ-вакцинацию с последующей субъединичной вакцинацией в течение периода времени, за которое, как можно ожидать, БЦЖ будет сохраняться в организме хозяина.

Термины «совместная вакцинация», «совместная иммунизация» и «совместное введение» используются здесь как синонимы.

#### *Вакцина и иммуногенная композиция*

В контексте настоящего изобретения, термины «вакцина» и «иммуногенная композиция» означают композицию, содержащую по меньшей мере один антиген, способный обеспечивать активный приобретенный иммунитет к туберкулезной инфекции или к туберкулезу. «Вакцина» или «иммуногенная композиция» может предпочтительно содержать описанный здесь слитый белок, способный обеспечивать активный приобретенный иммунитет к туберкулезной инфекции или туберкулезу. Таким образом, вакцина или иммуногенная композиция, как описано в настоящей заявке, способна снижать бактериальную нагрузку в органах-мишенях, продлевать продолжительность жизни и/или уменьшать потерю массы животного после заражения вирулентной микобактерией по сравнению с невакцинированными животными.

Вакцина или иммуногенная композиция может содержать иммунологически и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Подходящими носителями являются, но не ограничиваются ими, полимеры, с которыми полипептид связан гидрофобной нековалентной связью, такие как пластик, например полистирол, или полимеры, с которыми полипептид связан ковалентной связью, такие как полисахарид, или полипептиды, например, альбумин бычьей сыворотки, овальбумин или гемоцианин лимфы улитки. Подходящие носители включают, но не ограничиваются ими, разбавители и суспендирующие агенты.

Кроме того, вакцина или иммуногенная композиция предпочтительно содержит один или несколько адъювантов.

#### *Адъюванты*

В контексте настоящего изобретения, термин «адъювант» означает соединение или смесь, которые усиливают иммунный ответ на антиген. Адъювант может служить в качестве тканевого депо, которое медленно высвобождает антиген, и активатора лимфоидной системы, который неспецифически усиливает иммунный ответ. Во многих случаях, первичная вакцинация одним антигеном в отсутствие адъюванта не вызывает гуморального или клеточного иммунного ответа.

Адъюванты включают, но не ограничиваются ими, составы с нейтральным адъювантом, составы с анионным адъювантом, составы с катионным адъювантом (например, «CAF01», «CAF04», «CAF09» и «CAF10»), катионные липосомы (например, бромид диметилдиоктадециламмония (DDA)), Quil A, QS21, поли-І:С, гидроксид алюминия, неполный адъювант Фрейнда, ІFN- $\gamma$ , ІL-2, ІL-12, монофосфориллипид А (MPL), димиколят трегалозы (TDM), дибегенат трегалозы (TDB), мурамилдипептид (MDP), мономиколилглицерин (MMG), CpG и «ІС31» или их комбинации.

### *Экспрессионный вектор*

В контексте настоящего изобретения, термин «экспрессионный вектор» означает молекулу ДНК, используемую в качестве носителя для переноса рекомбинантного генетического материала в клетку-хозяина. Существует четыре основных типа экспрессионных векторов, а именно, плазмиды, бактериофаги и другие вирусы, космиды и искусственные хромосомы. Сам экспрессионный вектор обычно представляет собой последовательность ДНК, состоящую из вставки (гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, трансгена) и более крупной последовательности, которая служит «основой» экспрессионного векторы. Экспрессионный вектор, который передает генетическую информацию хозяину, обычно используют в целях выделения, репликации или экспрессии вставки в клетке-мишени. Экспрессионные векторы специально адаптированы для экспрессии гетерологичных последовательностей в клетке-мишени и обычно имеют промоторную последовательность, которая регулирует экспрессию гетерологичных последовательностей.

### *Функционально связанный*

В контексте настоящего изобретения, термин «функционально связанный» относится к соединению элементов, являющихся частью функциональной единицы, такой как ген или открытая рамка считывания. Соответственно, при функциональном связывании промотора с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, два элемента становятся частью функциональной единицы, то есть, гена. Связывание последовательности регуляции экспрессии (промотора) с последовательностью нуклеиновой кислоты обеспечивает транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты, регулируемую промотором. При функциональном связывании двух последовательностей гетерологичных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, эти последовательности становятся частью функциональной единицы, то есть, открытой рамки считывания, кодирующей слитый белок, содержащий аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями гетерологичных нуклеиновых кислот. При функциональном связывании двух аминокислотных последовательностей, эти последовательности становятся частью одной и той же функциональной единицы, то есть, полипептида. Функциональное связывание двух гетерологичных аминокислотных последовательностей дает гибридный (слитый) полипептид.

### *Млекопитающее*

В контексте настоящего изобретения, термин «млекопитающее» относится к любому животному, принадлежащему к классу млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, грызунов, приматов, копытных и плотоядных. К копытным относятся, но не ограничиваются ими, крупный рогатый скот, лошади, свиньи, овцы, козы и верблюды.

В контексте настоящего изобретения, млекопитающим предпочтительно является человек или домашнее животное.

*Идентичность последовательностей*

В контексте настоящего изобретения, термин «идентичность последовательностей» относится к идентичности последовательностей между генами или белками на уровне нуклеотидов, оснований или аминокислот, соответственно. В частности, последовательности ДНК и РНК считаются идентичными, если транскрипт последовательности ДНК может быть транскрибирован в идентичную последовательность РНК.

Таким образом, в данном контексте настоящего изобретения, «идентичность последовательностей» является мерой идентичности между белками на уровне аминокислот и мерой идентичности между нуклеиновыми кислотами на уровне нуклеотидов. Идентичность белковых последовательностей можно определить путем сравнения аминокислотной последовательности в данном положении в каждой последовательности при выравнивании этих последовательностей. Аналогичным образом, идентичность последовательностей нуклеиновой кислоты может быть определена путем сравнения нуклеотидной последовательности в данном положении в каждой последовательности при выравнивании этих последовательностей.

Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот, эти последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в первую аминокислотную последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, как и соответствующее положение во второй последовательности, то такие молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для этих последовательностей (то есть,  $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{число идентичных положений}}{\text{общее число положений}} \times 100$ ). В одном варианте осуществления изобретения, две последовательности имеют одинаковую длину.

В другом варианте осуществления изобретения, две последовательности имеют различные длины, а пробелы рассматриваются как различные положения. При этом, последовательности можно выравнивать вручную и подсчитывать число идентичных аминокислот. Альтернативно, выравнивание двух последовательностей для определения процента идентичности может быть осуществлено с использованием математического алгоритма. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (Altschul et al. 1990). Поиск нуклеотидов с помощью BLAST можно проводить с использованием программы NBLAST, оценка=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Поиск белков с помощью BLAST может быть проведен с помощью

программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных белковой молекуле согласно изобретению.

В целях выравнивания с пробелами для сравнения можно использовать программу BLAST с пробелами. Альтернативно, для проведения повторного поиска может быть использована программа PSI-Blast, которая позволяет детектировать отдаленные взаимосвязи между молекулами. При использовании программ NBLAST, XBLAST и BLAST с пробелами могут быть выбраны параметры по умолчанию для соответствующих программ. См. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Альтернативно, идентичность последовательностей может быть вычислена после выравнивания последовательностей, например, с помощью программы BLAST в базе данных EMBL ([www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)). Обычно, для выравнивания могут быть использованы параметры по умолчанию, такие, как например, «оценочная матрица» и «штраф за пробел». В контексте настоящего изобретения, могут оказаться предпочтительными программы BLASTN и PSI-BLAST с параметрами по умолчанию.

Процентная идентичность между двумя последовательностями может быть определена с применением способов, аналогичных описанным выше, с пробелами или без них. При вычислении процентной идентичности учитываются только точные совпадения. Таким образом, вариант осуществления настоящего изобретения относится к последовательностям согласно изобретению, которые имеют некоторую степень вариабельности последовательностей.

#### Слитые белки для противотуберкулезных вакцин

По оценкам специалистов, около четверти населения земного шара инфицировано туберкулезом, и ежегодно от этого заболевания умирает более миллиона человек. Это делает туберкулез самым смертельным инфекционным заболеванием в мире. Несмотря на это, не было разработано какой-либо эффективной вакцины для замены и усовершенствования спорной и ненадежной вакцины БЦЖ, разработанной сто лет назад. Стратегии, основанные на различных платформах, таких как инактивированные целые клетки или экстракты целых клеток, вакцины на основе вирусных векторов, «живая» рекомбинантная БЦЖ, аттенуированные вакцины БЦЖ или ДНК-вакцины, по существу, не дали обнадеживающих результатов с перспективой получения улучшенной противотуберкулезной вакцины.

Альтернативным подходом является разработка слитых белков, включающих набор антигенов для получения противотуберкулезной субъединичной вакцины. Считается, что противотуберкулезная вакцина этого типа обладает рядом преимуществ по сравнению с другими стратегиями вакцинации, включая ее повышенную безопасность и стабильность. Путем тщательной разработки слитых белков могут быть индуцированы сильные высококачественные Т-клеточные иммунные ответы. Таким образом, настоящее изобретение относится к слитым белкам, которые могут быть эффективно использованы в вакцине или в иммуногенной композиции для профилактики, ингибирования или лечения туберкулезной инфекции и/или туберкулеза.

Таким образом, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере два антигена, происходящих от *M. tuberculosis*.

Геном *Mycobacterium tuberculosis* содержит приблизительно 4000 генов, многие из которых кодируют белки, не подходящие в качестве антигенов в субъединичной вакцине против туберкулезной инфекции или туберкулеза, поскольку они не вызывают иммунный ответ достаточной силы или качества. Таким образом, антигены слитых белков, описанные в настоящей заявке, тщательно отобраны по их иммуногенности и включают, но не ограничиваются ими, Rv3875 (ESAT-6), Rv3873 (PPE68), Rv3876 (espI), Rv3615c (espC), Rv3616c (espA), Rv1980c (MPT64), Rv2875 (MPT70), Rv2873 (MPT83), Rv1886c (Ag85b), Rv3804c (Ag85a), Rv0288 (TB10.4), Rv0287 (EsxG), Rv3478 (PPE60), Rv0475 (HBHA), Rv3890c (EsxC), Rv3891c (EsxD), Rv1284 (CanA), Rv3019c (EsxR), Rv3020c (EsxS), Rv3017c (EsxQ), Rv2031c (HspX), Rv0983 (PepD), Rv1196 (PPE18), Rv2608 (PPE42), Rv3619 (EsxV), Rv3620 (EsxW), Rv2660c, Rv3614 (EspD), Rv3865 (EspF), Rv3849 (EspR), Rv3872 (PE35) и Rv3881 (EspB).

Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70), SEQ ID NO:8 (MPT83), SEQ ID NO:10 (Ag85b), SEQ ID NO:11 (Ag85a), SEQ ID NO:12 (TB10.4), SEQ ID NO:13 (EsxG), SEQ ID NO:14 (PPE60), SEQ ID NO:15 (HBHA), SEQ ID NO:16 (EsxC), SEQ ID NO:17 (EsxD), SEQ ID NO:18 (CanA), SEQ ID NO:19 (EsxR), SEQ ID NO:20 (EsxS), SEQ ID NO:21 (EsxQ), SEQ ID NO:22 (HspX), SEQ ID NO:23 (PepD), SEQ ID NO:24 (PPE18), SEQ ID NO:25 (PPE42), SEQ ID NO:26 (EsxV), SEQ ID NO:27 (EsxW), SEQ ID NO:28 (Rv2660c), SEQ ID NO:29 (Rv3614), SEQ ID NO:30 (Rv3865), SEQ ID NO:31 (Rv3849), SEQ ID NO:32 (Rv3872) и SEQ ID NO:33 (Rv3881) и их вариантов.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит по меньшей мере три антигена, например, по меньшей мере четыре антигена, например, по меньшей мере пять антигенов, например, по меньшей мере шесть антигенов, например, по меньшей мере семь антигенов, например, по меньшей мере восемь антигенов.

Течение инфекции *M. tuberculosis* проходит в основном за 3 фазы. Во время острой фазы, бактерии размножаются в органах до тех пор, пока не усилится иммунный ответ. Специфически сенсibilизированные CD4-Т-лимфоциты опосредуют регуляцию инфекции, и наиболее важной молекулой-медиатором, по-видимому, является гамма-интерферон (IFN-гамма). Бактериальная нагрузка начинает снижаться, и устанавливается латентная/хроническая фаза, при которой бактериальная нагрузка остается стабильной на низком уровне. В этой фазе, *M. tuberculosis* переходит от активного размножения к состоянию покоя и, по существу, становится нереплицирующейся и остается внутри гранулемы. В некоторых случаях, инфекция переходит в фазу реактивации, если спящие

бактерии снова начинают размножаться.

Переход *M. tuberculosis* от первичной инфекции к латентной сопровождается изменением экспрессии генов. Вероятно также, что происходят изменения антигенной специфичности иммунного ответа, поскольку эта бактерия модулирует экспрессию генов при переходе от активной репликации к состоянию покоя. Вся природа иммунного ответа, контролирующего латентную/хроническую инфекцию, и факторы, приводящие к реактивации, пока еще полностью не изучена. Тем не менее, существуют некоторые доказательства сдвига в роли, которую играют ответственные за это доминирующие типов клеток. Хотя CD4-T-клетки необходимы и достаточны для устранения инфекции на острой фазе, однако, исследования показали, что ответы CD8-T-клеток играют более важную роль в латентной/хронической фазе.

В настоящее время проходят клинические испытания несколько новых противотуберкулезных вакцин. Однако, это в первую очередь относится к классическим профилактическим вакцинам, основанным на ограниченном числе антигенов, экспрессирующихся на ранней стадии инфицирования. Однако, как прямое следствие динамики экспрессии, описанной выше, структура эпитопа, презентированного T-клеткам, радикально меняется с течением времени. Таким образом, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь предполагают, что слитый белок, содержащий оба антигена, которые в высокой степени экспрессируются на ранней и поздней стадии инфицирования, соответственно, может быть использован для приготовления эффективной вакцины, которая может (i) ускорять иммунный ответ после *Mtb*-инфицирования и (ii) индуцировать T-клетки с потенциалом специфического распознавания бактерий на поздней хронической фазе. Преимущества такой конструкции слитого белка распространяются также на улучшенное покрытие эпитопов и способность воздействовать как на острые, так и на латентные/хронические инфекции.

Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит как ранние, так и поздние антигены.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где ранние антигены выбраны из группы, состоящей из Rv3875 (ESAT-6), Rv3873 (PPE68), Rv3876 (espI), Rv3615c (espC), Rv3616c (espA), Rv1886c (Ag85b), Rv3804c (Ag85a), Rv0288 (TB10.4), Rv0287 (EsxG), Rv3478 (PPE60), Rv0475 (HbHA), Rv3890c (EsxC), Rv3891c (EsxD), Rv1284 (CanA), Rv3019c (EsxR), Rv3020c (EsxS), Rv3017c (EsxQ), Rv0983 (PepD), Rv1196 (PPE18), Rv2608 (PPE42), Rv3619 (EsxV), Rv3620 (EsxW), Rv3614 (EspD), Rv3865 (EspF), Rv3849 (EspR), Rv3872 (PE35) и Rv3881 (EspB) и их вариантов.

Еще в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где поздние антигены выбраны из группы, состоящей из Rv2875 (MPT70), Rv2873 (MPT83), Rv2031c (HspX) и Rv2660c и их вариантов.

Большинство населения в странах с высоким уровнем заболеваемости

туберкулезом привито БЦЖ, то есть, штаммом живых аттенуированных туберкулезных бактерий, полученных из *Mycobacterium bovis*. Распространенной стратегией усиления защиты от туберкулеза является усиление иммунного ответа, вызываемого реакцией на первоначальную вакцинацию БЦЖ. Это может быть достигнуто путем введения туберкулезных антигенов, которые экспрессируются БЦЖ и уже вызывали иммунный ответ после первоначальной вакцинации БЦЖ. Такие антигены обозначаются здесь как БЦЖ<sup>+</sup>-антигены и могут быть введены как часть субъединичной вакцины в целях усиления иммунного ответа, индуцированного первоначальной вакцинацией БЦЖ. Однако, микобактериальные инфекции, включая вакцинацию БЦЖ и *Mtb*-инфицирование, индуцируют Т-клетки плохого качества, и оказалось, что их чрезвычайно трудно перепрограммировать после бустерной иммунизации субъединичными вакцинами, что в результате приводит к неожиданно низкой эффективности.

В настоящей заявке раскрыты варианты слитых белков, которые концептуально отличаются от описанных выше бустер-вакцин БЦЖ<sup>+</sup>. Неожиданно было обнаружено, что туберкулезные антигены, функционально негативные в отношении БЦЖ, то есть, антигены, которые не вызывают иммунный ответ после вакцинации БЦЖ, могут быть использованы в слитом белке для обеспечения значительно усиленной защиты от *M. tuberculosis*. В настоящей заявке, такие антигены называются БЦЖ<sup>-</sup>-антигенами и могут быть использованы в слитом белке как часть отдельной вакцины или в комбинации с БЦЖ для инициации комплементарного иммунного ответа против антигенов БЦЖ, отличающихся от антигенов первичной вакцинации БЦЖ.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что по меньшей мере часть усиленной защиты обусловлена качеством иммунного ответа, индуцированного описанными здесь слитыми белками. Вакцинация БЦЖ в основном представляет собой инфицирование микобактерией, которая посредством хронической антигенной стимуляции индуцирует короткоживущие Т-клетки, которые лишь в незначительной степени способны проникать в легочную ткань и бороться с инфекцией. Этот футпринтинг или иммунологическое наследие, оставленное первичным иммунным ответом на вакцинацию БЦЖ, впоследствии очень трудно изменить. Описанные здесь слитые белки представляют собой варианты, основанные на БЦЖ<sup>-</sup>-антигенах, которые не ограничены этим иммунологическим наследием и, следовательно, могут обойти барьер качества Т-клеток, который обычно ограничивает традиционные субъединичные вакцины на основе БЦЖ<sup>+</sup>-антигенов.

Таким образом, варианты описанных здесь слитых белков основаны на антигенах, которые не иницируют иммунный ответ против БЦЖ, то есть, БЦЖ<sup>-</sup>-антигенах. Слитые белки согласно изобретению дают улучшенные иммунные ответы по сравнению с существующими противотуберкулезными вакцинами.

Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где по меньшей мере один антиген не иницирует иммунный ответ против БЦЖ. В другом соевм варианте, настоящее изобретение

относится к к описанному здесь слитому белку, где по меньшей мере один антиген является функционально негативным в отношении БЦЖ. В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где по меньшей мере один антиген представляет собой БЦЖ<sup>-</sup>-антиген.

Следует отметить, что существует множество различных штаммов БЦЖ, причем, генотип и фенотип у различных штаммов различаются. Таким образом, для того, чтобы определить, является ли антиген БЦЖ<sup>+</sup>-антигеном или БЦЖ<sup>-</sup>-антигеном, в настоящей заявке делается ссылка на поздние штаммы БЦЖ, предпочтительно на Датскую БЦЖ, БЦЖ Пастера, Пражскую БЦЖ или VPM1002. Следовательно, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где БЦЖ выбрана из позднего штамма БЦЖ, предпочтительно Датской БЦЖ, БЦЖ Пастера или Пражской БЦЖ. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где по меньшей мере один антиген не инициирует иммунный ответ против позднего штамма БЦЖ. Еще в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где по меньшей мере один антиген не инициирует иммунный ответ против штамма БЦЖ, выбранного из группы, состоящей из Датской БЦЖ, БЦЖ Пастера или Пражской БЦЖ.

Поздние штаммы БЦЖ также могут характеризоваться (i) отсутствием некоторых антигенов, кодируемых делетированной областью RD2, и (ii) низким уровнем экспрессии или отсутствием секреции других антигенов. Следовательно, для этих отсутствующих, плохо экспрессируемых или несекретируемых антигенов, иммунный ответ не будет индуцироваться при вакцинации поздними штаммами БЦЖ. Таким образом, в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены делетированы, не секретируются или имеют низкую экспрессию в БЦЖ. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены делетированы, не секретируются или имеют низкую экспрессию в позднем штамме БЦЖ, а предпочтительно в позднем штамме БЦЖ, выбранном из группы, состоящей из Датской БЦЖ, БЦЖ Пастера или Пражской БЦЖ.

Еще в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены выбраны из группы, состоящей из антигенов, расположенных в RD1, антигенов, расположенных в RD2, и антигенов, экспрессия которых регулируется SigK, и их комбинаций.

Хотя геном *Mycobacterium tuberculosis* содержит приблизительно 4000 генов, однако, существует большое перекрытие приблизительно на 98% с геномом БЦЖ. Следовательно, количество потенциальных БЦЖ<sup>-</sup>-антигенов ограничено приблизительно 100 антигенами, против которых БЦЖ не инициирует Т-клеточный ответ. В настоящей заявке идентифицированы БЦЖ<sup>-</sup>-антигены, которые являются подходящими для их включения в слитый белок для использования в вакцине против туберкулезной инфекции и/или туберкулеза. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены выбраны из группы,

состоящей из Rv3875 (ESAT-6), Rv3873 (PPE68), Rv3876 (espI), Rv3615c (espC), Rv3616c (espA), Rv1980c (MPT64), Rv2875 (MPT70) и Rv2873 (MPT83) и их вариантов. Следует отметить, что описанные здесь варианты антигенов, полипептидов или слитых белков могут иметь такую же иммуногенность, то есть, они в равной степени могут быть эффективны в индуцировании иммунного ответа, или по меньшей мере могут иметь такую же иммуногенность, как и исходный антиген, полипептид или слитый белок. В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены выбраны из:

а) аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) и их вариантов или иммуногенных эпитопов, или

б) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (а).

Было обнаружено, что некоторые фрагменты антигенов являются предпочтительными. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

а) SEQ ID NO:34 (H107b), SEQ ID NO:35 (H107c) или SEQ ID NO:91 (H107e) или их вариантов или иммуногенных эпитопов, или

б) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (а).

В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит:

а) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC) и SEQ ID NO:5 (espA) или их варианты или иммуногенные эпитопы, или

б) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (а).

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

a) SEQ ID NO:36 (H106) или SEQ ID NO:38 (H104) или их вариантов или иммуногенных эпитопов, или

b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a).

В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит:

a) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) или их варианты или иммуногенные эпитопы, или

b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a).

В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

a) SEQ ID NO:37 (H105) или ее вариантов или иммуногенных эпитопов, или

b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a).

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где аминокислотные последовательности b) по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например по меньшей мер на 98%, например по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей a). Следует отметить, что антигены, полипептиды или слитые белки с определенной последовательностью, идентичной описанному здесь антигену, полипептиду или слитому белку, могут иметь одинаковую иммуногенность, то есть, они в равной степени могут быть эффективны в индуцировании иммунного ответа, или могут обладать по меньшей мере такой же иммуногенностью как и исходный антиген, полипептид или слитый белок.

Как описано в настоящей заявке, предполагается, что вакцинация как ранними, так и поздними антигенами приводит к усилению иммунного ответа. При этом были идентифицированы как ранние, так и поздние антигены из ограниченного числа БЦЖ-антигенов. Таким образом, в своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение

относится к описанному здесь слитому белку где слитый белок содержит как ранние, так и поздние антигены, которые не вызывают иммунный ответ против БЦЖ (то есть, БЦЖ<sup>-</sup>антигены). В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где поздний антиген, который не инициирует иммунный ответ против БЦЖ, представляет собой Rv2875 (MPT70) и/или Rv2873 (MPT83) и их варианты. В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где ранний антиген, который не инициирует иммунный ответ против БЦЖ, выбран из группы, состоящей из Rv3875 (ESAT-6), Rv3873 (PPE68), Rv3876 (espI), Rv3615c (espC) и Rv3616c (espA) и их вариантов.

Некоторые варианты слитых белков, описанных в настоящей заявке, ограничены тем, что содержат исключительно БЦЖ<sup>-</sup>антигены. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит только антигены, которые не инициируют иммунный ответ против БЦЖ (то есть, БЦЖ<sup>-</sup>антигены).

Описанные здесь слитые белки могут быть улучшены путем изменения содержания ранней секреторной антигенной мишени 6 кДа (ESAT-6). ESAT-6 является важным секреторным белком и мощным Т-клеточным антигеном *Mycobacterium tuberculosis*. Белок ESAT-6, который конститутивно экспрессируется и секретируется в большом количестве бактерией, распознается как у людей, так и у животных после инфицирования. Таким образом, признано, что ESAT-6 является важным антигеном, который может быть преимущественно включен в субъединичные вакцины против туберкулезной инфекции и туберкулеза. Однако, поскольку нативная молекула ESAT-6 представляет собой небольшой белок, состоящий всего из 95 аминокислот, то величина иммунного ответа, продуцируемого против ESAT-6 у людей и животных, является относительно низкой.

В настоящей заявке раскрываются варианты слитых белков, которые содержат несколько копий ESAT-6, а поэтому, ESAT-6 представляет собой относительно большую часть слитого белка. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что увеличение относительного содержания антигена ESAT-6 в слитых белках снижает воздействие нативного ESAT-6, имеющего низкую иммуногенность. Для слитых белков, содержащих более одной копии ESAT-6, каждое появление антигена называется повтором ESAT-6, например, считается, что слитый белок, содержащий четыре копии антигена ESAT-6, содержит четыре повтора ESAT-6. Таким образом, в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит по меньшей мере два повтора ESAT-6, например, по меньшей мере три повтора ESAT-6, например, по меньшей мере четыре повтора ESAT-6, например, по меньшей мере, пять повторов ESAT-6. В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит по меньшей мере четыре повтора ESAT-6. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит четыре повтора ESAT-6. В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному

здесь слитому белку, где каждый повтор ESAT-6 представлен SEQ ID NO:1 или аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например по меньшей мере на 98%, например по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO:1.

Повторы ESAT-6 в принципе могут быть распределены в слитых белках в любом порядке, например, на С-конце, N-конце, последовательно, с чередованием или отдельно. В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где повторы ESAT-6 разделены по меньшей мере одним антигеном, отличающимся от ESAT-6. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где повторы ESAT-6 расположены попеременно с антигенами, отличающимися от ESAT-6.

Антигены, подходящие для использования в слитых белках с повторами ESAT-6, предпочтительно являются в высокой степени иммуногенными и распознаются как у людей, так и у животных после инфицирования туберкулезом. Таким образом, антигены, подходящие для использования в слитом белке вместе с повторами ESAT-6, включают, но не ограничиваются ими, Rv3873 (PPE68), Rv3876 (espI), Rv3615c (espC), Rv3616c (espA), Rv1980c (MPT64), Rv2875 (MPT70), Rv2873 (MPT83), Rv1886c (Ag85b), Rv3804c (Ag85a), Rv0288 (TB10.4), Rv0287 (EsxG), Rv3478 (PPE60), Rv0475 (HbHA), Rv3890c (EsxC), Rv3891c (EsxD), Rv1284 (CanA), Rv3019c (EsxR), Rv3020c (EsxS), Rv3017c (EsxQ), Rv2031c (HspX), Rv0983 (PepD), Rv1196 (PPE18), Rv2608 (PPE42), Rv3619 (EsxV), Rv3620 (EsxW), Rv2660c, Rv3614 (EspD), Rv3865 (EspF), Rv3849 (EspR), Rv3872 (PE35) и Rv3881 (EspB).

Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70), SEQ ID NO:8 (MPT83), SEQ ID NO:10 (Ag85b), SEQ ID NO:11 (Ag85a), SEQ ID NO:12 (TB10.4), SEQ ID NO:13 (EsxG), SEQ ID NO:14 (PPE60), SEQ ID NO:15 (HbHA), SEQ ID NO: 16 (EsxC), SEQ ID NO:17 (EsxD), SEQ ID NO:18 (CanA), SEQ ID NO:19 (EsxR), SEQ ID NO:20 (EsxS), SEQ ID NO:21 (EsxQ), SEQ ID NO:22 (HspX), SEQ ID NO:23 (PepD), SEQ ID NO:24 (PPE18), SEQ ID NO:25 (PPE42), SEQ ID NO:26 (EsxV), SEQ ID NO:27 (EsxW), SEQ ID NO:28 (Rv2660c), SEQ ID NO:29 (Rv3614), SEQ ID NO:30 (Rv3865), SEQ ID NO:31 (Rv3849), SEQ ID NO:32 (Rv3872) и SEQ ID NO:33 (Rv3881) и его вариантов, и где слитый белок содержит по меньшей мере два повтора ESAT-6, например, по меньшей мере три повтора ESAT-6, например, по меньшей мере четыре повтора ESAT-6, например, по меньшей мере пять повторов ESAT-6.

Описанные здесь слитые белки также включают слитые белки, содержащие как ранние, так и поздние антигены или БЦЖ-антигены в комбинации с повторами ESAT-6. Следовательно, в своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к

описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит как ранние, так и поздние антигены и по меньшей мере два повтора ESAT-6, например, по меньшей мере три повтора ESAT-6, например по меньшей мере четыре повтора ESAT-6, например, по меньшей мере пять повторов ESAT-6. В другом своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где по меньшей мере один антиген не инициирует иммунный ответ против БЦЖ, и где слитый белок содержит по меньшей мере два повтора ESAT-6, например, по меньшей мере три повтора ESAT-6, например, по меньшей мере четыре повтора ESAT-6, например, по меньшей мере пять повторов ESAT-6.

В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит:

a) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) или их варианты или иммуногенные эпитопы, или

b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a), и

где слитый белок содержит четыре повтора ESAT-6, расположенные попеременно с антигенами, отличающимися от ESAT-6.

В другом своем особенно предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит как ранние, так и поздние БЦЖ-антигены в комбинации с повторами ESAT-6. Вариант такого слитого белка обозначен H107 (SEQ ID NO:9). Таким образом, в другом своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:9. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит:

a) SEQ ID NO:9 (H107) или ее варианты или иммуногенные эпитопы, или

b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a) и

где аминокислотная последовательность (b) обладает такой же иммуногенностью или по меньшей мере такой же иммуногенностью, как и SEQ ID NO:9.

Вариант слитого белка H107 обозначен как H107e (SEQ ID NO:91). Таким образом, в своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность,

представленную SEQ ID NO:91. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит:

- a) SEQ ID NO:91 (H107e) или ее варианты или иммуногенные эпитопы, или
- b) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a) и

где аминокислотная последовательность (b) обладает такой же иммуногенностью или по меньшей мере такой же иммуногенностью, как и SEQ ID NO: 91.

Описанные здесь антигены слитых белков могут быть связаны посредством линкеров, такие как пептидные линкеры. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где антигены слитых белков связаны с линкерной молекулой.

Для продуцирования слитых белков или антигенов, они могут содержать соответствующие метки для очистки, то есть, для очистки, например, из рекомбинантной экспрессионной системы. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит метку для очистки. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к описанному здесь слитому белку, где метка для очистки выбрана из группы, состоящей из His-метки, хитин-связывающего белка (CBP), белка, связывающегося с мальтозой (MBP) и глутатион-S-трансферазы (GST). В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где метка для очистки представляет собой His-метку.

Варианты слитых белков могут включать БЦЖ<sup>+</sup>-антигены. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит по меньшей мере один антиген, который запускает иммунный ответ против БЦЖ. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где слитый белок содержит по меньшей мере один БЦЖ<sup>+</sup>-антиген. В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где по меньшей мере один антиген, инициирующий иммунный ответ против БЦЖ, выбран из группы, состоящей из Rv1886c (Ag85b), Rv3804c (Ag85a), Rv0288 (TB10.4), Rv0287 (EsxG), Rv3478 (PPE60), Rv0475 (HbNA), Rv3890c (EsxC), Rv3891c (EsxD), Rv1284 (CanA), Rv3019c (EsxR), Rv3020c (EsxS), Rv3017c (EsxQ), Rv2031c (HspX), Rv0983 (PepD), Rv1196 (PPE18), Rv2608 (PPE42), Rv3619 (EsxV) и Rv3620 (EsxW) и их вариантов. В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, где по меньшей мере один антиген, который инициирует иммунный ответ против БЦЖ, выбран из:

- a) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:10 (Ag85b), SEQ ID NO:11 (Ag85a), SEQ ID NO:12 (TB10.4), SEQ ID NO:13 (EsxG),

SEQ ID NO: 14 (PPE60), SEQ ID NO:15 (HBHA), SEQ ID NO:16 (EsxC), SEQ ID NO:17 (EsxD), SEQ ID NO:18 (CanA), SEQ ID NO:19 (EsxR), SEQ ID NO:20 (EsxS), SEQ ID NO:21 (EsxQ), SEQ ID NO:22 (HspX), SEQ ID NO:23 (PepD), SEQ ID NO:24 (PPE18), SEQ ID NO:25 (PPE42), SEQ ID NO:26 (EsxV) и SEQ ID NO:27 (EsxW) и их вариантов или иммуногенных эпитопов, или

b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a).

Описанные здесь слитые белки являются иммуногенными и могут быть эффективно использованы в вакцине или в иммуногенной композиции для профилактики, ингибирования или лечения туберкулезной инфекции и/или туберкулеза. Такую вакцину или иммуногенную композицию можно использовать в профилактических или терапевтических целях. Таким образом, в одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к вакцине или к иммуногенной композиции, содержащей описанный здесь слитый белок.

Для обеспечения оптимальных свойств вакцины или иммуногенной композиции предпочтительно, чтобы она содержала иммунологически и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или адъювант. Таким образом, в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанной здесь вакцине или иммуногенной композиции, где вакцина или иммуногенная композиция дополнительно содержит иммунологически и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или адъювант. В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанной здесь вакцине или иммуногенной композиции, где вакцина или иммуногенная композиция дополнительно содержит один или более адъювантов. В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанной здесь вакцине или иммуногенной композиции, где адъюванты выбраны из группы, состоящей из составов с нейтральным адъювантом, составов с анионным адъювантом, составов с катионным адъювантом, катионных липосом (например, бромида диметилдиоктадециламмония (DDA)), Quil A, QS21, поли-І:С, гидроксида алюминия, неполного адъюванта Фрейнда, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, монофосфориллипида А (MPL), димиколята трегалозы (TDM), дибегената трегалозы (TDB), мурамилдипептида (MDP), мономиколилглицерина (MMG), CpC и «IC31» или их комбинаций. В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанной здесь вакцине или иммуногенной композиции, где адъювант представляет собой катионный адъювантный состав 1 (CAF01). В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, адъювант представляет собой катионный адъювантный состав 10 (CAF10), содержащий DDA, MMG и CpG. Дополнительные катионные адъювантные составы, которые могут быть использованы в качестве адъюванта в вакцине или в иммуногенной композиции согласно изобретению, перечислены ниже в Таблице 1:

Таблица 1  
Номенклаура адъювантов САФ

	Система доставки		Иммуностимуляторы		TLR-лиганд	Другие
	Тип	Поверхностно-активное вещество	Масло	CLR-лиганд		
CAF01	Липосома	DDA	-	TDB	-	-
CAF04	Липосома	DDA	-	MMG	-	-
CAF05	Липосома	DDA	-	TDB	Поли-IC	-
CAF06	Липосома	DDA	-	TDB	MPL	-
CAF09	Липосома	DDA	-	MMG	Поли-IC	-
CAF10	Липосома	DDA	-	MMG	CpG	-
CAF11	Липосома	DDA	-	MMG	Флагелин	-
CAF19	Эмульсия	DDA	сквалан	MMG	-	-
CAF24	Эмульсия	DDA	сквалан	MMG	pIC	-

Сокращения: DDA: N, N-диметил-N, N-диоктадециламмоний (бромидная соль). DSPC: 1,2-Дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин. DSPE-ПЭГ: 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[карбокси(полиэтиленгликоль)-2000] (натриевая соль). TDB: α, α-трегалозо-6,6'-дибегенат. MMG: Синтетический мономиколилглицерин. Поли-IC: Полиинозиновая-полицитидиловая кислота (натриевая соль). CpG: 5'-С-фосфат-G-3'-олигонуклеотид. MPL: Монофосфориллипид А.

Описанные здесь слитые белки могут быть использованы либо в составе отдельной вакцины, либо в комбинации с вакциной БЦЖ. Таким образом, один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к описанной здесь вакцине или к иммуногенной композиции, где вакцина или иммуногенная композиция дополнительно содержит БЦЖ.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку или к описанной здесь вакцине или иммуногенной композиции для их использования в целях вакцинации или иммунизации индивидуума против инфекций и/или заболеваний, вызванных вирулентными микобактериями.

Вирулентные микобактерии могут инфицировать различных животных, и в некоторых случаях, могут представлять опасность, например, для сельскохозяйственных

животных. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, к вакцине или иммуногенной композиции для применения согласно изобретению, где индивидуумом является млекопитающее. Однако, основной целью получения раскрытых здесь слитых белков является улучшение существующих возможностей для борьбы с глобальной проблемой, связанной с туберкулезной инфекцией и/или туберкулезом у человека. Таким образом, в своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к описанному здесь слитому белку, к вакцине или иммуногенной композиции для применения согласно изобретению, где млекопитающим является человек.

Туберкулез может быть вызван различными вирулентными микобактериями. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к слитому белку, к вакцине или иммуногенной композиции для применения согласно изобретению, где вирулентная микобактерия выбрана из группы, состоящей из *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* и *M. microti*, а предпочтительно *M. tuberculosis*. В своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к слитому белку, к вакцине или иммуногенной композиции для применения согласно изобретению, где вирулентная микобактерия представляет собой *M. tuberculosis*.

Способы применения могут быть самыми разнообразными. При этом, может быть применен любой из обычных способов введения вакцины, который включает, но не ограничивается ими, введение составов перорально, в виде суппозиторий, парентерально и путем инъекции, например, подкожно или внутримышечно. В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к слитому белку, к вакцине или иммуногенной композиции для применения согласно изобретению, где слитый белок, вакцину или иммуногенную композицию вводят способом, выбранным из группы, состоящей из перорального, парентерального, подкожного и внутримышечного введения. Дозы вакцин будут зависеть от способа введения и могут варьироваться в зависимости от возраста вакцинируемого человека и, в меньшей степени, от массы вакцинируемого человека.

Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция могут быть преимущественно введены в комбинации с вакциной БЦЖ, как описано в настоящей заявке. Таким образом, в одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к слитому белку, к вакцине или иммуногенной композиции для их применения согласно изобретению, где БЦЖ вводят до, во время или после введения слитого белка, вакцины или иммуногенной композиции. Неожиданно было обнаружено, что БЦЖ при одновременном введении со слитым белком, вакциной или иммуногенной композицией, раскрытыми в настоящей заявке, может обеспечивать сильный адъювантный эффект, приводящий к сильному иммунному ответу высокого качества. Таким образом, в своем предпочтительном варианте, настоящее изобретение относится к слитому белку, вакцине или иммуногенной композиции для использования согласно изобретению, где БЦЖ вводят одновременно с введением слитого белка, вакцины или иммуногенной

композиции. В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к слитому белку, вакцине или иммуногенной композиции для применения согласно изобретению, где индивидуум ранее был вакцинирован БЦЖ.

Поскольку описанные здесь слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция могут действовать синергически с вакциной БЦЖ, то для удобства их можно поставлять вместе. Таким образом, в одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к набору, включающему:

i) описанный здесь слитый белок или описанную здесь вакцину или иммуногенную композицию,

ii) БЦЖ и

III) необязательно, инструкции по применению.

В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к описанному здесь набору, где i) и ii) предназначены для одновременного, отдельного или последовательного введения.

Раскрытые здесь слитые белки могут быть получены рекомбинантно путем создания конструкций экспрессионных векторов, кодирующих слитые белки, и введения экспрессионного вектора в подходящую рекомбинантную экспрессионную систему. Таким образом, в одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую описанный здесь слитый белок.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессионному вектору, содержащему описанную здесь нуклеотидную последовательность, функционально связанную с одной или более регуляторными последовательностями, подходящими для регуляции продуцирования слитого белка в подходящем хозяине.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей описанный здесь экспрессионный вектор.

Экспрессионные векторы, подходящие для получения раскрытых здесь слитых белков, могут включать нуклеиновые кислоты, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO:46 (ESAT-6), SEQ ID NO:47 (PPE68), SEQ ID NO:48 (espI), SEQ ID NO:49 (espC), SEQ ID NO:50 (espA), SEQ ID NO:51 (MPT64), SEQ ID NO:52 (MPT70), SEQ ID NO:53 (MPT83), SEQ ID NO:55 (Ag85b), SEQ ID NO:56 (Ag85a), SEQ ID NO:57 (TB10.4), SEQ ID NO:58 (EsxG), SEQ ID NO:59 (PPE60), SEQ ID NO:60 (HbHA), SEQ ID NO:61 (EsxC), SEQ ID NO:62 (EsxD), SEQ ID NO:63 (CanA), SEQ ID NO:64 (EsxR), SEQ ID NO:65 (EsxS), SEQ ID NO:66 (EsxQ), SEQ ID NO:67 (HspX), SEQ ID NO:68 (PepD), SEQ ID NO:69 (PPE18), SEQ ID NO:70 (PPE42), SEQ ID NO:71 (EsxV), SEQ ID NO:72 (EsxW), SEQ ID NO:73 (Rv2660c), SEQ ID NO:74 (Rv3614), SEQ ID NO:75 (Rv3865), SEQ ID NO:76 (Rv3849), SEQ ID NO:77 (Rv3872) и SEQ ID NO:78 (Rv3881) и их вариантов.

Кроме того, выбранные слитые белки могут кодироваться нуклеиновыми кислотами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO:54 (H107), SEQ ID NO:79

(H107b), SEQ ID NO: 80 (H107c), SEQ ID NO: 92 (H107e), SEQ ID NO:81 (H106), SEQ ID NO:82 (H105) и SEQ ID NO:83 (H104) и их вариантов.

В Таблице 2 представлен обзор антигенов и слитых белков вместе с номерами последовательностей и паттерном экспрессии:

<b>Антиген (или слитый белок)</b>	<b>Аминокислотная последовательность</b>	<b>Последовательность нуклеиновой кислоты</b>	<b>Экспрессия</b>	<b>БЦЖ</b>
ESAT-6, Rv3875	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:46	Ранняя	-
PPE68, Rv3873	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:47	Ранняя	-
espI, Rv3876	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:48	Ранняя	-
espC, Rv3615c	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:49	Ранняя	-
espA, Rv3616c	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:50	Ранняя	-
MPT64, Rv1980c	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:51	Неизвестно	-
MPT70, Rv2875	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:52	Поздняя	-
MPT83, Rv2873	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:53	Поздняя	-
H107	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:54		N/A
Ag85b, Rv1886c	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:55	Ранняя	+
Ag85a, Rv3804c	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:56	Ранняя	+
TB10.4, Rv0288	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:57	Ранняя	+
EsxG, Rv0287	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:58	Ранняя	+
PPE60, Rv3478	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:59	Ранняя	+
HBHA, Rv0475	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:60	Ранняя	+
EsxC, Rv3890c	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:61	Ранняя	+
EsxD, Rv3891c	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:62	Ранняя	+
CanA, Rv1284	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:63	Ранняя	+
EsxR, Rv3019c	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:64	Ранняя	+
EsxS, Rv3020c	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:65	Ранняя	+
EsxQ, Rv3017c	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:66	Ранняя	+
HspX, Rv2031c	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:67	Поздняя	+
PepD, Rv0983	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:68	Ранняя	+
PPE18, Rv1196	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:69	Ранняя	+

PPE42, Rv2608	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:70	Ранняя	+
EsxV, Rv3619	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:71	Ранняя	+
EsxW, Rv3620	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:72	Ранняя	+
Rv2660c	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:73	Поздняя	+
EspD, Rv3614	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:74	Ранняя	неизвестно
EspF, Rv3865	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:75	Ранняя	-
EspR, Rv3849	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:76	Ранняя	неизвестно
PE35, Rv3872	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:77	Ранняя	-
EspB, Rv3881	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:78	Ранняя	-
H107b	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:79		N/A
H107c	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:80		N/A
H106	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:81		N/A
H105	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:82		N/A
H104	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:83		N/A
H84	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:84		N/A
H83	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:85		N/A
H76	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:86		N/A
H74	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:87		N/A
H65	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:88		N/A
H64	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:89		N/A
H56	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:90		N/A
H107e	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:92		N/A

Все патентные и непатентные документы, цитируемые в настоящей заявке, в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Следует отметить, что варианты осуществления и признаки изобретения, относящиеся к одному из аспектов настоящего изобретения, также применимы и к другим аспектам изобретения. Варианты и признаки настоящего изобретения также описаны в нижеследующих пунктах.

#### **Объекты изобретения**

1. Слитый белок, содержащий по меньшей мере два антигена, происходящих от *M. tuberculosis*.

2. Слитый белок согласно пункту 1, где слитый белок содержит по меньшей мере три антигена, например, по меньшей мере четыре антигена, например, по меньшей мере пять антигенов, например, по меньшей мере шесть антигенов, например, по меньшей мере семь антигенов, например, по меньшей мере восемь антигенов.

3. Слитый белок согласно любому из пунктов 1 или 2, где слитый белок содержит

ранний и поздний антигены.

4. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере один антиген не инициирует иммунный ответ против БЦЖ.

5. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где антигены делетированы, не секретируются или имеют низкую экспрессию в БЦЖ.

6. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где антигены выбраны из группы, состоящей из Rv3875 (ESAT-6), Rv3873 (PPE68), Rv3876 (espI), Rv3615c (espC), Rv3616c (espA), Rv1980c (MPT64), Rv2875 (MPT70) и Rv2873 (MPT83) и их вариантов.

7. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где антигены выбраны из:

а) аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) и их вариантов или иммуногенных эпитопов, или

б) аминокислотных последовательностей, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей а).

8. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где слитый белок содержит:

а) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC) и SEQ ID NO:5 (espA) или их варианты или их иммуногенные эпитопы, или

б) аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей а).

9. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где слитый белок содержит:

а) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) или их варианты или иммуногенные эпитопы, или

б) аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей а).

10. Слитый белок согласно любому из пунктов 7-9, где аминокислотные

последовательности b) по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей а).

11. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где слитый белок содержит по меньшей мере два повтора ESAT-6, например, по меньшей мере три повтора ESAT-6, например, по меньшей мере четыре повтора ESAT-6, например, по меньшей мере пять повторов ESAT-6.

12. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где слитый белок содержит по меньшей мере четыре повтора ESAT-6.

13. Слитый белок согласно любому из пунктов 11 или 12, где повторы ESAT-6 разделены по меньшей мере одним антигеном, отличающимся от ESAT-6.

14. Слитый белок согласно любому из пунктов 11-13, где повторы ESAT-6 расположены попеременно с антигенами, отличающимися от ESAT-6.

15. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где слитый белок содержит:

а) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) или их варианты или иммуногенные эпитопы, или

б) аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей а); и

где слитый белок содержит четыре повтора ESAT-6, расположенные попеременно с антигенами, отличающимися от ESAT-6.

19. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, представленную любой последовательностью, выбранной из группы, состоящей из:

а) SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:91 или их вариантов или иммуногенных эпитопов; или

б) аминокислотных последовательностей, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей а).

20. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:91.

21. Слитый белок согласно любому из пунктов, где слитый белок кодируется

последовательностями нуклеиновых кислот, выбранными из группы, состоящей из:

а) SEQ ID NO:54 (H107), SEQ ID NO:79 (H107b), SEQ ID NO:80 (H107c), SEQ ID NO:92 (H107e) SEQ ID NO:81 (H106), SEQ ID NO:82 (H105) и SEQ ID NO:83 (H104), или их вариантов или фрагментов; или

б) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей а).

22. Слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов, где антигены гибридных белков связаны с линкерной молекулой.

23. Слитый блок согласно любому из предшествующих пунктов, где слитый белок содержит по меньшей мере один антиген, который инициирует иммунный ответ против БЦЖ.

24. Слитый белок согласно пункту 23, где по меньшей мере один антиген, который инициирует иммунный ответ против БЦЖ, выбран из группы, состоящей из Rv1886c (Ag85b), Rv3804c (Ag85a), Rv0288 (TB10.4), Rv0287 (EsxG), Rv3478 (PPE60), Rv0475 (HbHA), Rv3890c (EsxC), Rv3891c (EsxD), Rv1284 (CanA), Rv3019c (EsxR), Rv3020c (EsxS), Rv3017c (EsxQ), Rv2031c (HspX), Rv0983 (PepD), Rv1196 (PPE18), Rv2608 (PPE42), Rv3619 (EsxV) и Rv3620 (EsxW) и их вариантов.

25. Слитый белок согласно любому из пунктов 23 или 24, где по меньшей мере один антиген, который инициирует иммунный ответ против БЦЖ, выбран из:

а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:10 (Ag85b), SEQ ID NO:11 (Ag85a), SEQ ID NO:12 (TB10.4), SEQ ID NO:13 (EsxG), SEQ ID NO:14 (PPE60), SEQ ID NO:15 (HbHA), SEQ ID NO:16 (EsxC), SEQ ID NO:17 (EsxD), SEQ ID NO:18 (CanA), SEQ ID NO:19 (EsxR), SEQ ID NO:20 (EsxS), SEQ ID NO:21 (EsxQ), SEQ ID NO:22 (HspX), SEQ ID NO:23 (PepD), SEQ ID NO:24 (PPE18), SEQ ID NO:25 (PPE42), SEQ ID NO:26 (EsxV) и SEQ ID NO:27 (EsxW) и их вариантов или иммуногенных эпитопов, или

б) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей а).

26. Вакцина или иммуногенная композиция, содержащая слитый белок согласно любому из предшествующих пунктов.

27. Вакцина или иммуногенная композиция согласно пункту 26, где вакцина или иммуногенная композиция дополнительно содержит один или несколько адъювантов.

28. Вакцина или иммуногенная композиция согласно пункту 27, где адъюванты выбраны из группы, состоящей из составов с нейтральным адъювантом, составов с

анионным адъювантом, составов с катионным адъювантом, катионных липосом (например, бромида диметилдиоктадециламмония (DDA)), Quil A, QS21, поли-I:C, гидроксида алюминия, неполного адъюванта Фрейнда, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, монофосфориллипида А (MPL), димиколята трегалозы (TDM), дибегената трегалозы (TDB), мурамилдипептида (MDP), мономиколилглицерина (MMG), CpC и «IC31» или их комбинаций.

29. Вакцина или иммуногенная композиция согласно любому из пунктов 26-28, где вакцина или иммуногенная композиция дополнительно содержит БЦЖ.

30. Слитый белок согласно любому из пунктов 1-25 или вакцина или иммуногенная композиция согласно любому из пунктов 26-29 для применения в целях вакцинации или иммунизации индивидуума против инфекций и/или заболеваний, вызываемых вирулентной микобактерией.

31. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения согласно пункту 30, где индивидуумом является млекопитающее.

32. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения согласно пункту 31, где млекопитающим является человек.

33. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения согласно любому из пунктов 30-32, где вирулентная микобактерия выбрана из группы, состоящей из *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* и *M. microti*, а предпочтительно *M. tuberculosis*.

34. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения согласно любому из пунктов 30-33, где БЦЖ вводят до, во время или после введения слитого белка, вакцины или иммуногенной композиции.

35. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения согласно пункту 34, где БЦЖ вводят одновременно с введением слитого белка, вакцины или иммуногенной композиции.

36. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения согласно любому из пунктов 30-35, где индивидуум ранее был вакцинирован БЦЖ.

37. Набор, включающий:

я) Слитый белок согласно любому из пунктов 1-25 или вакцину или иммуногенную композицию согласно любому из пунктов 26-29,

ii) БЦЖ и

III) необязательно, инструкции по применению.

38. Набор согласно пункту 37, где i) и ii) предназначены для одновременного, раздельного или последовательного введения.

39. Последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую слитый белок согласно любому из пунктов 1-25.

40. Рекombинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность согласно пункту 39, функционально связанную с одной или более регуляторными последовательностями, подходящими для регуляции продуцирования

слитого белка в подходящем хозяине.

41. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор согласно пункту 40.

Настоящее изобретение будет более подробно описано в нижеследующих неограничивающих примерах.

### **Примеры**

Пример 1: Вакцинация БЦЖ не инициирует иммунный ответ против антигенов слитых белков H104-H107 M. tuberculosis.

#### *Материалы и методы*

Самок мышей СВ6F1 в возрасте от шести до десяти недель иммунизировали Датской БЦЖ M. bovis или инфицировали 25-50 КОЕ вирулентного штамма Mtb Эрмана путем аэрозольного введения или иммунизировали три раза 2 мкг отдельных белков, приготовленных в составе катионного адьюванта 1 (CAF01) в общем объеме 200 мкл. Каждая белковая вакцина была введена с двухнедельным интервалом. Через десять недель после иммунизации БЦЖ или через восемнадцать недель после Mtb-инфицирования, или через две недели после последней иммунизации одним белком, моноклеточные суспензии спленоцитов получали от отдельных животных путем пропускания селезенки через клеточные 100 мкм-фильтры. Клетки дважды промывали в RPMI с последующим определением количества клеток, полученных из каждой селезенки, и доведением до  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Для стимуляции клеток, аликвоты по 100 мкл ( $2 \times 10^5$  клеток) распределяли по отдельным лункам 96-луночных планшетов и добавляли очищенные рекомбинантные одиночные антигены Mtb (2 мкг/мл). Общий объем на лунку доводили до 200 мкл с использованием среды RPMI, и клетки инкубировали с отдельными антигенами в течение 3-5 дней при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub>. В этот момент времени, концентрацию цитокина IFN-γ определяли методом сэндвич-ELISA в супернатантах клеток.

#### *Результаты*

Субпопуляцию потенциальных антигенов-кандидатов отбирали для разработки субъединичных вакцин с антигенами, не являющимися БЦЖ (БЦЖ<sup>-</sup>), и было проведено использование, вызывают ли они иммунный ответ после вакцинации БЦЖ. Спленоциты, выделенные у мышей, стимулировали указанными отдельными антигенами (2 мкг/мл), очищенными в виде рекомбинантных белков (см. также Пример 2). После стимуляции оценивали высвобождение клетками цитокина IFN-γ в среду. Концентрация цитокина IFN-γ, оцененная в среде клеток, инкубированных без антигенов («нет»), представляла собой базовый уровень для нестимулированных клеток. У животных, иммунизированных БЦЖ, ни один из антигенов-кандидатов не вызывал иммунных ответов (фигура 1А). Напротив, антиген ТВ10.4, экспрессируемый БЦЖ, вызывал значительный иммунный ответ (фигура 1А). У Mtb-инфицированных животных, все антигены вызывали иммунный ответ, что подтверждает, что эти антигены являются иммуногенными и экспрессируются во время Mtb-инфицирования (фигура 1В). Аналогичным образом, у животных, вакцинированных отдельными белками, все антигены вызывали иммунный ответ, что

указывает на то, что эти антигены являются иммуногенными в линии мышей СВ6F1 (фигура 1С).

#### *Вывод*

Иммунизация Датской БЦЖ *M. bovis* не индуцировала клеточный иммунный ответ против любого из восьми вакцинных антигенов-кандидатов. Напротив, все антигены-кандидаты вызывали иммунный ответ после *Mtb*-инфицирования или иммунизации одним белком. Таким образом, антигены Н104-Н107 не имеют общих антигенов с Датской БЦЖ *M. bovis* и специфичны к *Mtb*. В настоящей заявке, такие антигены называются БЦЖ<sup>-</sup>-антигенами. В противоположность этому, антигены, против которых иммунизация БЦЖ вызывает Т-клеточный ответ, называются здесь БЦЖ<sup>+</sup>-антигенами, например, ТВ10.4.

#### Пример 2: Конструирование слитых белков

##### *Материалы и методы*

Гены, кодирующие одиночные и слитые белки, были получены путем синтеза на основе белковых последовательностей, транслированных из опубликованной последовательности генома штамма H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. Синтетические последовательности ДНК были оптимизированы по кодонам для экспрессии в *Escherichia coli* и клонированы в экспрессионный вектор pJ411 под контролем индуцибельного промотора T7 и трансформированы в *Escherichia coli*. Вектор pJ411 кодирует N-концевую His-метку в одной рамке считывания с последовательностью, кодирующей встроенный рекомбинантный белок. Для каждого белка, экспрессию His-меченого рекомбинантного белка индуцировали в том случае, когда культура *in vitro* достигала плотности ~0,5 OD<sub>600</sub>. На следующий день, бактерии собирали, подвергали лизису и рекомбинантный белок очищали путем проведения трехстадийной очистки. Такая очистка включала удаление растворимого белка *E. coli* из осажденных рекомбинантных белков (телец включения), аффинную хроматографию на иммобилизованном металле и анионный или катионный обмен в зависимости от заряда белка. После очистки, идентичность очищенного белка подтверждали масс-спектроскопией, а чистоту - путем сканирования ДСН-гелей, окрашенных кумасси. И наконец, определяли концентрацию белка.

##### *Результаты*

На основании результатов Примера 1 были сконструированы гибридные белки с БЦЖ<sup>-</sup>-антигенами. Выбор рекомбинантных слитых белков схематично показан на фигурах 2 и 3. Выход очищенного слитого белка из 6 литров исходной культуры варьировался от 0,6 до 20 мг. Концентрация очищенного белка варьировалась от 0,2 мг/мл до 0,7 мг/мл. Чистота составляла 95% или выше.

#### *Вывод*

Все одиночные и слитые белки были получены в количестве и качестве, достаточных для того, чтобы эти антигены можно было использовать для вакцинации и для осуществления всех необходимых иммунизаций и клеточных стимуляций, описанных в приведенных ниже примерах.

#### Пример 3: МТР70 представляет собой антиген, экспрессия которого повышается на

поздней стадии Mtb-инфицирования, то есть, «поздний антиген».

#### *Материалы и методы*

Самок мышей СВ6F1 аэрозольно инфицировали 25-50 КОЕ вирулентного штамма Mtb Эрдмана. Через три, двенадцать и двадцать недель, мышей умерщвляли для иммунологического анализа. Легкие слегка гомогенизировали с использованием Т-образных пробирок GentleMACS (Miltenyi Biotec) и расщепляли с использованием коллагеназы IV (Sigma-Aldrich) в течение 30-60 минут при 37°C. Моноклеточные суспензии получали путем пропускания ткани через клеточные 100 мкм-фильтры. Клетки дважды промывали в RPMI перед стимуляцией антигеном для внутриклеточного окрашивания на цитокины (ICS) и ELISA.

ICS: Всего  $1-2 \times 10^6$  клеток легких стимулировали *in vitro* в течение 1 часа в RPMI+10% FCS, содержащем 1 мкг/мл анти-CD28 и анти-CD49d антитела с 5 мкг ESAT-6 или смеси MPT70 Permix или без них, а затем, через 5 часов в присутствии 10 мкг/мл брефелдина А (Sigma-Aldrich) при 37°C в автоматическом нагревателе, который охлаждал клетки до 4°C после инкубирования. На следующий день, клетки промывали буфером FACS (1× PBS, содержащим 1% FCS) и окрашивали при 4°C на поверхностные маркеры с использованием анти-CD3, анти-CD4 и анти-CD44 антител. Через 15-30 минут после поверхностного окрашивания, клетки промывали буфером FACS, делали проницаемыми с помощью набора Cytofix/Cytoperm (BD) в соответствии с инструкциями производителя и окрашивали внутриклеточно с использованием антител против IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-17A. Затем клетки промывали, ресуспендировали в буфере FACS и анализировали с помощью программы LSR FACS Fortessa (BD). Все данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo v.10 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

ELISA: Клетки легких стимулировали ESAT-6 или смесью MPT70 при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Через три дня, секретлируемый IFN- $\gamma$  оценивали с помощью сэндвич-ELISA супернатантов культуры.

#### *Результаты*

Через три недели после Mtb-инфицирования наблюдался значительный ответ ESAT-6, оцененный с помощью ELISA на IFN- $\gamma$  (фигура 4А) и с использованием CD4-Т-клеток, секретирующих цитокины (фигура 4В). Однако, в этот момент времени, иммунный ответ против MPT70 отсутствовал. Через 12 недель после заражения наблюдался небольшой, но поддающийся детектированию иммунный ответ против MPT70, который усиливался на 20-й неделе. Это указывает на то, что ESAT-6 может служить в качестве «раннего антигена», а MPT70 - в качестве «позднего антигена», который характеризуется иммунным распознаванием на поздних/хронических стадиях инфекции.

#### *Вывод*

Кинетика иммунного ответа против ESAT-6 и MPT70 подтверждает, что среди БЦЖ--антигенов, ESAT-6 является «ранним антигеном», тогда как MPT70 является «поздним антигеном», экспрессия которого повышается на поздних стадиях

инфицирования.

Пример 4: Антигены на поздней стадии улучшают долговременную защиту

*Материалы и методы*

Группы мышей были иммунизованы три раза 2 мкг слитого белка, приготовленного в составе катионного адъюванта 1 (CAF01), в общем объеме 200 мкл. Каждый раунд вакцинации проводили с интервалом в 2 недели. Через шесть недель после третьей иммунизации, всех животных заражали аэрозолем (20-50 КОЕ) штамма Эрзмана *Mycobacterium tuberculosis*. Через четыре или восемнадцать недель, количество микобактерий определяли в отдельных легких путем посева серийных разведений гомогената легких.

*Результаты*

Для оценки важности «поздних антигенов» для долговременной защиты, бактериальную нагрузку у инфицированных животных, иммунизированных слитым белком, содержащим как антигены ранней, так и поздней стадии (H105) (SEQ ID NO:37), сравнивали с инфицированными животными, иммунизированными слитым белком, содержащим только антигены ранней экспрессии (H104) (SEQ ID NO:38). На ранней стадии инфицирования (инфицирования через четыре недели), все четыре слитых белка индуцировали значительную защиту без каких-либо различий в их уровне защиты (фигура 5A). На хронической стадии инфицирования (18 недель), добавление антигенов поздней стадии давало определенный эффект, поскольку H105 обеспечивал лучшую защиту, чем H104, в котором отсутствовали антигены поздней стадии ( $p=0,044$ ) (фигура 5B).

*Вывод*

Включение в вакцину антигенов поздних стадий улучшает долгосрочную защиту/сдерживание распространения инфекции (фигура 5).

Пример 5: БЦЖ<sup>-</sup>-антигены обладают высокой эффективностью и, в отличие от БЦЖ<sup>+</sup>-антигенов, действуют «синергически» с БЦЖ.

*Материалы и методы*

Группы мышей СВ6F1 (n=4) были совместно иммунизированы H107 и БЦЖ (БЦЖ+H107) сначала путем введения БЦЖ подкожно с левой стороны у основания хвоста, а затем путем введения 1 мкг H107 (SEQ ID NO: 9) в CAF01 в тот же участок инъекции на следующий день. Животных снова вакцинировали H107 через две недели (правая сторона) и четыре недели (левая сторона). Через две недели после последней иммунизации, животных подвергали эвтаназии и получали моноклеточные суспензии путем пропускания селезенки через клеточные 100 мкм-фильтры. Клетки дважды промывали в RPMI перед стимуляцией антигеном для ICS, как описано в Примере 3, за исключением того, что на этот раз, анти-KLRG1 антитело включали в анализ на окрашивание поверхности. Во втором эксперименте, всех животных, за исключением небольшой контрольной группы с физиологическим раствором (n=4), иммунизировали Датской БЦЖ *M. bovis* и давали им отдых в течение двенадцати месяцев. В этот момент времени, животных, иммунизированных БЦЖ, разделяли на четыре группы (n=4 в группе)

и повторно иммунизировали один раз БЦЖ *M. bovis* или три раза H107/CAF01 или физиологическим раствором. Через три недели после третьей иммунизации, животных подвергали эвтаназии и получали моноклеточные суспензии из селезенки и стимулировали для ICS (как описано в Примере 3) с использованием H107 в качестве антигена.

В отдельных экспериментах, группы мышей совместно иммунизировали (как описано выше) БЦЖ и либо H104-H107 (БЦЖ<sup>-</sup>-антигенами), H74 (БЦЖ<sup>-</sup>-антигенами, SEQ ID NO:42), либо H65 (БЦЖ<sup>+</sup>-антигенами, SEQ ID NO:43). Контрольные группы иммунизировали H107/CAF01 или БЦЖ или вводили физиологический раствор. Бактериальную нагрузку оценивали в отдельных легких через 4 и 18 недель после заражения штаммом *Mtb* Эрдмана.

### *Результаты*

У животных, иммунизированных физиологическим раствором и БЦЖ, не наблюдалось иммунного ответа против H107, как и ожидалось, поскольку H107 не имеет общих антигенов с БЦЖ. Иммунизация H107 приводила к формированию устойчивого CD4-T-клеточного ответа, и, что важно, он значительно усиливался при одновременном введении БЦЖ (БЦЖ+H107, фигура 6A). Это свидетельствует о том, что совместное введение БЦЖ может усиливать иммунные ответы H107 (БЦЖ<sup>-</sup>-антигены), даже несмотря на то, что антигены этих двух вакцин не являются общими.

Большинство населения всего мира иммунизировано БЦЖ еще новорожденными, и ревакцинация БЦЖ вызывает все больший интерес благодаря обнадеживающим результатам недавних клинических испытаний. Чтобы выяснить, наблюдался ли ко-адьювантный эффект БЦЖ также у уже БЦЖ-вакцинированных животных, была применена модель повторной вакцинации БЦЖ, в которой две иммунизации БЦЖ были проведены с интервалом в один год (фигура 6B). Как и ожидалось, в группах, получавших физиологический раствор, БЦЖ или ревакцинацию БЦЖ, не наблюдалось какого-либо ответа против H107. Напротив, вакцинация H107 у первично БЦЖ-вакцинированных животных приводила к значительному CD4-T-клеточному ответу, который еще больше усиливался при совместном введении H107 со вторичной вакцинацией БЦЖ. Это указывает на то, что БЦЖ также действует как ко-адьювант у уже БЦЖ-вакцинированных животных.

Вакцинация живой БЦЖ индуцирует CD4-T-клетки с высокодифференцированным фенотипом, которые, как известно, обладают плохой протективной способностью. Напротив, субъединичные вакцины дают менее дифференцированные CD4-T-клетки. Высокодифференцированные CD4-T-клетки (эффекторные клетки памяти и эффекторные клетки) экспрессируют IFN- $\gamma$ , но постепенно теряют коэкспрессию TNF- $\alpha$  и IL-2 в отличие от менее дифференцированных T-клеток (например, центральных клеток памяти) (фигура 7A). Чтобы охарактеризовать дифференцировку T-клеток, показатель функциональной дифференцировки (FDS) может быть определен путем деления IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-клеток на IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>-клетки. Вакцинация БЦЖ давала преимущественно IFN- $\gamma$ -

продуцирующие эффекторные клетки и эффекторные CD4-T-клетки памяти (и очень небольшое количество IFN- $\gamma$ -клеток), в результате чего индекс дифференцировки составлял 13,3 (фигура 7B, вверху). Совместная иммунизация БЦЖ и БЦЖ<sup>+</sup>-вакциной (H65) приводила к некоторым улучшениям профиля экспрессии цитокинов при большем количестве IFN- $\gamma$ -клеток, и давала FDS 1,9 (фигура 7B, в центре). Однако, совместная вакцинация БЦЖ с H107 (БЦЖ<sup>-</sup>-антигенами) давала еще большее улучшение профиля экспрессии цитокинов с преимущественно центральными IFN- $\gamma$ -CD4-T-клетками памяти, и давала FDS 0,5. Это указывает на то, что улучшенное качество T-клеток может быть достигнуто с использованием БЦЖ<sup>-</sup>-антигенов по сравнению с БЦЖ<sup>+</sup>-антигенами, если вакцины были введены вместе с БЦЖ. Высокодифференцированные T-клетки также характеризуются экспрессией KLRG1, и было подтверждено, что вакцинация БЦЖ+H107 приводила к самой низкой частоте экспрессии KLRG1 CD4-T-клетками по сравнению с вакцинацией как БЦЖ, так и БЦЖ+H65 (фигура 7C).

Для сравнения протективной эффективности совместной иммунизации БЦЖ либо с БЦЖ<sup>-</sup>-антигенами (H107), либо с БЦЖ<sup>+</sup>-антигенами (H65), иммунизированных мышей инфицировали *Mtb*-аэрозодем Эрджана. H74 был включен в качестве эталона в ранее описанный слитый белок (WO2015161853 A1). После четырехнедельного заражения, совместная иммунизация как H107, так и H74 повышала протективную эффективность вакцины БЦЖ *M. bovis*, тогда как при вакцинации H65 этого не наблюдалось. Такое увеличение было значимым для H107 не только по сравнению с вакцинацией только H107 или только БЦЖ ( $p < 0,0001$ ), но также и по сравнению с совместной иммунизацией БЦЖ и H74 ( $p = 0,0489$ ) и H65 ( $p < 0,0001$ ) (фигура 8A). Примечательно то, что вакцина H107, вводимая в качестве отдельной вакцины, была более эффективной, чем вакцина БЦЖ и БЦЖ+H65, и была сравнима с БЦЖ+H74. В более поздний момент времени (фигура 8B), протективная эффективность вакцинации одной БЦЖ и совместной вакцинации БЦЖ+H65 была утрачена, но вакцинация H107/CAF01 все еще значительно защищала от *Mtb* ( $p < 0,0001$ ), а совместная вакцинация БЦЖ и слитым белком H107 оставалась наиболее протективной. Другие совместные БЦЖ<sup>-</sup>-вакцины, H104-H106, индуцировали аналогичные уровни защиты при их совместном введении с БЦЖ на 4-й неделе (фигура 9).

#### *Вывод*

Совместное введение БЦЖ *M. bovis* с субъединичными вакцинами, состоящими из БЦЖ<sup>-</sup>-антигенов, приводило к усилению иммунных ответов на субъединичную вакцину как по величине (фигура 6), так и по качеству (фигура 7), а также к усилению защиты после аэрозольной *Mtb*-инфекции (фигура 8 и фигура 9). H107 в качестве отдельной вакцины был более эффективным, чем БЦЖ и БЦЖ+H65, и сравним с БЦЖ+H74, что указывало на то, что описанные здесь комбинации БЦЖ<sup>-</sup>-антигенов являются эффективными при совместном введении вместе с БЦЖ, а также с отдельными вакцинами.

#### Пример 6: Повторы ESAT-6 в слитых белках повышают иммуногенность

##### *Материалы и методы*

В первом эксперименте, группы самок мышей СВ6F1 иммунизировали три раза либо 5 мкг H56 (SEQ ID NO:45) в CAF01, либо 5 мкг H56+5 мкг ESAT-6 в CAF01. Через три недели после третьей иммунизации, спленоциты выделяли у двух животных на группу, и  $2 \times 10^5$  клеток/лунку стимулировали *in vitro* белком ESAT-6 в течение шести часов при 37°C. Количество CD4-T-клеток, продуцирующих любой цитокин IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  или IL-2 в ответ на стимуляцию определяли с помощью ICS. Через шесть недель после иммунизации, мышей инфицировали штаммом *Mtb* Эрдмана, а через три недели, клетки легких выделяли у четырех животных на группу и обрабатывали как спленоциты, описанные выше, для определения количества CD4-T-клеток, продуцирующих цитокины. Через шесть недель после заражения, количество бактерий определяли путем посева гомогенатов легких отдельных мышей на агар 7H11 (n=8 на группу) (фигура 10).

Во втором эксперименте (фигура 11), группы мышей иммунизировали H64/CAF01 или H76/CAF01, содержащим одну (H64, SEQ ID NO:44) или пять (H76, SEQ ID NO:41) копий молекулы ESAT-6, соответственно. Через три недели после третьей иммунизации, спленоциты стимулировали отдельными антигенами, присутствующими в слитых белках H64 и в H76, и определяли частоту CD4-T-клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  или IL-2, с помощью ICS. Стимуляцию белком Rv0287 использовали в качестве негативного контроля. Количество бактерий определяли в легких через шесть недель после заражения штаммом *Mtb* Эрдмана.

В третьем эксперименте (фигура 12), влияние повторов ESAT-6 в другом молекулярном остове исследовали с использованием модели рецидива *Mtb*. Через шесть недель после заражения *Mtb*-аэрозолем Эрдмана, мышам давали изониазид (0,1 г/л) и рифабутин (0,1 г/л) в питьевой воде без ограничений в течение шести недель. Иммунизацию 0,5 мкг H83 (одной копией ESAT-6, SEQ ID NO:40) и H84 (четырьмя копиями ESAT-6, SEQ ID NO:39) или физиологическим раствором (контроль) начинали на 10-й неделе после заражения и вводили три раза с трехнедельным интервалом. Легкие брали для иммунного анализа с помощью ICS через две недели после последней иммунизации (18-я неделя инфицирования) и оценивали бактериальную нагрузку легких путем посева гомогенатов на агар 7H11 на 22-й и 35-й неделе после заражения.

### *Результаты*

ESAT-6 представляет собой низкоиммуногенный антиген после белковой вакцинации, а поэтому желательно повысить ESAT-6-специфическую иммуногенность. Сначала было проведено исследование чтобы определить, будет ли добавление большего количества свободного ESAT-6 в комбинации с ESAT-6-содержащим слитым белком (H56) усиливать иммунный ответ. Через три недели после вакцинации, ESAT-6-специфический иммунный ответ был выше у мышей, которым вводили только H56, по сравнению с мышами, которым вводили H56+ESAT-6 (фигура 10A). Эта разница была еще более выражена в легких через три недели после введения аэрозольной инфекции. В этот момент времени, разница в количестве CD4-T-клеток, продуцирующих цитокины, была значимой ( $p=0,0060$ ) (фигура 10B). Обе схемы вакцинации давали одинаковую

значимую защиту в легких через шесть недель после заражения ( $p=0,0016$  и  $p=0,0121$  по сравнению с невакцинированными животными). Это указывает на то, что добавление большего количества белка ESAT-6 в вакцину не повышает ни иммуногенность, ни защиту.

В качестве решения проблемы, связанной с низкой иммуногенностью ESAT6, были получены слитые белки, в которых последовательность ESAT-6 повторяется по всей молекулярной конструкции. Сравнение иммунного ответа, индуцированного H64, содержащим одну копию молекулы ESAT-6, и слитым белком H76, содержащим пять копий молекулы ESAT-6, показало, что число вакцинно-примированных CD4-T-клеток, специфичных к ESAT-6, было в три-пять раз выше у животных, иммунизированных H76 (фигура 11A). Повышенный иммунный ответ, характерный для ESAT-6, также приводил к повышению защиты при сравнении бактериальной нагрузки у животных, иммунизированных H64 и H76, через шесть недель после аэрозольной инфекции Mtb Эрдмана (фигура 11B).

Аналогичным образом, но с другой молекулярной конструкцией, увеличение числа копий ESAT-6 с одной (H83) до четырех (H84) повышало иммуногенность и защиту у модели с рецидивом Mtb с использованием частичной терапии антибиотиками. Через две недели после последней иммунизации, специфичный для ESAT-6 CD4-T-клеточный ответ был значительно выше у H84-группы по сравнению с H83-группой (фигура 12A). После окончания частичного лечения антибиотиками, бактериальная нагрузка у контрольных и H83-вакцинированных животных увеличивалась с 22-й по 35-ю неделю (рецидив) (фигура 12B). Напротив, бактериальная нагрузка снижалась с 22-й по 35-ю неделю у животных, вакцинированных H84 (фигура 12B), что указывало на то, что повторяющийся паттерн ESAT-6 увеличивает как ESAT-6-специфические иммунные ответы, так и протективную активность у модели с рецидивом Mtb.

#### *Вывод*

Оказалось невозможным усилить ответ на ESAT-6 после введения первой вакцины путем добавления свободного белка ESAT-6 («свободный ESAT-6» представляет собой белок ESAT-6, который не является частью слитого белка) в состав вакцины вместе со слитым белком, содержащим ESAT-6 (фигура 10). Вместо этого, включение большего количества копий ESAT-6 в слитый белок увеличивало количество ESAT-6-специфических CD4-T-клеток, примированных вакциной, и улучшало защиту у различных животных-моделей (фигуры 11 и 12).

#### Пример 7: Слитые белки действуют как отдельно, так и вместе с БЦЖ.

##### *Материалы и методы*

В первом (Фигура 13A) и втором эксперименте (Фигура 13B), самок мышей 129/Sv и CB6F1, соответственно, трижды иммунизировали 1 мкг либо H74 (SEQ ID NO:42), либо H105 (SEQ ID NO:37) или H107 (SEQ ID NO:9) в CAF01. Через две недели после третьей иммунизации, спленоциты выделяли у четырех животных на группу и  $1-2 \times 10^6$  клеток/лунку стимулировали *in vitro* пептидами ESAT-6 в течение шести часов при 37°C, а

затем определяли количество CD4-T-клеток, продуцирующих цитокин, с помощью ICS. Уровень секреции IFN- $\gamma$  оценивали в супернатантах 3-дневных культур с помощью ELISA, как описано ранее.

В третьем эксперименте (фигура 13C), самок мышей СВ6F1 совместно иммунизировали БЦЖ и 1 мкг H105 или H107 в CAF01 (БЦЖ+H105 или БЦЖ+H107) путем подкожного введения БЦЖ с левой стороны у основания хвоста, а затем, на следующий день вводили H105 или H107 в CAF01 в тот же участок инъекции. Затем животных снова иммунизировали субъединичной вакциной через две недели (правая сторона) и четыре недели (левая сторона). Через две недели после третьей иммунизации, спленоциты выделяли у четырех животных на группу, и  $1-2 \times 10^6$  клеток/лунку стимулировали *in vitro* пептидами ESAT-6 в течение шести часов при 37°C, а затем определяли количество CD4-T-клеток, продуцирующих цитокин, с помощью ICS. Уровень секреции IFN- $\gamma$  оценивали в супернатантах 3-дневных культур с помощью ELISA, как описано ранее. Через шесть недель после последней иммунизации, всех животных инфицировали аэрозольным штаммом Mtb Эрдмана и оценивали бактериальную нагрузку в легких путем посева гомогенатов органов после 4-недельного инфицирования.

#### *Результаты*

У мышей 129/Sv, увеличение числа копий ESAT-6 с одной (H74 и H105) до четырех (H107) приводило к усилению ответов на ESAT-6 (фигура 13A). Это также наблюдалось для мышей СВ6F1, оцененных как с помощью ICS, так и с помощью ELISA (фигура 13B). И наконец, было проверено, наблюдается ли это и при совместном введении вакцин с БЦЖ. И снова, в этом режиме, H107 значительно усиливал специфический иммунный ответ на ESAT-6 по сравнению с H105, что также приводило к усилению защиты от аэрозольной инфекции Mtb (фигура 13C).

#### *Вывод*

В трех независимых экспериментах (с двумя различными линиями мышей) было продемонстрировано, что увеличение количества копий ESAT-6 от одной (H74 и H105) до четырех (H107) увеличивает ESAT-6-специфический иммунный ответ. Это также наблюдалось в том случае, когда вакцины вводили одновременно с БЦЖ. Кроме того, это уменьшило бактериальную нагрузку, и было показано, что повторение ESAT-6 в олове вакцины является надежным методом улучшения как иммуногенности, так и защиты, опосредованной вакциной. Кроме того, эти данные подтверждают, что такие гибриды эффективны как в качестве самостоятельных вакцин, так и вместе с БЦЖ.

Пример 8: H107 представляет собой лучшую отдельную вакцину, чем известная субъединичная вакцина H56

#### *Материалы и методы*

Группы мышей были иммунизированы три раза 2 мкг слитого белка, приготовленного в составе катионного адьюванта 1 (CAF01), в общем объеме 200 мкл. Каждый раунд вакцинации проводили с интервалом в 2 недели. Через шесть недель после

третьей иммунизации, всех животных заражали аэрозолем (20-50 КОЕ) штамма Эрдмана *Mycobacterium tuberculosis*. Через 4-12 недель, количество микобактерий определяли в отдельных легких путем посева серийных разведений гомогената легких.

#### *Результаты*

Для сравнения протективной эффективности H107 (SEQ ID NO: 9) по сравнению с известной субъединичной вакциной (H56; SEQ ID NO: 45), группы мышей были иммунизированы слитыми белками в адьюванте CAF01 в двух (H107) и пяти (H56) независимых экспериментах. Животных заражали штаммом *Mtb* Эрдмана и количество бактерий подсчитывали в легких отдельных животных (фигура 14). В зависимости от эксперимента, протективную эффективность определяли через 4-12 недель после заражения штаммом *Mtb* Эрдмана. В среднем, вакцина H107 давала 2,0 log<sub>10</sub>-защиту, соответствующую уменьшению бактериальной нагрузки в 100 раз. Для сравнения, вакцина H56 снижала в среднем бактериальную нагрузку в ~7 раз (0,82 log<sub>10</sub>).

#### *Вывод*

Вакцина H107/CAF01 обеспечивает превосходную защиту от аэрозольного заражения вирулентным *Mtb* по сравнению с известной субъединичной противотуберкулезной вакциной (H56/CAF01) (фигура 14).

Пример 9: Совместное введение БЦЖ+H107 усиливает БЦЖ-специфические иммунные ответы

#### *Материалы и методы*

Группы «необученных» мышей CB6F1 (n=4 на момент времени) совместно иммунизировали БЦЖ и трижды иммунизировали 1 мкг H107 (SEQ ID NO:9), как описано в предыдущих примерах. Животных подвергали эвтаназии в различные моменты времени после иммунизации, и получали моноклеточные суспензии путем пропускания селезенки через клеточные 100 мкм-фильтры. Клетки дважды промывали в RPMI перед стимуляцией антигеном для ICS, как описано в предыдущих примерах. TB10.4 использовали в целях стимуляции для оценки БЦЖ-специфических иммунных ответов, поскольку этот антиген был включен в БЦЖ, но не в H107.

#### *Результаты*

Уже через три недели после первой иммунизации (через одну неделю после второй иммунизации H107), в группе БЦЖ+H107 наблюдался повышенный ответ на TB10.4 по сравнению с группой, получавшей только БЦЖ (фигура 15). Эта разница сохранялась вплоть до 9-й недели, когда эксперимент был прекращен. Это указывает на то, что совместное введение H107 с БЦЖ усиливает БЦЖ-специфические иммунные ответы, даже если они не имеют общих антигенов.

#### *Вывод:*

Предыдущие примеры показали, что совместное введение БЦЖ+H107 приводит к усилению ответов на H107 (БЦЖ действует как адьювант для H107). Этот пример показал, что совместное введение H107+БЦЖ также усиливает БЦЖ-специфические иммунные ответы, а это означает, что H107 действует как адьювант для БЦЖ (фигура 15). Таким

образом, между двумя вакцинами существует явная синергия.

Пример 10: Н107е дает повышенную экспрессию белка в E. coli по сравнению с Н107

Выход экспрессии рекомбинантного белка зависит, среди прочего, от аминокислотной последовательности белка, и для крупномасштабного производства вакцины потребуются наиболее оптимальный процесс экспрессии. Для решения этой проблемы был разработан высокоэкспрессирующий вариант Н107, а именно, Н107е.

*Материалы и методы*

Для оптимизации экспрессии, богатую пролином последовательность в Rv3876-части Н107 (SEQ ID NO: 9), AA298-AA517, удаляли и получали Н107е (SEQ ID NO: 91). ДНК-последовательности, соответствующие Н107 (SEQ ID NO: 54) и Н107е (SEQ ID NO: 92), были получены путем химического синтеза, и были встроены в экспрессионный вектор рJ 411 (ATUM, Menlo Park, CA, US) и трансформированы в штамм BL21 E. coli (DE3) (Agilent, DK), который был культивирован в среде Лурия-Бертани (LB). Уровни экспрессии рекомбинантного белка оценивали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ или Вестерн-блот-анализа (с использованием первого антитела, распознающего MPT70-часть Н107/Н107е) через 0, 1 и 3 часа после культивирования с 1 mM изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG). То же количество клеток (с такой же OD<sub>600</sub>) были загружены на дорожки на гелях. После экспрессии, рекомбинантный антиген был очищен из телец включения и подвергнут аффинной хроматографии на ионе металла на 5 мл-колонке HisTrap HP (GE Healthcare) с последующим анионным обменом на колонке HiTrap Q HP (GE Healthcare). Окончательный выход белка оценивали с помощью анализа с использованием бицинхониновой кислоты.

*Результаты*

Из экспериментов по индуцированию культивирования стало ясно, что Н107е имеет значительно повышенную экспрессию в E. coli. Через 1 и 3 часа после индуцирования, полосы, соответствующие Н107е, были намного ярче по сравнению с полосами для Н107 как на ДСН-ПААГ, так и на Вестерн-блоте (фигура 16А). Для сравнения, выход очищенного белка из 6-литрового ферментера увеличился от 2,4-7,2 мг для Н107 и до 15,2 мг для Н107е.

*Вывод:*

Изменение последовательности в Н107е привело к значительному увеличению экспрессии и выхода белка по сравнению с Н107.

Пример 11: Н107е имеет такую же иммуногенность, как и Н107, а также действует синергически с БЦЖ.

*Материалы и методы*

Группы «необученных» мышей СВ6F1 (n=8) совместно иммунизировали БЦЖ и 1 мкг Н107 (SEQ ID NO:9), или Н107е (SEQ ID NO:91), как описано в предыдущих примерах. Через две недели после последней иммунизации, животных подвергали эвтаназии в различные моменты времени после иммунизации, и получали моноклеточные

суспензии путем пропускания селезенки через клеточные 100 мкм-фильтры. Клетки дважды промывали в RPMI перед стимуляцией антигеном для ICS и ELISA на IFN- $\gamma$ , как описано в предыдущих примерах.

Во втором эксперименте, группы «необученных» мышей СВ6F1 (n=8) совместно иммунизировали БЦЖ и H107e, как описано выше, а контрольные группы иммунизировали H107e/CAF01 или БЦЖ или вводили физиологический раствор. Бактериальную нагрузку оценивали в отдельных легких через 8 недель после заражения штаммом Mtb Эрдмана.

В третьем эксперименте, группы мышей СВ6F1 с БЦЖ-памятью (n=6) иммунизировали 3 раза подкожно 2 мкг H107e или H65 у основания хвоста. Через две недели после последней иммунизации, животных подвергали эвтаназии и получали моноклеточные суспензии путем пропускания паховых лимфатических узлов через клеточные 100 мкм-фильтры. Клетки дважды промывали в RPMI перед стимуляцией антигеном для ICS.

### *Результаты*

После совместной вакцинации с БЦЖ, было подтверждено, что H107e и H107 обладают одинаковой иммуногенностью, как было определено с использованием CD4-T-клеток, экспрессирующих цитокины (фигура 17A, слева), и с помощью ELISA на высвобождение IFN- $\gamma$  (фигура 17A, справа). Также было подтверждено, что H107e индуцирует иммунные ответы на такие же отдельные антигены, как и H107 (фигура 17B). Примечательно то, что делеция в части Rv3876 в H107e приводила к незначительному снижению Rv3876-специфического иммунного ответа, но к усилению иммунных ответов против MPT70 и MPT83 (фигура 17B). После инфицирования, H107e давала защиту, подобную или даже лучше, чем БЦЖ, а совместная вакцинация БЦЖ+H107e приводила к значительному увеличению защиты по сравнению как с БЦЖ, так и с одним H107e (Фигура 17C), как ранее наблюдалось для H107 в Примере 9. У мышей с БЦЖ-памятью, вакцинация H107e (БЦЖ<sup>-</sup>) давала менее дифференцированные CD4-T-клетки (лучшего качества) по сравнению с H65 (БЦЖ<sup>+</sup>), как было определено по показателю функциональной дифференцировки, FDS (фигура 17D). Кроме того, поскольку в течение последнего десятилетия к Th17-клеткам наблюдался повышенный интерес, то предполагается, что Th17-клетки обладают защитными свойствами во время Mtb-инфицирования, а поэтому CD4-T-клетки, экспрессирующие IL-17, оценивали с помощью проточной цитометрии. H107e индуцировала гораздо более высокую долю клеток Th17 по сравнению с H65, что указывает на то, что БЦЖ<sup>-</sup>-вакцины вызывают общий более широкий иммунный ответ, чем традиционные БЦЖ<sup>+</sup>-вакцины у индивидуумов, примированных БЦЖ (фигура 17D).

### *Вывод*

H107e обладает такой же иммуногенностью как и H107 и обеспечивает значительную защиту после заражения Mtb. Как и H107, H107e действует синергически с БЦЖ, и совместная вакцинация БЦЖ+H107e дает уровни защиты, которые значительно

выше, чем у Н107е и БЦЖ, взятых по отдельности. У животных, примированных БЦЖ, вакцинация Н107е (БЦЖ<sup>-</sup>) дает менее дифференцированные Т-клетки (подобно Н107) и увеличивает долю клеток Th17, как было определено с использованием CD4-Т-клеток, экспрессирующих IL-17, по сравнению с Н65 (БЦЖ<sup>+</sup>).

Ссылки на литературу:

WO2010006607 A2

WO2006136162 A2

WO2014063704 A2

WO2015161853 A1

Seder et al (2008), Nat. Rev. Immunol. 8, 247-258.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий по меньшей мере пять антигенов, происходящих от *M. tuberculosis*.

2. Слитый белок по п.1, где слитый белок содержит по меньшей мере шесть антигенов, например, по меньшей мере семь антигенов, например, по меньшей мере восемь антигенов.

3. Слитый белок по любому из пп. 1 или 2, где слитый белок содержит как ранние, так и поздние антигены.

4. Слитый белок по любому из пп. 1-3, где по меньшей мере один антиген не инициирует иммунный ответ против БЦЖ.

5. Слитый белок по любому из пп. 1-4, где антигены делетированы, не секретируются или имеют низкую экспрессию в БЦЖ.

6. Слитый белок по любому из пп. 1-5, где антигены выбраны из:

а) аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) и их вариантов или иммуногенных эпитопов, или

б) аминокислотных последовательностей, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей (а).

7. Слитый белок по любому из пп. 1-6, где слитый белок содержит:

а) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC) и SEQ ID NO:5 (espA) или их варианты или их иммуногенные эпитопы, или

б) аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей (а).

8. Слитый белок по любому из пп. 1-7, где слитый белок содержит:

а) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) или их варианты или иммуногенные эпитопы, или

б) аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей (а).

9. Слитый белок по любому из пп. 5-7, где аминокислотные последовательности б)

по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей (а).

10. Слитый белок по любому из пп. 1-9, где слитый белок содержит по меньшей мере два повтора ESAT-6, например, по меньшей мере три повтора ESAT-6, например, по меньшей мере четыре повтора ESAT-6, например, по меньшей мере пять повторов ESAT-6.

11. Слитый белок по любому из пп. 1-10, где слитый белок содержит по меньшей мере четыре повтора ESAT-6.

12. Слитый белок по любому из пп. 10 или 11, где повторы ESAT-6 разделены по меньшей мере одним антигеном, отличающимся от ESAT-6.

13. Слитый белок по любому из пп. 10-12, где повторы ESAT-6 расположены попеременно с антигенами, отличающимися от ESAT-6.

14. Слитый белок по любому из пп. 1-13, где слитый белок содержит:

а) SEQ ID NO:1 (ESAT-6), SEQ ID NO:2 (PPE68), SEQ ID NO:3 (espI), SEQ ID NO:4 (espC), SEQ ID NO:5 (espA), SEQ ID NO:6 (MPT64), SEQ ID NO:7 (MPT70) и SEQ ID NO:8 (MPT83) или их варианты или иммуногенные эпитопы, или

б) аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей (а), и

где слитый белок содержит четыре повтора ESAT-6, расположенные попеременно с антигенами, отличающимися от ESAT-6.

15. Слитый белок по любому из пп. 1-14, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, представленную любой последовательностью, выбранной из группы, состоящей из:

а) SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 или SEQ ID NO:91 или их вариантов или иммуногенных эпитопов; или

б) аминокислотных последовательностей, которые по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентичны любой из аминокислотных последовательностей (а).

16. Слитый белок по любому из пп. 1-15, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 91.

17. Слитый белок по любому из пп. 1-16, где слитый белок кодируется последовательностями нуклеиновых кислот, выбранными из группы, состоящей из:

а) SEQ ID NO:54 (H107), SEQ ID NO:79 (H107b), SEQ ID NO:80 (H107c), SEQ ID

NO:92 (H107e) SEQ ID NO:81 (H106), SEQ ID NO:82 (H105) и SEQ ID NO:83 (H104), или их вариантов или фрагментов; или

b) последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a).

18. Слитый белок по любому из пп. 1-17, где антигены слитых белков связаны с линкерной молекулой.

19. Слитый белок по любому из пп. 1-18, где слитый белок содержит по меньшей мере один антиген, который запускает иммунный ответ против БЦЖ.

20. Слитый белок по любому из п.19, где по меньшей мере один антиген, который инициирует иммунный ответ против БЦЖ, выбран из:

a) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:10 (Ag85b), SEQ ID NO:11 (Ag85a), SEQ ID NO:12 (TB10.4), SEQ ID NO:13 (EsxG), SEQ ID NO: 14 (PPE60), SEQ ID NO:15 (HbHA), SEQ ID NO:16 (EsxC), SEQ ID NO:17 (EsxD), SEQ ID NO:18 (CanA), SEQ ID NO:19 (EsxR), SEQ ID NO:20 (EsxS), SEQ ID NO:21 (EsxQ), SEQ ID NO:22 (HspX), SEQ ID NO:23 (PepD), SEQ ID NO:24 (PPE18), SEQ ID NO:25 (PPE42), SEQ ID NO:26 (EsxV) и SEQ ID NO:27 (EsxW) и их вариантов или иммуногенных эпитопов, или

b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98%, например, по меньшей мере на 99% идентична любой из аминокислотных последовательностей (a).

21. Вакцина или иммуногенная композиция, содержащая слитый белок по любому из пп. 1-20.

22. Вакцина или иммуногенная композиция по п.21, где вакцина или иммуногенная композиция дополнительно содержит один или более адъювантов.

23. Вакцина или иммуногенная композиция по п.22, где адъюванты выбраны из группы, состоящей из составов с нейтральным адъювантом, составов с анионным адъювантом, составов с катионным адъювантом, катионных липосом (например, бромида диметилдиоктадециламмония (DDA)), Quil A, QS21, поли-И:С, гидроксида алюминия, неполного адъюванта Фрейнда, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, монофосфориллипида А (MPL), димиколята трегалозы (TDM), дибегената трегалозы (TDB), мурамилдипептида (MDP), мономиколилглицерина (MMG), CpC и «IC31» или их комбинаций.

24. Вакцина или иммуногенная композиция по любому из пп. 21-23, где вакцина или иммуногенная композиция дополнительно содержит БЦЖ.

25. Слитый белок по любому из пп. 1-20 или вакцина или иммуногенная композиция по любому из пп. 21-24 для применения в целях вакцинации или

иммунизации индивидуума против инфекций и/или заболеваний, вызываемых вирулентной микобактерией.

26. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения по п.25, где индивидуумом является млекопитающее.

27. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения по п.26, где млекопитающим является человек.

28. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения по любому из пп. 25-27, где вирулентная микобактерия выбрана из группы, состоящей из *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* и *M. microti*, а предпочтительно *M. tuberculosis*.

29. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения по любому из пп. 25-28, где БЦЖ вводят до, во время или после введения слитого белка, вакцины или иммуногенной композиции.

30. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения по п.29, где БЦЖ вводят одновременно с введением слитого белка, вакцины или иммуногенной композиции.

31. Слитый белок, вакцина или иммуногенная композиция для применения по любому из пп. 25-30, где индивидуум ранее был вакцинирован БЦЖ.

32. Набор, включающий:

i) Слитый белок по любому из пп. 1-20 или вакцину или иммуногенную композицию по любому из пп. 21-24,

ii) БЦЖ и

III) необязательно, инструкции по применению.

33. Набор по п.32, где i) и ii) предназначены для одновременного, раздельного или последовательного введения.

34. Последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую слитый белок по любому из пп. 1-20.

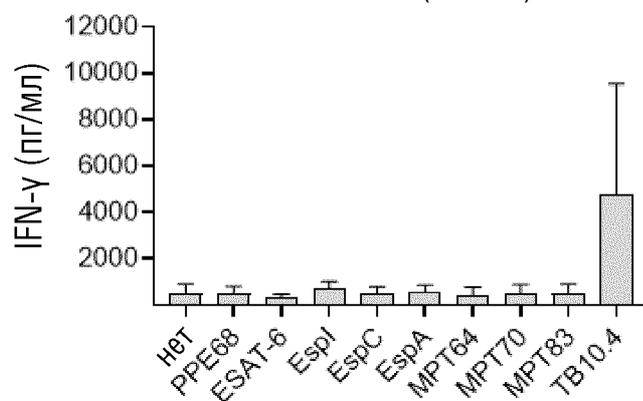
35. Рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность по п.34, функционально связанную с одной или более регуляторными последовательностями, подходящими для регуляции продуцирования слитого белка в подходящем хозяине.

36. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п.35.

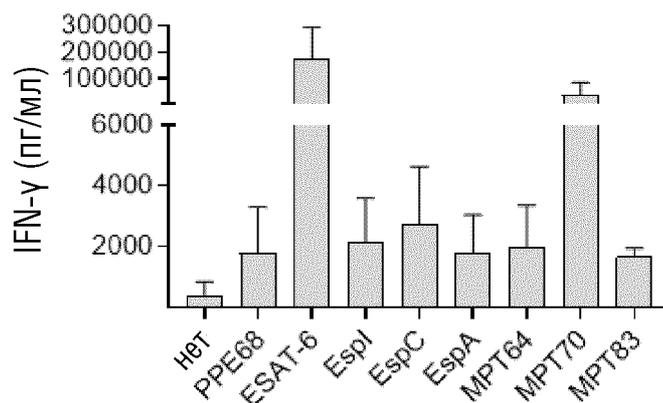
По доверенности

1/17

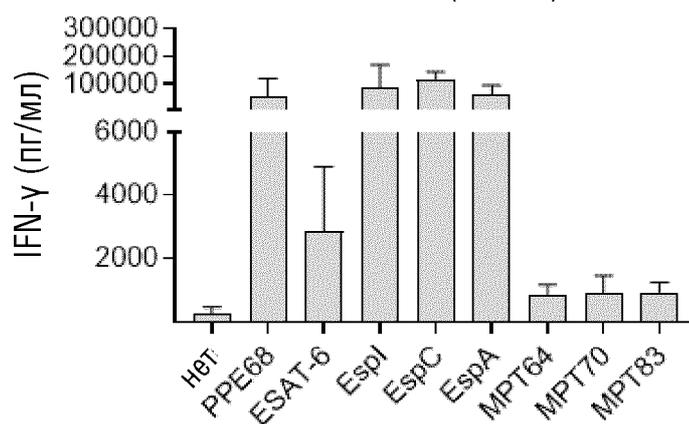
ФИГ.1А-С

**А** БЦЖ-иммунизированные животные (СВ6F1)

Антиген для рестимуляции

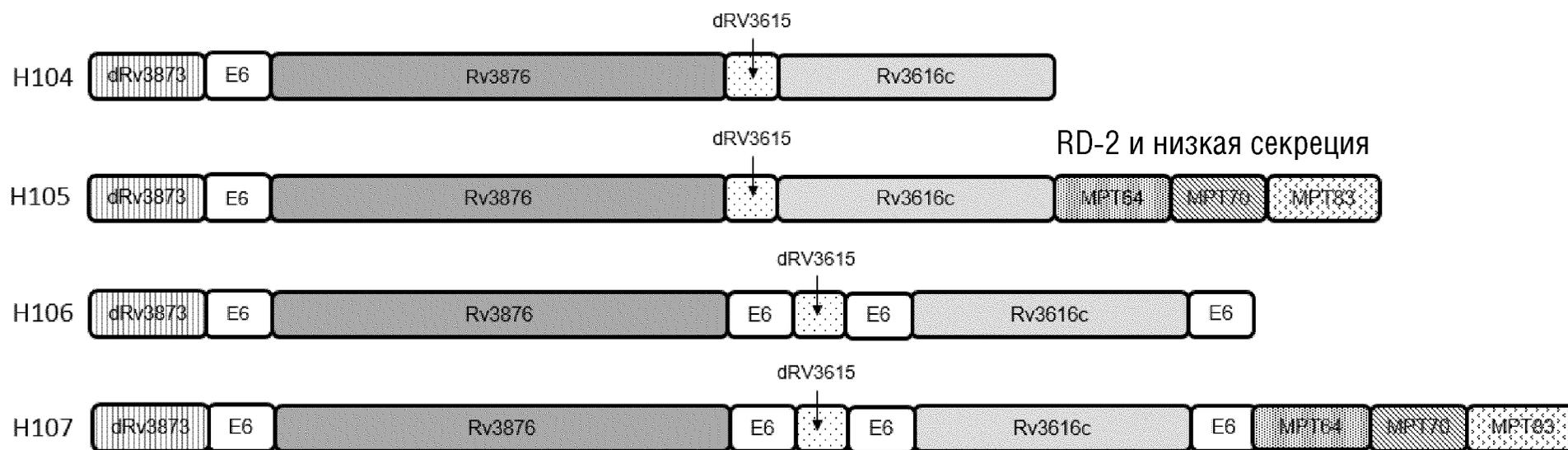
**В** Mtb-инфицированные животные на неделю 18 (СВ6F1)

Антиген для рестимуляции

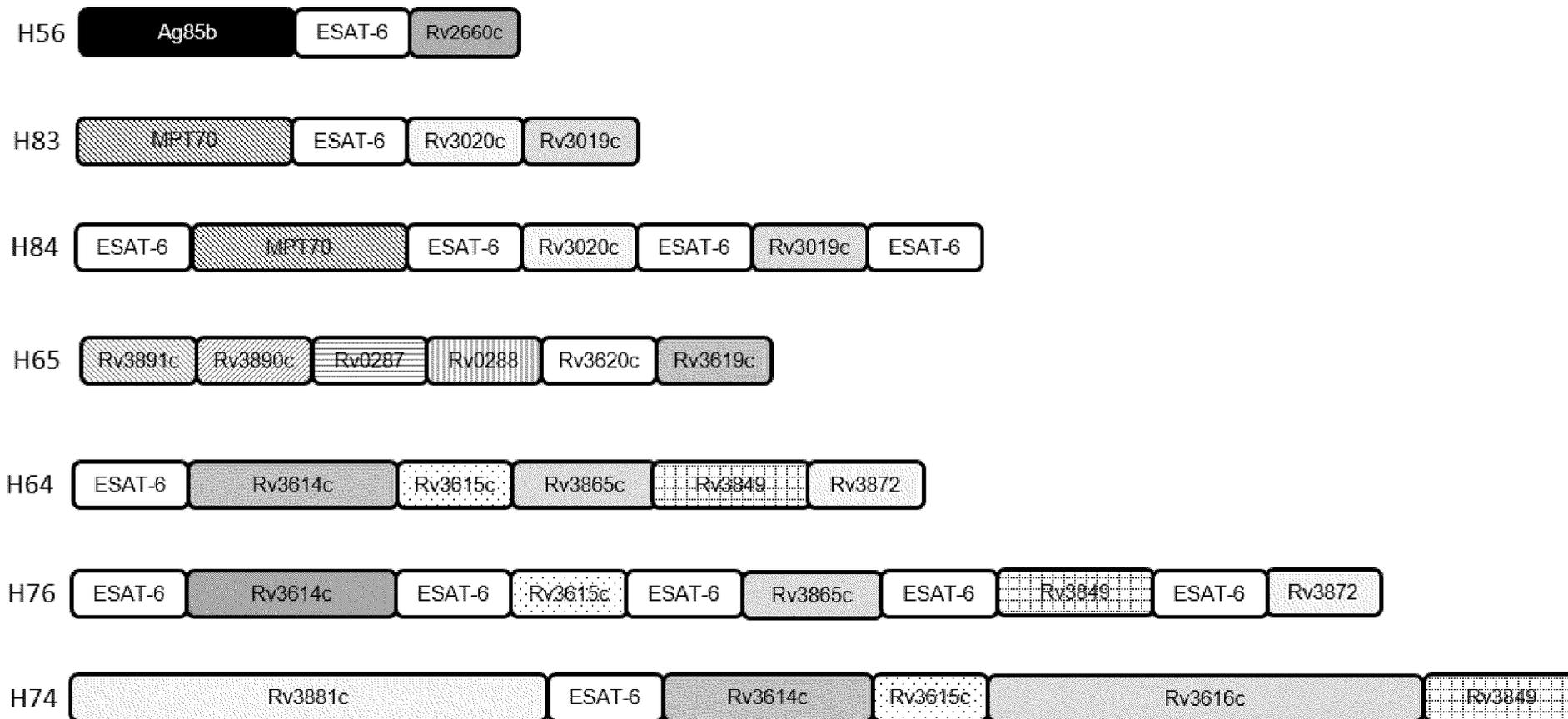
**С** Иммунизированные белком животные (СВ6F1)

Антиген для рестимуляции

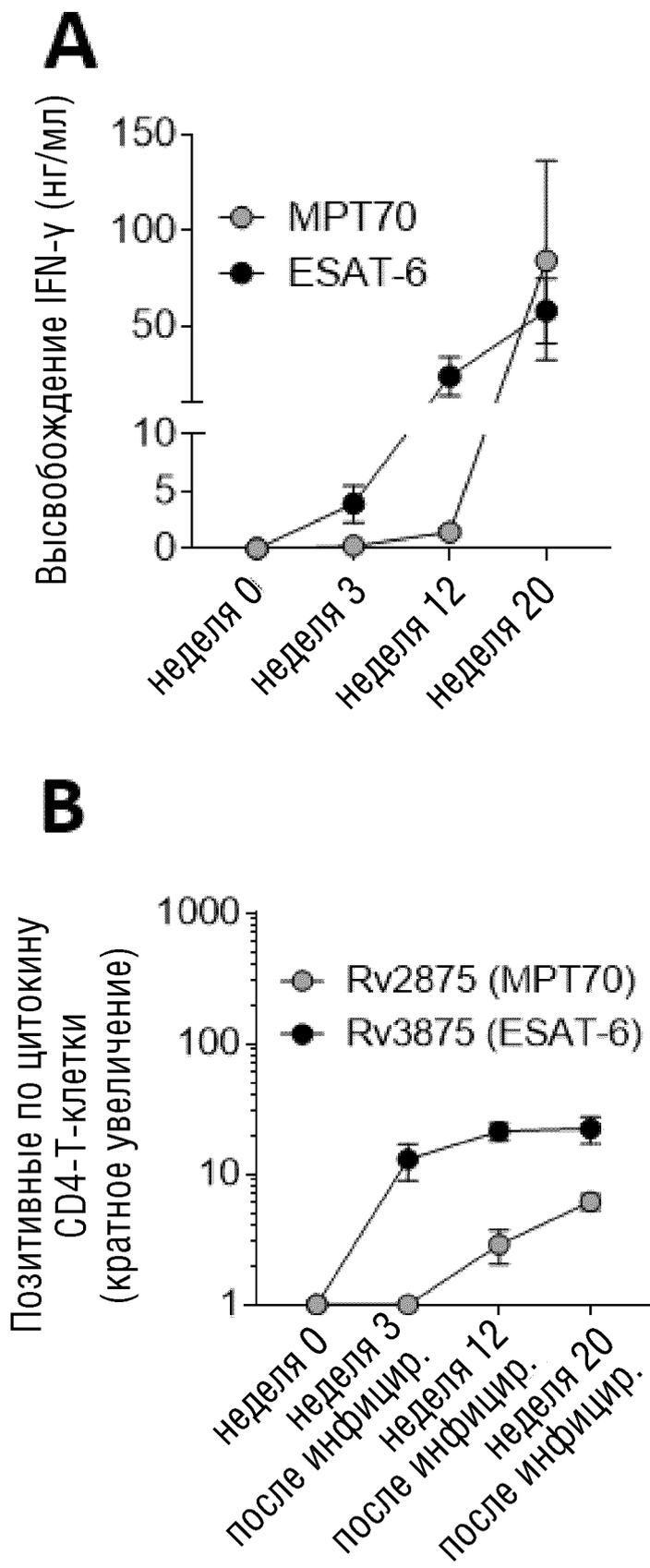
ФИГ.2



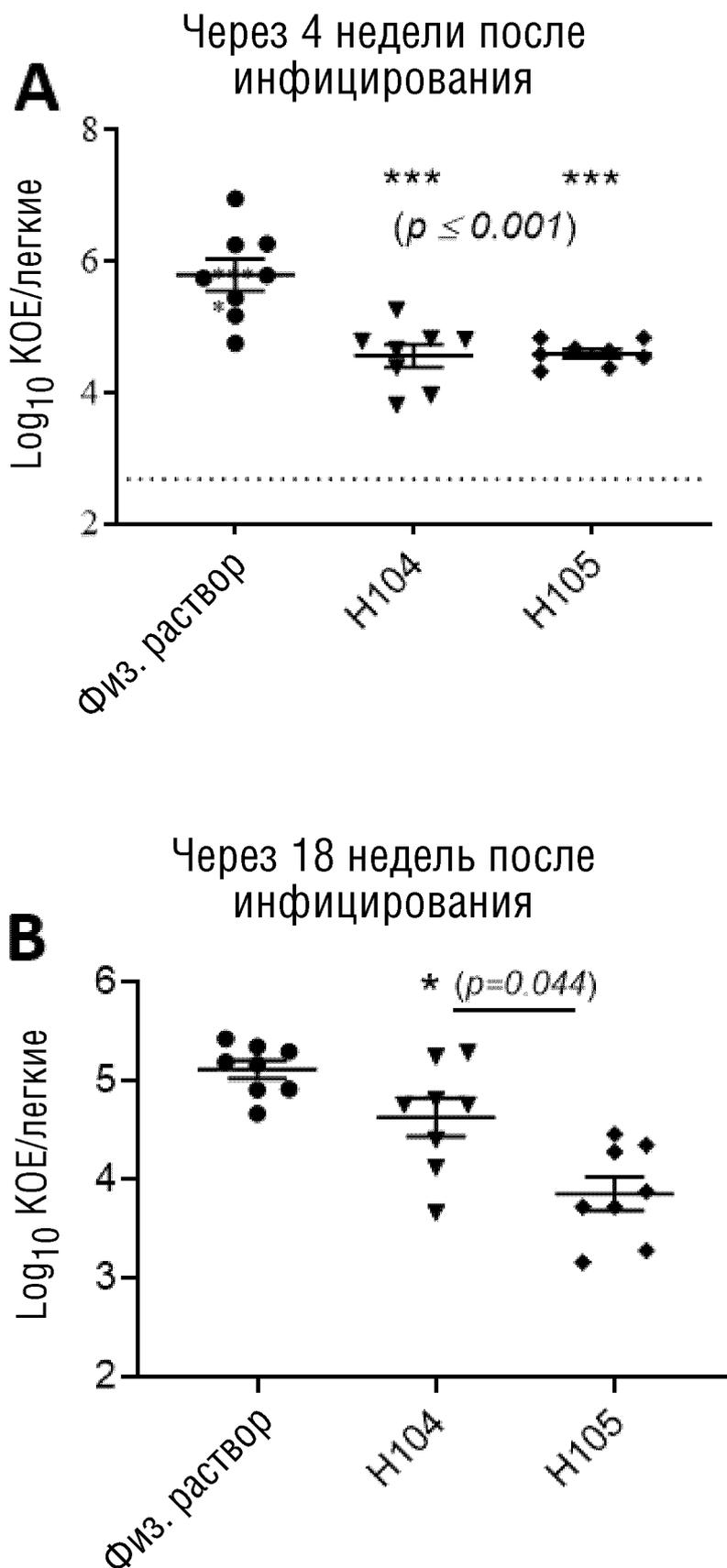
# Фиг.3



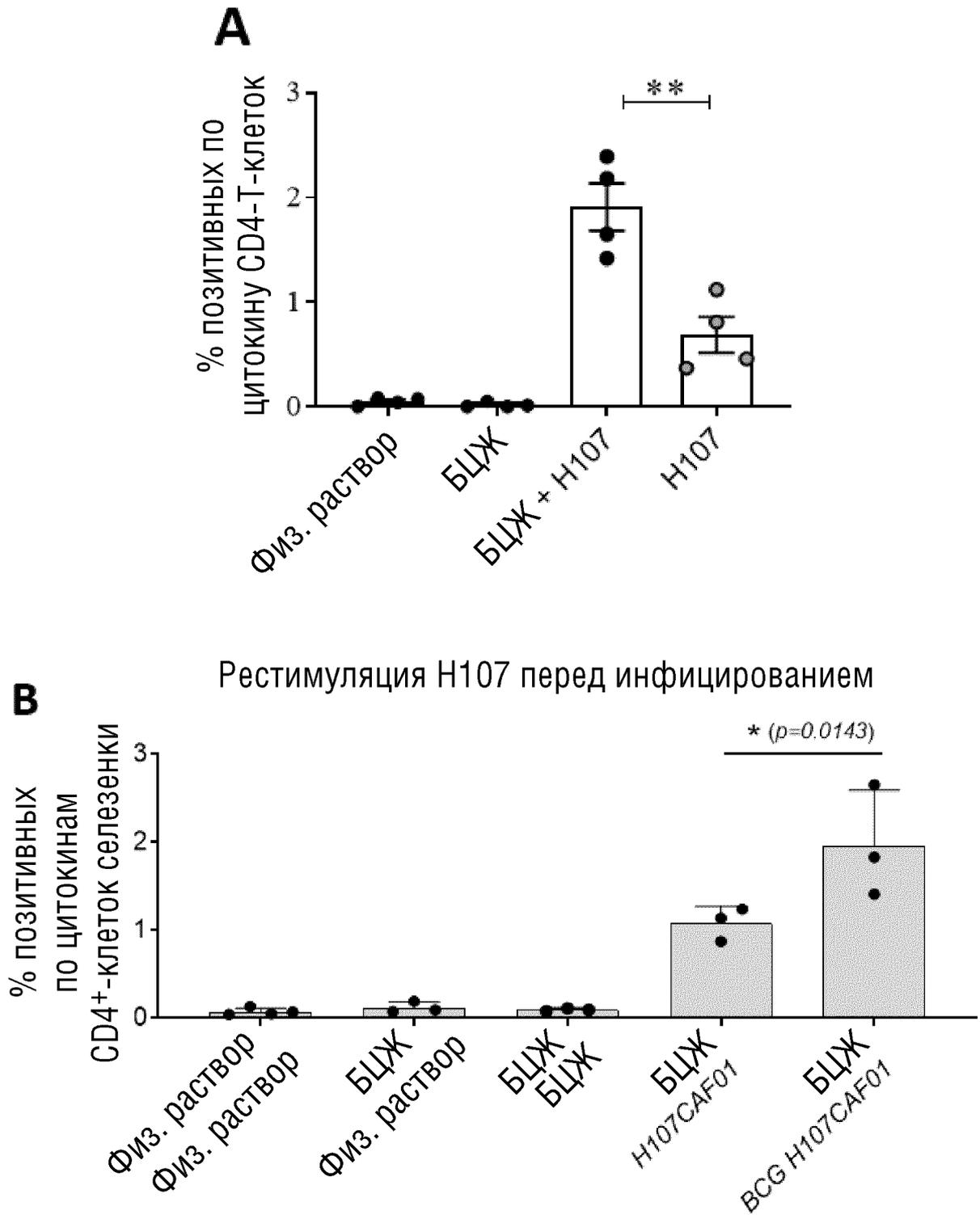
ФИГ.4А-В



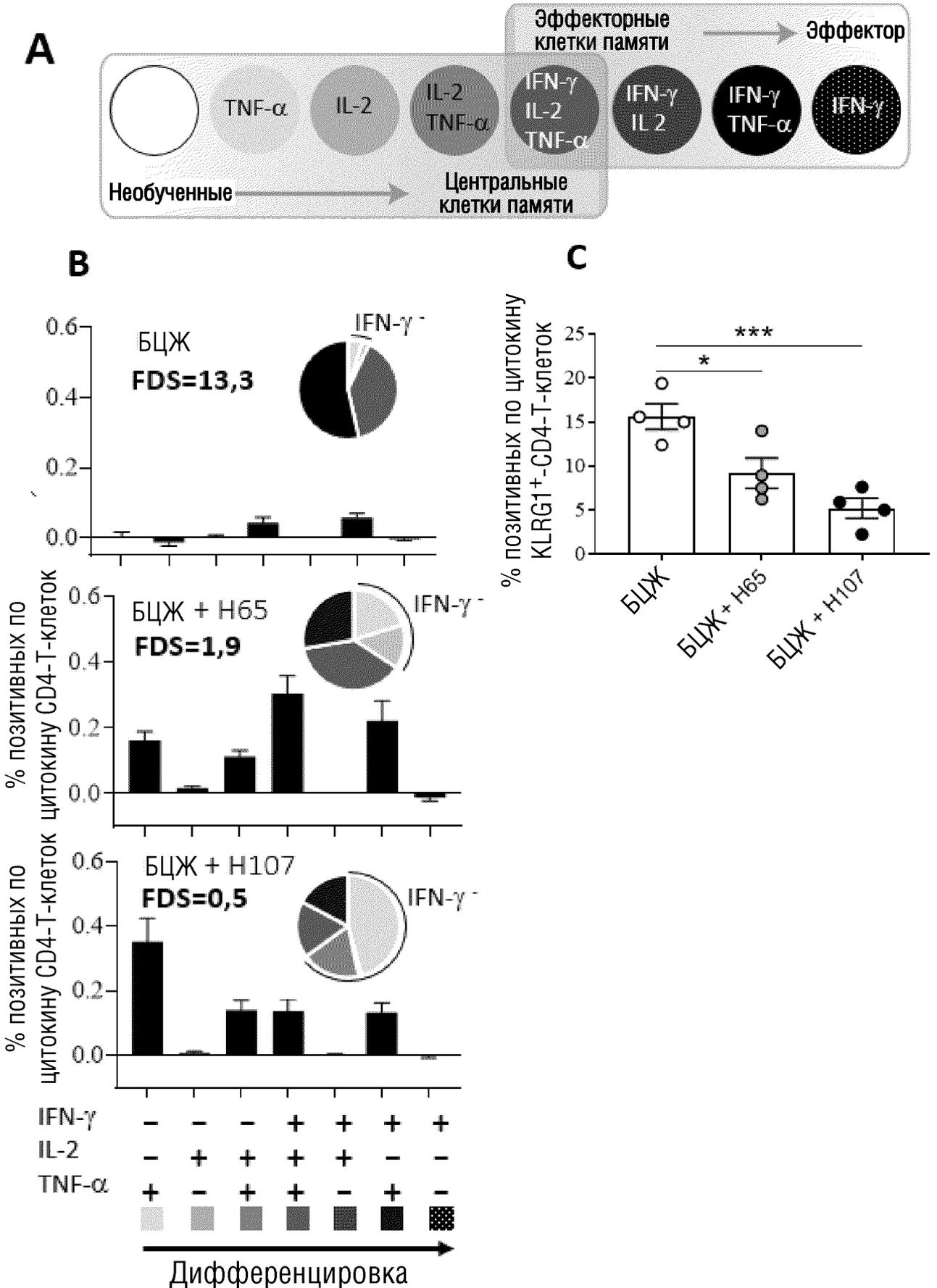
ФИГ.5А-В



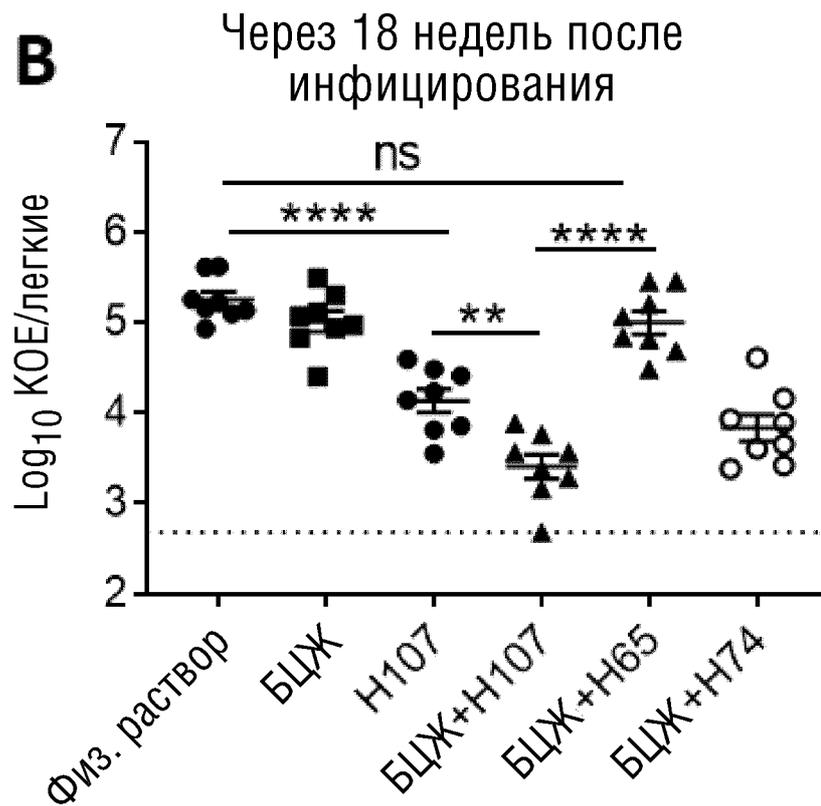
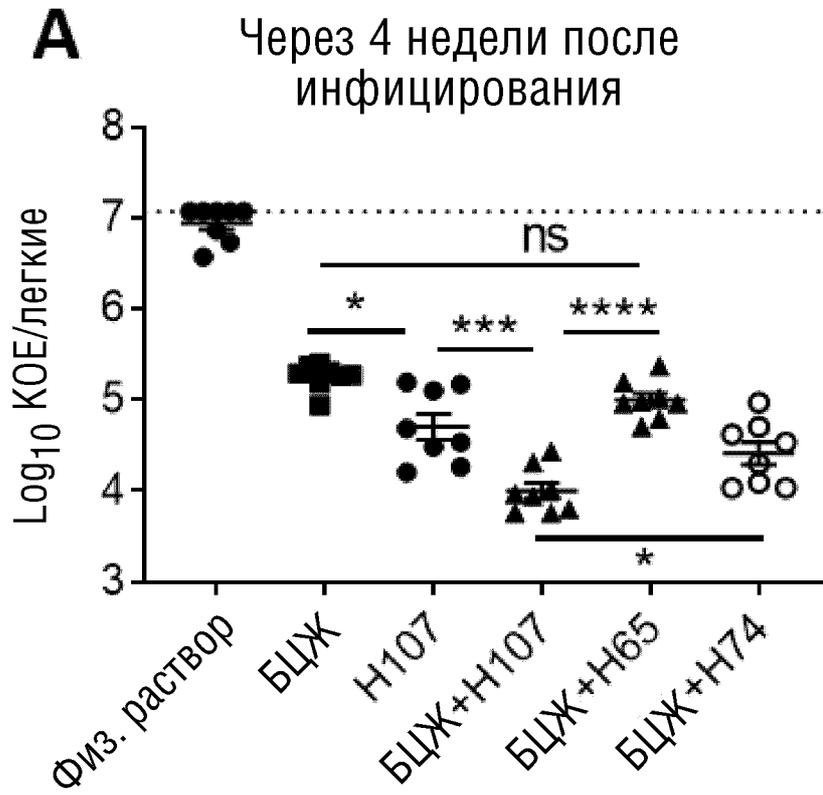
ФИГ.6А-В



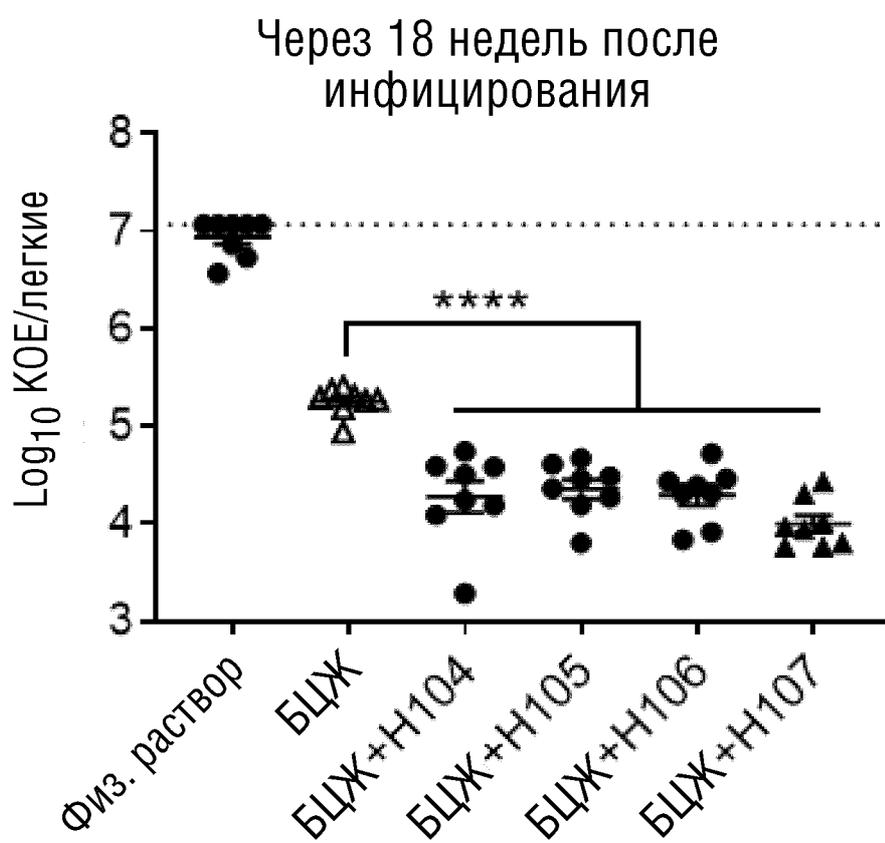
ФИГ.7А-С



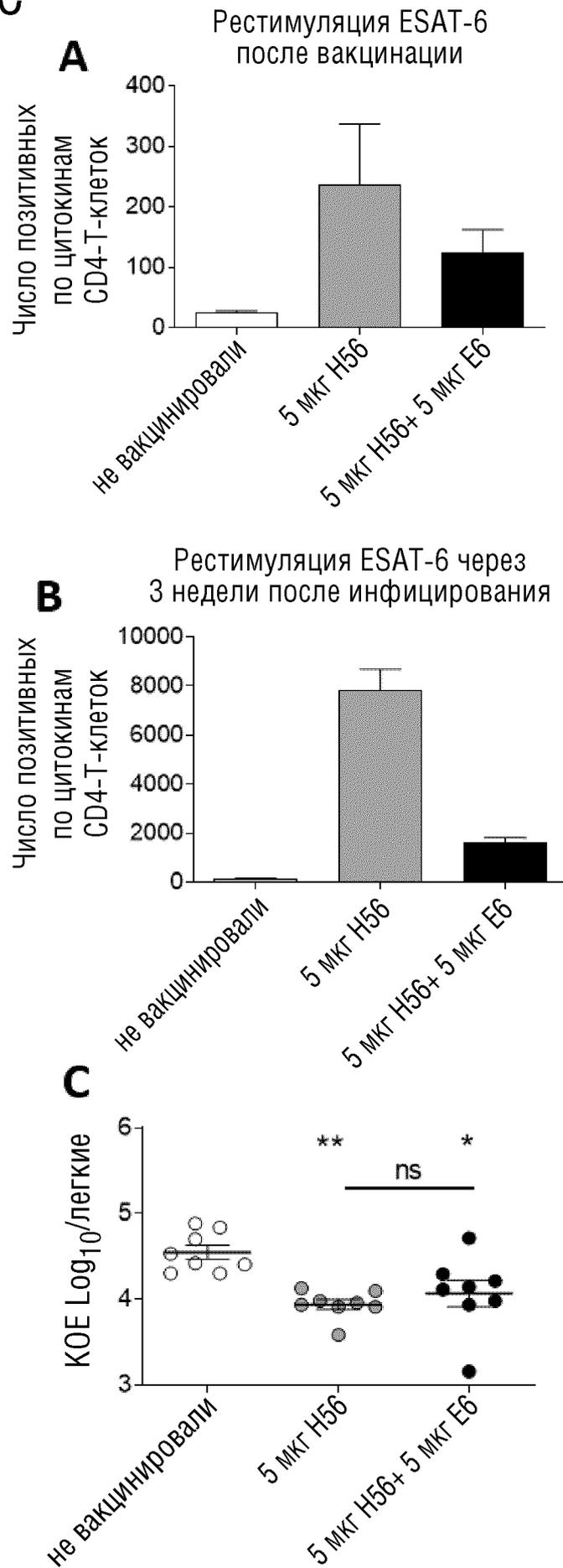
ФИГ.8А-В



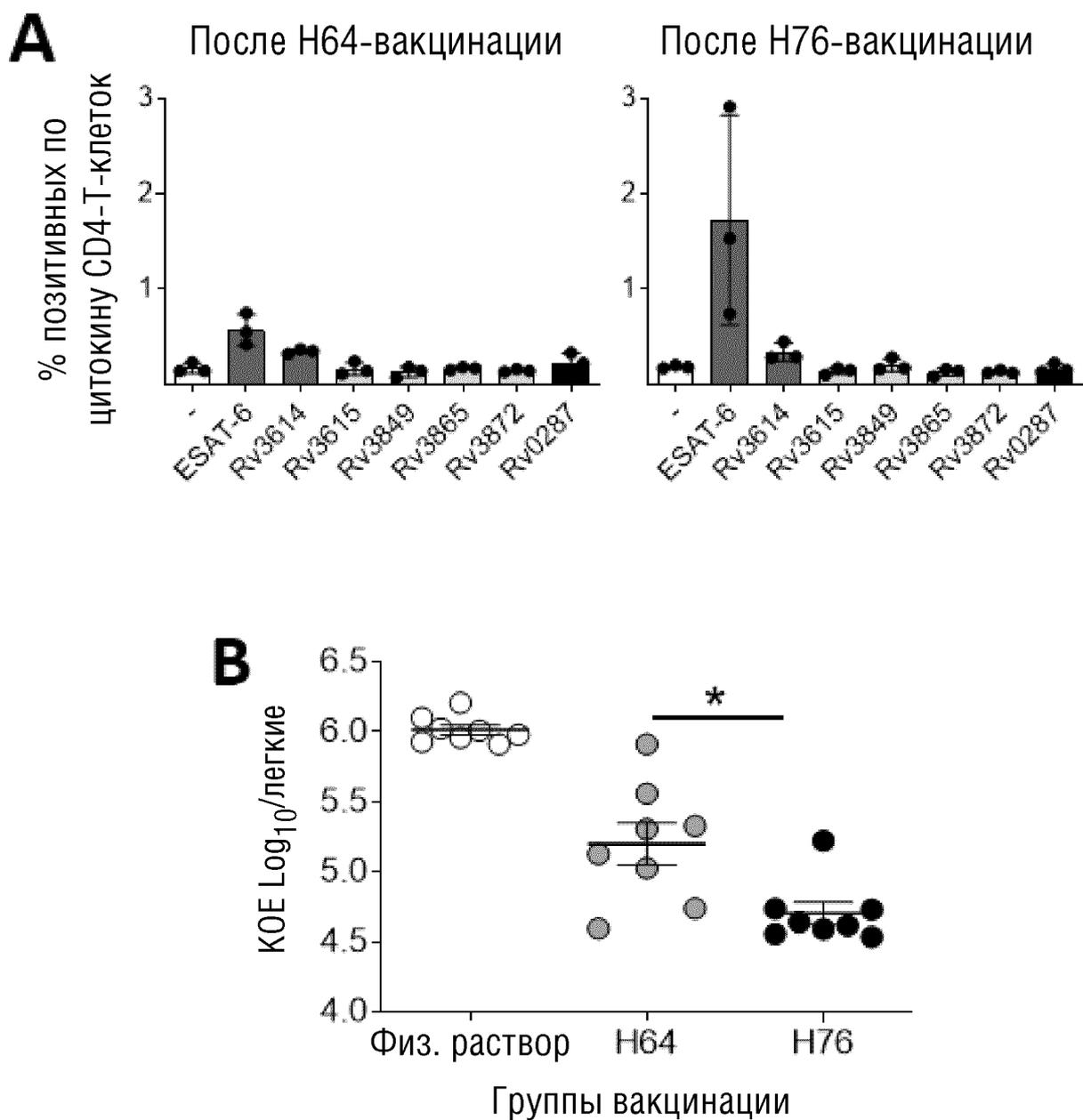
ФИГ.9



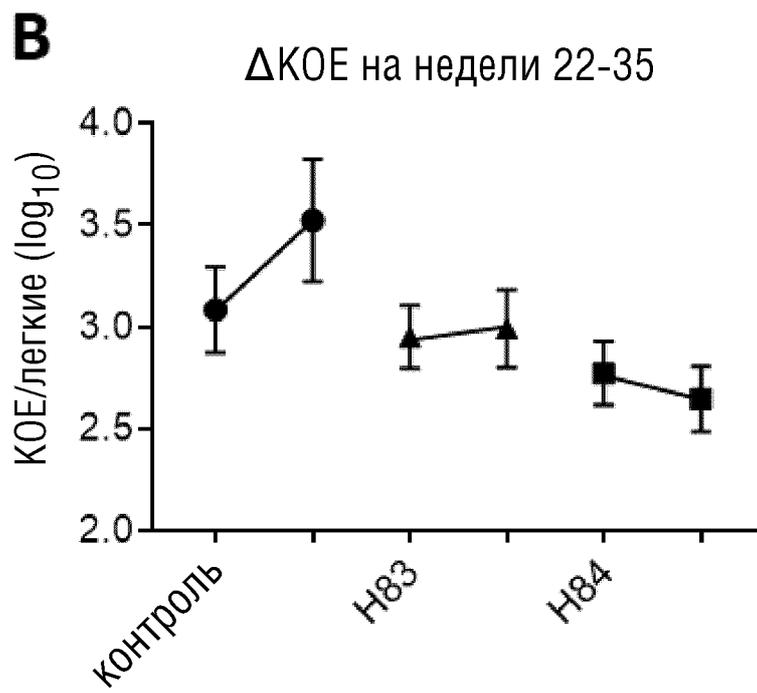
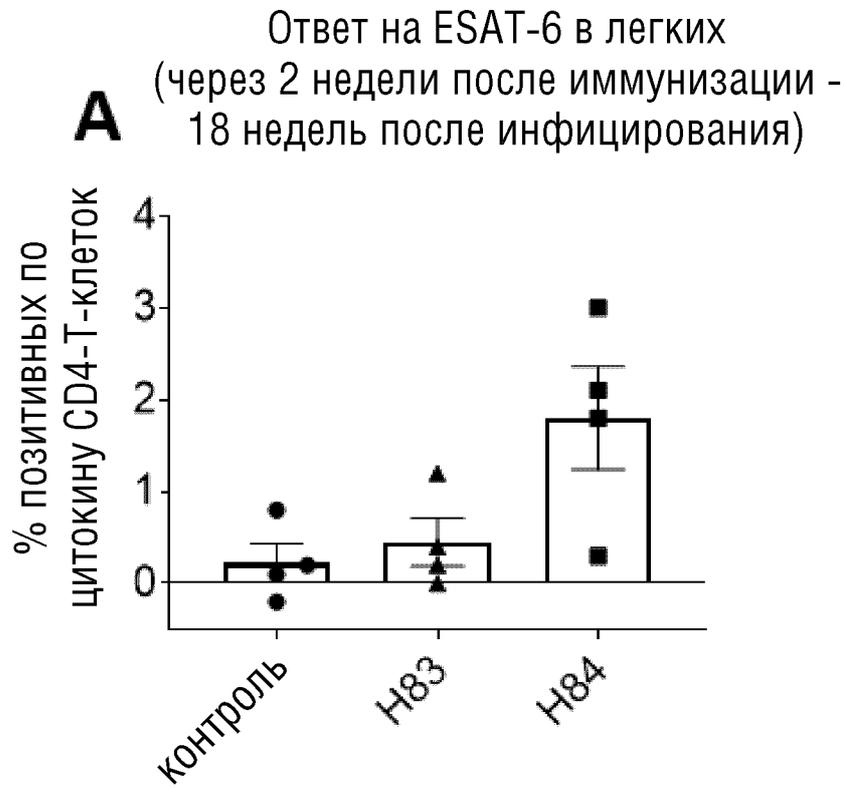
ФИГ.10А-С



ФИГ.11А-В

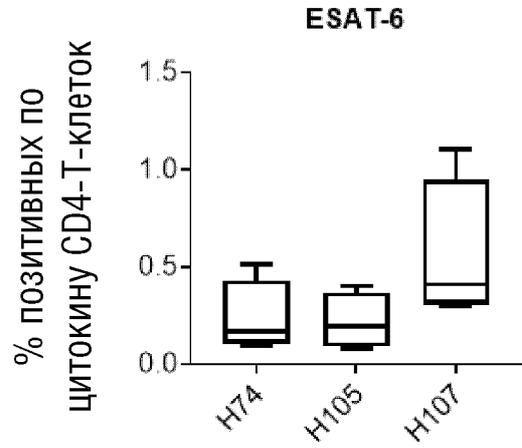


## ФИГ.12А-В

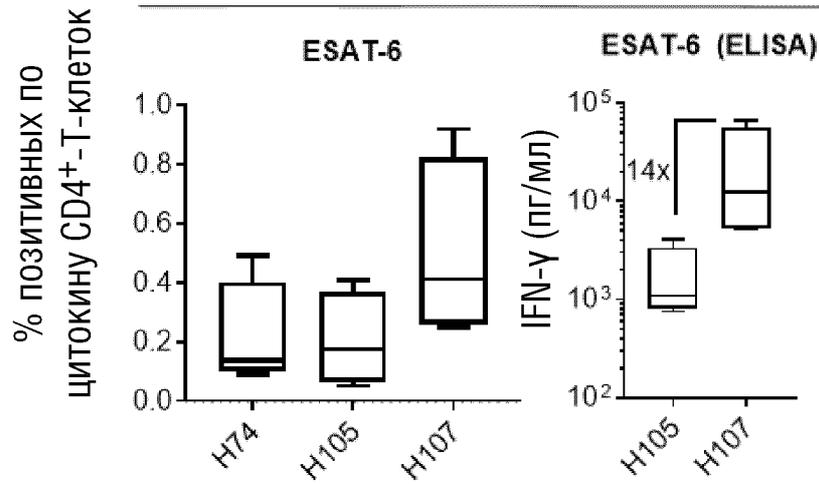


ФИГ.13А-С

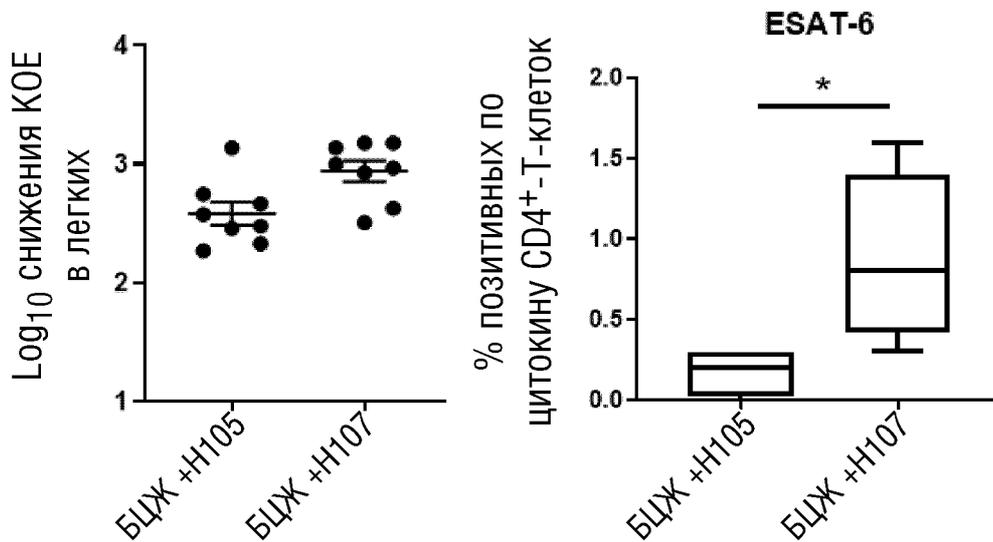
**A** (129sv)



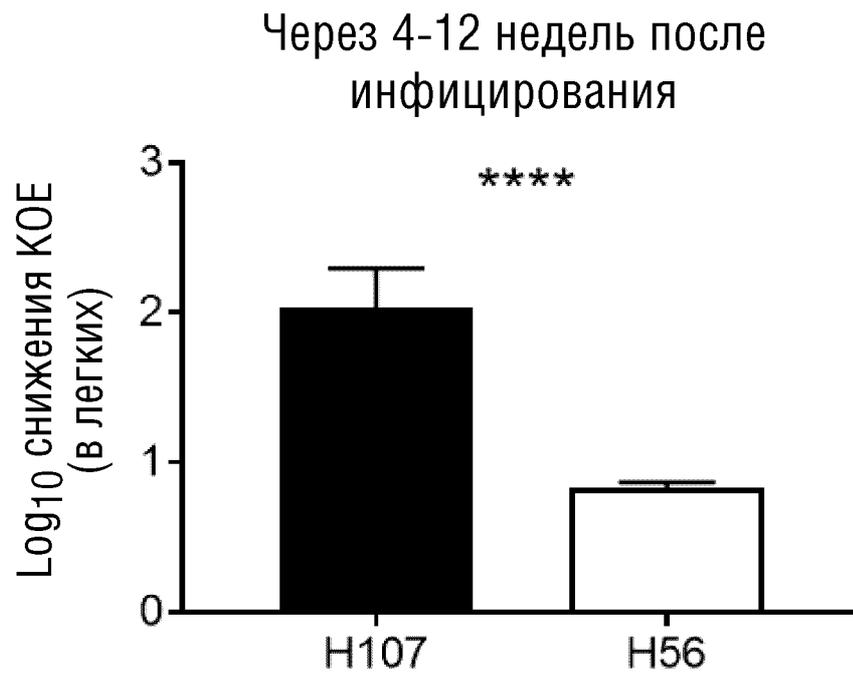
**B** (CB6F1)



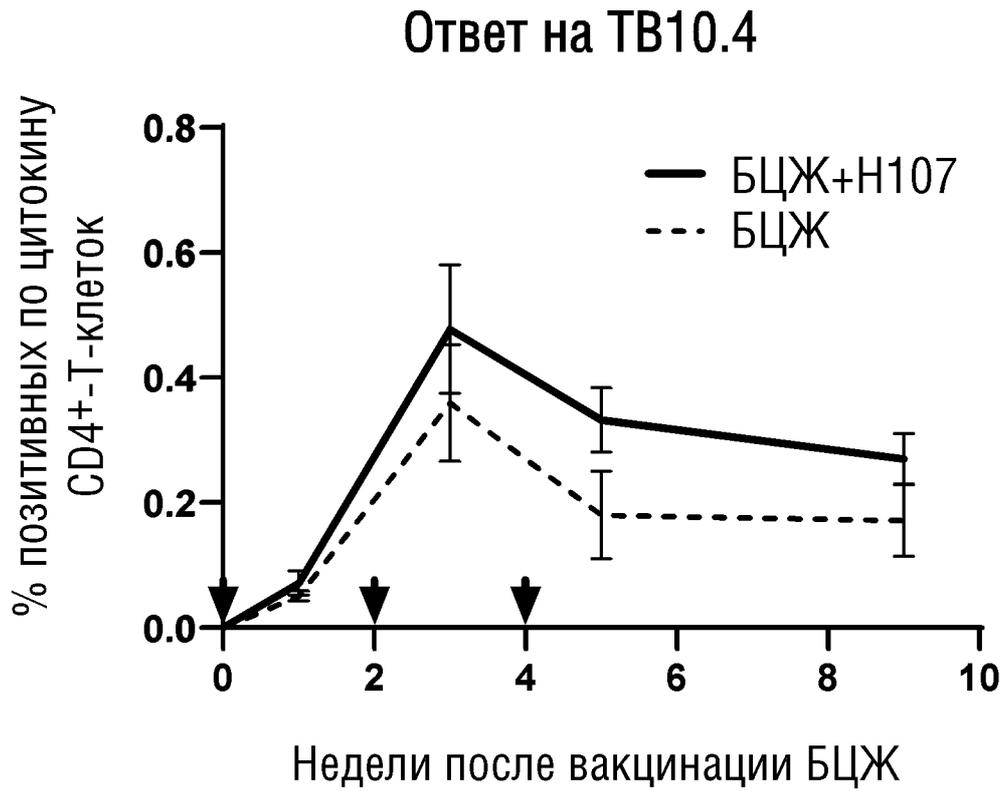
**C**



ФИГ.14

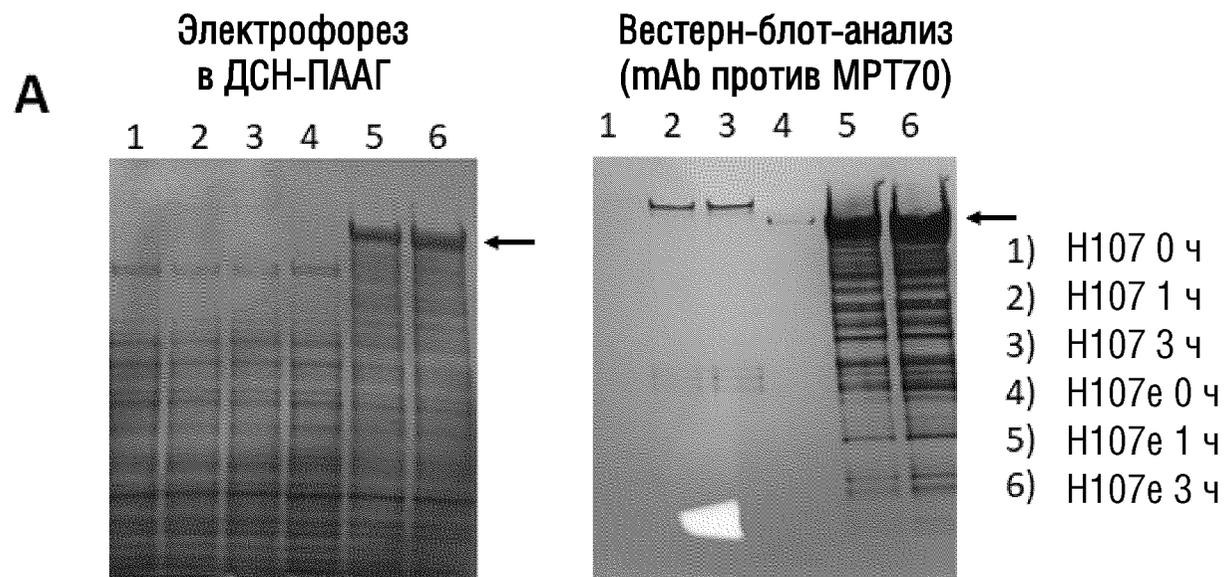
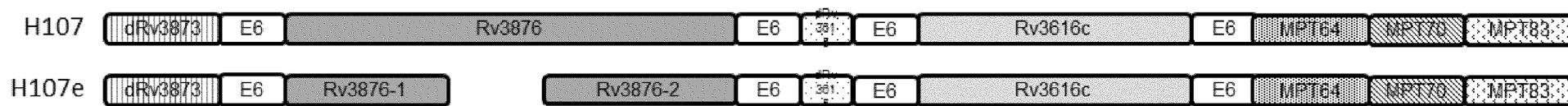


ФИГ.15



# ФИГ.16

H107e имеет повышенную экспрессию по сравнению с H107



# ФИГ.17

H107e обладает такой же иммуногенностью как и H107 и действует синергически с БЦЖ

