

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201691091 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.12.30

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

(22) Дата подачи заявки
2014.12.15

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

(31) РА 2013 00698

(32) 2013.12.16

(33) DK

(86) PCT/DK2014/000062

(87) WO 2015/090322 2015.06.25

(71) Заявитель:

СТАТЕНС СЕРУМ ИНСТИТУТ (DK)

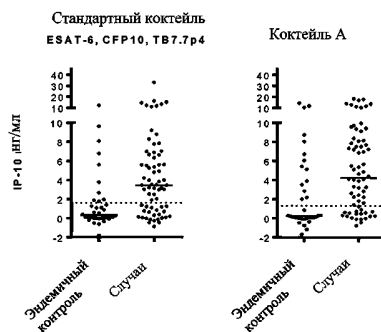
(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Поликарпов А.В. (RU)

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



A1

201691091

201691091

A1

Диагностические реагенты для улучшенной *in vivo* или *in vitro* клеточно-опосредованной иммунологической диагностики туберкулеза

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

Предпосылки изобретения

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

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

быстрая и точная диагностика инфекции *M.tuberculosis* является важным элементом мероприятий по охране здоровья в мире с целью контроля заболевания.

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

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

Инфекция *M.tuberculosis* опосредует выраженный клеточно-опосредованный иммунный (СМІ) ответ и выявление иммунных клеток и любого продукта, происходящего из таких клеток, которые образуются как часть специфического ответа на инфекцию *M.tuberculosis*, было бы подходящим способом для выявления инфекции (Andersen, 2000). Для того, чтобы получить такой специфический ответ, реагент должен 1) широко распознаваться инфицированными *M.tuberculosis* индивидами, и 2) быть специфич-

ческим в отношении *M.tuberculosis*, тем самым разграничивая инфекцию ТВ, вакцинацию BCG и воздействие нетуберкулезных микобактерий среды.

- Геном *M.tuberculosis* предполагает 4018 открытых рамок считывания
- 5 (<http://tuberculist.epfl.ch/>, выпуск R27 - март 2013 г.). Однако, лишь незначительная часть из них представляет собой Т-клеточные антигены с выраженным и широким распознаванием мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС) от пациентов-людей с ТВ. Были разработаны алгоритмы для прогноза эпитопов Т-клеток, однако необходима экспериментальная проверка для идентификации иммунодоминантных антигенов CFP10 и ESAT-6. Внеклеточные белки или белки культурального
- 10 фильтрата (CF) *M.tuberculosis* составляют белковую фракцию, обогащенную Т-клеточными антигенами,(Andersen 1994) и разделение белков CF при помощи подхода на основе двухмерной протеомики привело к идентификации 59 Т-клеточных антигенов человека, из которых 35 были описаны ранее (Deenadayalan, 2010). Хотя перечень
- 15 может быть и не исчерпывающим, он подчеркивает, что лишь небольшая часть из примерно 900 белков CF (Albrethsen, 2013) представляет собой Т-клеточные антигены. По логике следует ожидать, что наиболее иммунодоминантные антигены, кодируемые геномом *M.tuberculosis*, представляли ли бы подмножество с наибольшей экспрессией и при помощи используемых в настоящее время технологий было бы возможным ранжировать гены в соответствии с уровнями транскрипции при определенных условиях
- 20 роста. Однако, вклад, который уровень транскрипции вносит в иммуногенность, является невысоким и его нельзя использовать систематически для точного определения того, какие гены кодируют релевантные антигены (Sidders, 2008).
- 25 Кандидата для высокоспецифичного реагента можно было бы искать среди антигенов из участков RD (участки делеции) генома *M.tuberculosis*. Эти участки представляют геномные делеции из штамма *M. bovis* для вакцины BCG по отношению к вирулентному штамму *M.tuberculosis* (Behr, 1999). Таким образом, теоретически, белки, из этих участков (белки RD), были бы отличными кандидатами в качестве диагностических
- 30 реагентов ТВ, т.е. они не распознавались бы здоровыми неинфицированными индивидами независимо от их статуса вакцинации BCG или воздействия непатогенных микобактериальных штаммов. Однако, из всех прогнозируемых геномных ORF (открытых рамок считывания), удаленных из BCG, по сути неизвестно, какие фактически экспрессируются в виде белков и, кроме того, иммунореактивность остается неизвестной

до испытания сенсibilизированными лимфоцитами от индивидов с *M.tuberculosis*. Это можно выполнить, например, при анализе цельной крови, рестимуляцией РВМС или инъекцией в кожу веществ, подобных тем, которые вводят в пробе РРД/Манту. Например, при оценке Rv3872 были показаны небольшие ответы интерферона гамма (IFN- γ) у испытуемых пациентов-людей с ТВ (n=7) через 1-4 месяца после постановки диагноза (WO 99/24577), указывающие на то, что этот белок RD часто не распознается, а Rv3872, таким образом, далее не исследовался в качестве диагностического теста на основе СМІ.

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

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

ного микобактериального белка, который мог объяснить наблюдаемую перекрестную реактивность (Aagaard, 2004).

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

Диагностический потенциал CFP10 (Rv3874), ESAT-6 (Rv 3875), двух низкомолекулярных белков из участка RD1 и TB7.7 (Rv2654) очень хорошо описан (Brook, 2004; Moon, 2013, WO2004099771) и в настоящее время используется в различных диагностических реагентах, зарегистрированных для применения у человека. Пептиды, включающие CFP10 и ESAT-6, используются в тесте T-SPOT®.TB, который представляет собой исследование клеток крови, которое выявляет иммунный ответ Т-клеток, обнаруженных в PBMC, которые были рестимулированы ESAT-6 и CFP10. Этот ответ выявляется при помощи высокочувствительного метода иммуноферментных пятен, обозначаемого ELISPOT, и коммерциализированного в виде теста T-SPOT.TB. Этот тест является высокочувствительным и независимым от статуса вакцинации BCG.

Другим зарегистрированным тестом для выявления инфекции *M.tuberculosis*, является QuantiFERON®-TB Gold, который представляет собой технологию диагностики *in-vitro*, которая позволяет выявлять иммунные ответы в образцах цельной крови при рестимуляции пептидами, включающими ESAT-6, CFP10 и один пептид из TB7.7. Оба из этих тестов измеряют продукцию интерферона-гамма (IFN- γ) в ответ на воздействие пулов селективных специфических антигенных пептидов и в настоящее время считаются самыми современными. Тест T-SPOT.TB и QuantiFERON®-TB в целом признаются в виде анализов высвобождения IFN- γ (IGRA).

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

диагностическими возможностями, сопоставимыми с анализами высвобождения IFN- γ (Ruhwald, 2009).

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

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

Другой очень релевантной группой для целевого тестирования являются дети. Диагностика латентной инфекции ТВ (LTBI) и ТВ у детей является затруднительной, микробиологическое подтверждение инфекции часто не получают и лечение направлено лишь на клинические проявления. Как у активно, так и предположительно латентно инфицированных маленьких детей, иммунная система является незрелой, и это является вероятной причиной меньшего высвобождения цитокинов и нарушенным проведением IGRA. Недавно было показано, что тест QuantiFERON[®]-TB Gold характеризу-

вался чувствительностью 53% у 81 ребенка с микробиологически подтвержденным ТВ, указывая на потребность в улучшенных иммунодиагностических тестах инфекции *M.tuberculosis* у детей (Schopfer, 2013).

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

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

Моделирующие исследования указывают на то, что без новых вакцин ТВ невозможно уничтожить, а новые и более эффективные вакцины представляют собой международ-

ный приоритет. Общая идея заключается в том, чтобы дополнить используемую в настоящее время вакцину BCG бустерной субъединичной вакциной или создать новую живую вакцину против ТВ для замещения BCG. В клинической разработке имеется возрастающее число экспериментальных вакцин и перспективным общим мнением является то, что ESAT-6, по-видимому, является необходимым антигеном вакцины. Таким образом, многие из новых вакцин, находящихся в настоящее время на доклиническом этапе или в клинических испытаниях, содержат ESAT-6. Недавно, фонд Aeras анонсировал первое испытание на человеке содержащей ESAT-6 вакцины, разработанной для защиты людей, уже латентно инфицированных ТВ, от развития активной формы болезни ТВ (Aagaard, 2011). Некоторые кандидаты для живых вакцины также разработаны непосредственно рекомбинантными инженерными методами с целью экспрессии ESAT-6, например, rBCG:GE (Yang, 2011), rM.S-e6c10 (Zhang, 2010), Salmonella/Ag85B-ESAT-6 (Hall, 2009), rBCG-A(N)-E-A(C) (Xu, 2009) или слитые белки, включающие ESAT-6, например, H1 (van Dissel, 2010; van Dissel, 2011). К сожалению, применение диагностических средств на основе ESAT-6 в тесте IGRA и вакцинация содержащей ESAT-6 вакциной, является точным повторением проблемы перекрестной реакции, связанной с параллельным применением TST и BCG.

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

В EP2417456 описана такая система, где применение Rv3615c совместно с CFP-10 обеспечивает диагностическую чувствительность, которая очень похожа с комбинацией ESAT-6/CFP-10.

Поскольку уникальные характеристики ESAT-6 являются высокоиммуногенными и специфическими для инфекции *M.tuberculosis*, маловероятно, что замещение ESAT-6

одним антигеном повысит чувствительность по сравнению с ESAT при изучении различных популяционных групп. Это было продемонстрировано, например, Brock и др., которые показали, что распознавание одних антигенов составляло 14-43% у пациентов с TB по сравнению с ESAT-6, который давал ответ у 75% в той же группе пациентов.

5 Учитывая, что большинство антигенов являются менее иммуногенными по сравнению с ESAT-6, более вероятно, что необходим пул антигенов для ответов более высокой величины и улучшенной диагностической чувствительности.

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

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

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

- а) Большинство (>99%) антигенов в отношении генома TB являются неспецифическими и общими у различных микобактериальных видов, поэтому иденти-

фикация значительно распознаваемых антигенов, которые являются специфическими для *Mycobacterium tuberculosis*, была очень сложной

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

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

15 **Краткое описание изобретения**

20 Настоящее изобретение относится к улучшенному выявлению инфекций, вызываемых видами ТВ комплекса (*M.tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), и разграничению инфекции ТВ и вакцинации. Улучшенная диагностическая композиция не должна нарушать эффекта антигенов из 1) новой содержащей ESAT-6 вакцины против ТВ, 2) BCG или 3) от воздействия непатогенных микобактерий среды. Настоящее изобретение раскрывает улучшенные диагностические или иммуногенные композиции, которые можно использовать либо *in vivo*, либо *in vitro*, для выявления клеточного ответа на инфекцию *M.tuberculosis* и, тем самым, использовать для диагностики ТВ. Используя

25 коктейль или пул антигенов, или коктейль или пул пептидов, включающих эти антигены, был разработан высокочувствительный тест, несмотря на отсутствие ESAT-6 в диагностических или иммуногенных композициях. Кроме того, дополнительно были улучшены содержащие ESAT-6 диагностические иммуногенные композиции, используемые в настоящее время.

30

Детальное описание изобретения

Данный диагностический способ основан на клеточно-опосредованном иммунологическом (СМІ) распознавании антигенов, экспрессируемых бактериями *M.tuberculosis*

(или другими микобактериями из туберкулезного комплекса) во время инфекции. Таким образом, тест не требует присутствия бактерий в виде традиционной культуры, микроскопических или ПЦР-методов. Это означает, что тест можно использовать на ранней стадии инфекции и что тест применим независимо от анатомического расположения инфекции. Способ является идеальным при прослеживании контакта в качестве замещения используемого в настоящее время TST.

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

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

а)
Rv3874 (SEQ ID NO 1), Rv3615 (SEQ ID NO 2) и дополнительных композиций, выбранных из Rv3865 (SEQ ID NO 3), Rv2348 (SEQ ID NO 4), Rv3614 (SEQ ID NO 5), Rv2654 (SEQ ID NO 6) и Rv3877 (SEQ ID NO 7);

или б)

смеси фрагментов указанных полипептидов;

или в)

где в выбранной смеси последовательности полипептидов или фрагментов указанных полипептидов по меньшей мере на 80% идентичны любому из полипептидов из набора а) или б), и при этом она является иммуногенной.

При обстоятельствах, когда содержащие ESAT-6 вакцины не будут зарегистрированы для применения у человека, в областях, где содержащие ESAT-6 вакцины не предполагается использовать, и при других обстоятельствах, например, для дополнительного повышения чувствительности диагностического теста, любую из упомянутых выше

диагностических или иммуногенных композиций, можно дополнить ESAT-6 (SEQ ID NO 51) или ее одним или несколькими фрагментами.

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

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

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

Подробное описание предпочтительных полипептидов и фрагментов указанных полипептидов:

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

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

Rv3865 (SEQ ID NO 3) представляет собой белок, связанный с секрецией ESX-1: Были выбраны 3 пептида, включающие аминокислоты 9-44 (SEQ ID NO 19-21).

Rv2348c (SEQ ID NO 4) расположен в участке RD7, который, как было показано, отсутствует в BCG: Были выбраны 4 пептида, включающие аминокислоты 56-109 из последовательности белка полной длины (SEQ ID NO 22-25).

Rv3614c (SEQ ID NO 5) представляет собой секретируемый белок: Были выбраны 20 пептидов, включающие всю последовательность (SEQ ID NO 26-45).

Rv2654c (SEQ ID NO 6)) представляет собой белок с неизвестной функцией, кодируемый участком RD11: был выбран 4 пептид (SEQ ID NO 8).

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

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

15

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

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

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

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

5

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

10

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

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

Содержащие ESAT-6 композиции используются в CMI тестах в отношении *M.tuberculosis*. В представленном тесте можно избежать применения ESAT-6 и он обладает преимуществом широкого распознавания, полученного в результате использования нескольких специфических для *M.tuberculosis* антигенов. В тесте при комбинации CFP10, Rv3615c, Rv3865 и Rv2348 (пептидный пул А) получают чувствительность 87% и специфичность 98% по сравнению с чувствительностью 74% и специфичностью 96% при использовании антигенов квантиферона. Таким образом, несмотря на
25 отсутствие ESAT-6, который, как известно, является высокочувствительным антигеном и распознается большей частью индивидов, имеющих инфекцию *M.tuberculosis*, исследуемые в данном документе композиции характеризуются уровнем чувствительности, который больше на 10% по сравнению с хорошо известными композициями на основе ESAT-6 и в настоящее время используемыми в анализах IGRA.
30

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

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

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

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

Определения

5

Полипептиды

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

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

Алифатические	Неполярные	GAP
		ILV
	Полярные-незаряженные	CSTM
		NQ
	Полярные-заряженные	DE

		KR
Ароматические		HFYW

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

10 В настоящем контексте выражение "практически чистый полипептидный фрагмент" означает препарат полипептида, который содержит по большей мере 10% по весу вещества других полипептидов, с которыми он связан естественным образом (более низкое процентное содержание вещества других полипептидов является предпочтительным, например, по большей мере 4%, по большей мере 3%, по большей мере 2% и по

15 большей мере 1). Предпочтительно, чтобы практически чистый полипептид был по меньшей мере на 96% чистым, *т.е.* чтобы полипептид составлял по меньшей мере 96% по весу от общего вещества полипептидов, присутствующих в препарате, и более высокое процентное содержание является предпочтительным, такое как, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,25%, по

20 меньшей мере 99,5% и по меньшей мере 99,75%. Особенно предпочтительно, чтобы полипептидный фрагмент находился в "практически чистой форме", *т.е.* чтобы полипептидный фрагмент практически не содержал никакого другого антигена, с которым он связан естественным образом, *т.е.* не содержал никакого другого антигена из бактерий, принадлежащих к туберкулезному комплексу или вирулентной микобактерии.

25 Это можно осуществить при помощи получения полипептидного фрагмента рекомбинантными методами в немикобактериальной клетке-хозяине, как будет подробно описано ниже, или путем синтеза полипептидного фрагмента при помощи общепринятых способов твердо- или жидкофазного пептидного синтеза, например, при помощи способа, описанного (Merrifield 1963) или его вариаций.

30

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

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

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

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

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

30 ***Идентичность последовательностей***

Выражение "идентичность последовательностей" указывает количественную меру степени гомологии между двумя аминокислотными последовательностями равной длины или между двумя нуклеотидными последовательностями равной длины. Две последовательности, подлежащие сравнению, должны быть выравнены до наиболее

точного соответствия, возможного при вставке гэпов или альтернативно усечении на концах белковых последовательностей. Идентичность последовательностей можно

рассчитать в виде $\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$, где N_{dif} представляет собой число неидентичных остатков

в двух последовательностях после выравнивания, и где N_{ref} представляет собой

5 число остатков в одной из последовательностей. Следовательно, последовательность ДНК AGTCAGTC будет на 75% идентична последовательности AATCAATC ($N_{dif}=2$ и $N_{ref}=8$). Гэп рассчитывают в виде неидентичности специфического(их) остатка(остатков), т.е. последовательность ДНК AGTGTC будет на 75% идентична последовательности ДНК AGTCAGTC ($N_{dif}=2$ и $N_{ref}=8$). Идентичность последовательностей

10 может быть альтернативно рассчитана при помощи программы BLAST, например, программы BLASTP (Pearson, 1988) (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). Согласно одному аспекту настоящего изобретения выравнивание выполняют при помощи способа выравнивания последовательностей ClustalW со стандартными параметрами, описанными Thompson, *et al* (Thompson, 1994), доступно на

15 <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>.

Предпочтительный минимальный процент идентичности последовательностей -

составляет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% и по меньшей мере 99,5%.

20

Иммуногенный эпитоп

Иммуногенный эпитоп полипептида представляет собой часть полипептида, которая

25

вызывает иммунный ответ у животного или человека, и/или в биологическом образце, определяемый при помощи любого из биологических анализов, описанных в данном документе. Иммуногенный эпитоп полипептида может представлять собой Т-

клеточный эпитоп или В-клеточный эпитоп. Иммуногенный эпитоп может быть связан с одной или несколькими относительно небольшими частями полипептида, они

30

могут быть рассеяны по всей полипептидной последовательности или расположены в конкретных участках полипептида. Для нескольких полипептидов даже было показано, что эпитопы рассеяны по всему полипептиду, охватывая всю последовательность (Ravn, 1999).

Для того чтобы идентифицировать соответствующие Т-клеточные эпитопы, которые распознаются в ходе иммунного ответа, можно использовать способ "грубой силы": Поскольку Т-клеточные эпитопы являются линейными, делеционные мутанты полипептида будут, при систематическом их конструировании, указывать на то, какие области полипептида имеют принципиальное значение в иммунном распознавании, например, путем проведения для этих делеционных мутантов, к примеру, IFN- γ анализа, описанного в данном документе. В другом способе для обнаружения эпитопов МНС II класса применяют перекрывающиеся пептиды, предпочтительно синтетические, имеющие длину, например, 20 аминокислотных остатков, полученных из полипептида. Эти пептиды можно исследовать при помощи биологических анализов (например, IFN- γ анализа, описанного в данном документе), и некоторые из них будут давать положительный ответ (и, таким образом, будут иммуногенными) в качестве доказательства присутствия в пептиде Т-клеточного эпитопа. Для обнаружения эпитопов МНС I класса возможно спрогнозировать пептиды, которые будут связывать (Stryhn, 1996) и затем производить эти пептиды синтетически, и исследовать их с помощью соответствующих биологических анализов, например IFN- γ анализа, описанного в данном документе. Пептиды предпочтительно имеют длину, например, от 8 до 11 аминокислотных остатков, полученных из полипептида.

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

ноокислотных остатков будут наиболее эффективными как эпитопы МНС класса I, и поэтому особо предпочтительные длины полипептидного фрагмента, применяемого в способе по данному изобретению, составляют 11, например, 10, 9, 8 и даже 7 аминокислотных остатков.

5

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

10

15

Варианты

20

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

25

Иммунный индивид

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

30

Иммуногенный

Иммуногенный полипептид определяется как полипептид, который индуцирует иммунный ответ в биологическом образце или у особи, в настоящее время или ранее инфицированной вирулентной микобактерией. Иммуногенный полипептид является си-

нонимом для антигена или антигенного полипептида, а два выражения иммуноген и антиген используются без различия в данном раскрытии; узким определением для антигена является то, что он способен связываться специфическим с Т- или В-клеточным рецептором, а узким определением для иммуногена является то, что он способен вызывать иммунный ответ, однако, если это касается диагностики, то содержание двух выражений является одинаковым и, таким образом, они используются в данном документе без различия.

СМІ диагностика

10 Иммуноный ответ можно контролировать одним из следующих способов: *in vitro* СМІ ответ определяют по высвобождению релевантного цитокина, такого как IFN- γ , из лимфоцитов, изъятых из животного или человека, в настоящий момент или ранее инфицированного вирулентными микобактериями, или по выявлению пролиферации этих Т-клеток. Индукцию выполняют добавлением иммуногенной композиции к суспензии клеток крови, содержащей предпочтительно от 1×10^5 клеток до 1×10^6 клеток на лунку. Клетки выделяют из крови, селезенки, печени или легкого и добавляют иммуногенную композицию до концентрации, например, 1-200 мкг на мл суспензии, а стимуляцию выполняют от двух до пяти дней. Для контроля клеточной пролиферации клетки метят радиоактивным тимидином и через 16-22 часа инкубации пролиферацию 15 измеряют подсчетом в жидком сцинтиляторе или другими способами для выявления пролиферативного ответа. Высвобождение IFN- γ можно определить методом ELISA, хорошо известным специалисту в данной области. Другие цитокины и хемокины, отличные от IFN- γ , могли бы быть релевантными при контроле иммунологического ответа на полипептид, такие как IL-2, IL-12, TNF- α , IL-4, TGF- β , IP-10, MIP-1 β , MCP-1, 20 IL-1RA и MIG. Другим и более чувствительным способом определения наличия цитокина (например, IFN- γ) является способ ELISPOT, в котором клетки, выделенные, например, из крови, разбавляют до концентрации предпочтительно $1-4 \times 10^6$ клеток/мл и инкубируют на 18-22 часов в присутствии диагностической или иммуногенной композиции до концентрации предпочтительно 1-200 мкг на мл. После этого клеточные 25 суспензии разбавляют до $1-2 \times 10^6$ /мл и переносят в микротитрационные планшеты с поливинилиденфторидной мембраной, покрытые антителом к IFN- γ , и инкубируют предпочтительно на 4-16 часов. Продуцирующие IFN- γ клетки определяют при использовании меченого вторичного антитела к IFN- γ и релевантного субстрата, обра-

зующего пятна, которые можно подсчитать при помощи диссекционного микроскопа. Анализ FluoroSpot является модификацией анализа ELISPOT и основан на применении нескольких флуоресцентных антицитокинов, что делает возможным определять два цитокина в одном и том же анализе, потенциально способствуя улучшенному прогнозу риска заболевания, как описано ниже для совместного определения IL-2 и IFN- γ .

5 Также возможно определять наличие цитокинового или хемокинового ответа при помощи иммунохроматографической технологии. Этот вид анализа, хорошо известный по экспресс-тестам на беременность, обеспечивает быстрое выявление уровня высвобожденного цитокина или хемокина, и обеспечивает диагностику инфекций и заболеваний, кроме того, в ограниченных по ресурсам условиях. Другие иммуноанализы, в том числе колориметрические анализы, такие как турбидиметрия, хорошо известны специалисту и могут использоваться для высокопроизводительного выявления уровней цитокинов или хемокинов. Также возможно определить присутствие mRNA, кодирующей релевантный цитокин, с помощью методики полимеразной цепной реакции (PCR). Выявление цитокина или хемокина по уровню mRNA обычно является более быстрым, чем по уровню белка, поскольку транскрипция mRNA предшествует синтезу белка. Например, уровни mRNA цитокина IFN- γ и хемокина IP-10 являются оптимальными при более коротких инкубационных периодах по сравнению с уровнем белка. Цитокиновые и хемокиновые сигналы, выявляемые по уровню mRNA, можно определять уже через 2 часа после стимуляции, а максимальные уровни достигаются через 6-10 часов. Обычно будут измерять один или несколько цитокинов при помощи, например, PCR, иммунохроматографического анализа, ELISPOT или ELISA. Специалисту в данной области будет понятно, что значимое увеличение или уменьшение количества любого из этих цитокинов, индуцированных специфическим пептидом, можно применять при оценке иммунологической активности полипептида. Также специалисту будет понятно, что определенные паттерны высвобождения цитокинов связаны с определенными клиническими состояниями. В частности, преобладание IFN- γ над IL-2, как предполагалось, указывало на раннюю активную форму заболевания TB, в то время как преобладание IL-2 над IFN- γ указывает на контроль инфекции и низкий риск развития заболевания TB, несмотря на присутствие инфекции у млекопитающего, подлежащего исследованию (Biselli, 2010; Sester, 2011).

10
15
20
25
30

In vitro СМІ ответ можно повысить добавлением цитокинов, таких как IL-7 и/или IL-15, также повышенное высвобождение можно выполнить блокированием ингибитор-

ных веществ, таких как IL-10, IL-4, IL-5 и/или IL-13. Подобные СМІ ответы можно более надежно выявить, если условия культивирования *in vitro* являются оптимальными для клеток, испытывающих стимуляцию. Наступление таких условий можно ускорить добавлением питательных веществ, например, в форме простых или сложных сахаров.

5

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

15

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

25

Другой *in vitro* способ включает забор крови в пробирки с вакуумом, предварительно покрытые иммуногенными полипептидами или слитыми белками, к которым необязательно также добавляют стабилизатор крови, такой как гепарин, и/или питательные вещества. Предварительно покрытые пробирки для инкубации обеспечивают простой забор крови и устраняют риск воздействия гемоконтактной инфекции во время приготовления образца для инкубации *in vitro*. Такие пробирки с вакуумом являются идеальными для высокопроизводительной обработки и автоматического анализа.

30

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

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

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

Диагностическая точность и граничные величины

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

5 Специфичность конкретного скринингового теста отражает часть индивидов без состояния, которые корректно идентифицированы или диагностированы при помощи теста, например, специфичность равняется 100%, если все индивиды без состояния характеризуются отрицательным результатом теста.

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

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

20 **График зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов**

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

Клинические возможности лабораторного теста зависят от его диагностической точности, или способности правильно классифицировать субъектов в клинически релевантные подгруппы. Диагностическая точность измеряет способность теста правильно разграничивать два различных состояния исследуемых субъектов. Такими состояниями

ми являются, например, здоровье и болезнь, латентная или недавняя инфекция или отсутствие инфекции, или доброкачественное или злокачественное заболевание.

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

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

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

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

20 **Способы получения**

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

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

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

Слитые белки

10 Несмотря на существование в виде отдельных структур, два или более из иммуногенных полипептидов можно также получать в виде слитых белков, при этих способах можно достичь лучших характеристик полипептидов согласно настоящему изобретению. Например, все партнеры слияния, которые облегчают экспорт полипептида при получении рекомбинантным способом, партнеры слияния, которые облегчают очистку 15 полипептида, и партнеры слияния, которые усиливают иммуногенность полипептидного фрагмента согласно настоящему изобретению, представляют собой интересные возможности. Таким образом, настоящее изобретение также относится к слитому полипептиду, содержащему по меньшей мере два (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) полипептидных или иммуногенных фрагмента, определенных выше, и необязательно по меньшей мере одного дополнительного партнера слияния, и к композициям, содержащим слитые белки. Партнер слияния может с целью усиления иммуногенности представлять собой другой полипептид, полученный из *M.tuberculosis*, например, полипептидный фрагмент, полученный из бактерии, принадлежащей к туберкулезному комплексу, такой как ESAT-6, TB10.4, CFP10, RD1-ORF2, Rv1036, MPB64, MPT64, 20 Ag85A, Ag85B (MPT59), MPB59, Ag85C, липопротеин 19 кДа, MPT32 и альфа-кристаллин, или по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп любого из упомянутых выше антигенов (WO0179274; WO01041519; (Nagai, 1991; Rosenkrands, 1998; Skjot, 2000). Настоящее изобретение также относится к слитым полипептидам, содержащим взаимные слияния двух или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) из полипептидов (или их иммуногенных частей) по настоящему изобретению. 30

Подписи к фигурам

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

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

Фигура 3. Тепловая карта, показывающая иммунное распознавание у 30 эндемичных контрольных доноров из Египта, исходя из граничной величины 100 пг/мл IFN- γ . Все доноры были вакцинированы BCG и не имели в анамнезе заболевания ТВ или известного контакта с пациентом с ТВ. Доноры были определены как “эндемичный контроль”, поскольку они жили в Египте, который считается промежуточной эндемичной
20 страной. Символ белого цвета указывает на отсутствие ответа и символ серого цвета указывает на ответ. Все исследованные антигены были высокоспецифическими в противоположность PPD, который был включен в качестве примера неспецифической антигенной стимуляции. Оба донора 31 и 77 распознавали широкий диапазон антигенов *M. tuberculosis*, указывая на латентную инфекцию, несмотря на упомянутые критерии отбора.
25

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

Фигура 5. Ответы IP-10 на пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10, Rv2654c (пептид 4)) и на пептидный пул А у 100 индивидов из Дании, не подвергшихся воздействию *M. tuberculosis*. Пунктирная линия указывает медианные ответы на 0 нг/мл

для обоих антигенных пулов. Она показывает высокую специфичность (немного ложно-положительных результатов) всего пула пептидов, указывая на то, что каждый пептид характеризуется высокой специфичностью.

- 5 Фигура 6. Ответы IFN- γ на пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10, Rv2654c (пептид 4)) и пептидный пул А у 100 индивидов из Дании, не подвергшихся воздействию *M.tuberculosis*. Пунктирная линия указывает медианный ответ на 0 пг/мл для пептидного пула А и на 4,9 пг/мл для антигенов квантиферона. Она показывает высокую специфичность (немного ложно-положительных результатов) всего пула пептидов, указывая на то, что каждый пептид характеризуется высокой специфичностью.
- 10

- Фигура 7. Анализ кривой зависимости чувствительности от частоты ложно-положительных результатов (ROC), сравнивающий диагностический потенциал пептидного пула А в отношении антигенов квантиферона у 100 индивидов из Дании, не подвергшихся воздействию *M.tuberculosis*, и 73 пациентов с ТВ. Она показывает высокую специфичность (немного ложно-положительных результатов) всего пула пептидов, указывая на то, что каждый пептид характеризуется высокой специфичностью.
- 15

- Фигура 8. Ответы IP-10 (нг/мл) на пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10 и Rv2654c) и на пептидный пул А в 68 случаях пациентов с микробиологически подтвержденным ТВ и у 36 эндемичных контрольных пациентов из Танзании.
- 20

- Фигура 9. Ответы IP-10 (нг/мл) на пептидный пул А и пептидный пул А, обогащенный ESAT-6, у 73 пациентов с подтвержденным ТВ из Каира, Египет. Линия указывает медиану.
- 25

ПРИМЕРЫ

30 **Пример 1. Первоначальный выбор антигенов**

Т-клеточные антигены, выбранные для иммунодиагностики ТВ, должны были быть специфическими в отношении инфекции *M.tuberculosis* с целью избежания интерференции от вакцинации BCG и наиболее распространенных атипических микобактерий.

- 35 В то же время, важно было избегать ESAT-6, учитывая, что ESAT-6 присутствует во

многих из новых вакцин против ТВ. Как было описано выше, в Предпосылках изобретения, в процессе тщательного и прямого отбора на основании теоретических положений, практического исследования и литературного поиска сотен потенциальных антигенов, выбирали не более 9 антигенов *M.tuberculosis* для дальнейшего исследования.

5 Они представляют собой:

CFP10 (Rv3874). 10 кДа антиген культурального фильтрата вместе с ESAT-6 является основой используемых в настоящее время клеточных диагностических тестов крови на инфекцию *M.tuberculosis* при помощи анализов высвобождения IFN- γ (IGRA). CFP10
10 представляет собой иммунодоминантный антиген *M.tuberculosis*, а диагностическая специфичность CFP10 и ESAT-6 вызвана их геномным расположением в области различия гена 1 (RD1), участке, который отсутствует во всех штаммах BCG (Behr, 1999) и включен в патогенез *M.tuberculosis*. Гены, кодирующие компоненты пути секреции ESX-1, также расположены в RD1. В обзоре исследований анализов интерферона- γ
15 описывали чувствительность CFP10 61-71% у пациентов с ТВ (Pai, 2004). В противоположность ESAT-6, CFP10 не является частью каких-либо из используемых в настоящее время кандидатов для вакцин в процессе оценки.

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

30

Rv3614c и Rv3615c. Генный кластер *espA-espC-espD* (Rv3616c-Rv3615c-Rv3614c) необходим для ESX-1-зависимой секреции белков и вирулентности *M.tuberculosis* (Fortune, 2005; MacGurn, 2005), и недавно было описано, что эти три гена котранскрибируются (Chen, 2012). Rv3616c и Rv3615c секретированы совместно с ESAT-6 и

CFP10 (Fortune, 2005; MacGurn, 2005), в то время как секреция Rv3614c не требует непосредственно функций ESX-1 (Chen, 2012). У крупного рогатого скота партнер Rv3615c *M. bovis*, Mb3645c, стимулировал ответы IFN- γ у 37% инфицированных *M. bovis* животных, но не у наивных и вакцинированных BCG животных (Sidders, 2008).

5 Mb3645c и Rv3615c характеризовались 100% идентичностью аминокислот. У крупного рогатого скота С-концевая часть белка Mb3645c (аминокислоты 57-103) была наиболее иммуногенной (Sidders, 2008). У людей Rv3615c также выявляли в качестве потенциального кандидата для специфической иммунодиагностики *M.tuberculosis* на основе Т-клеток с распознаванием случаев ТБ и низких ответов у вакцинированных

10 BCG (Millington, 2011). У пациентов с активной формой ТБ большинство часто распознаваемых пептидов располагались в С-концевой части молекулы (аминокислоты 66-90). Несмотря на то, что ген, кодирующий Rv3615c, присутствует в BCG, белок Rv3615c специфически распознается у инфицированных *M.tuberculosis* индивидов, но при ограниченном распознавании у вакцинированных BCG людей.

15

EspF (Rv3865). Белок EspF, связанный с секрецией ESX-1, или Mb3895 *M. bovis* (идентичный Rv3865 из *M.tuberculosis*), был идентифицирован Ewer и др. (Ewer, 2006) в качестве многообещающего диагностического маркера у крупного рогатого скота, инфицированного экспериментально или естественным путем *M. bovis*. Пятьдесят

20 процентов экспериментально инфицированного крупного рогатого скота отвечали на пептидный пул Mb3895, в то время как вакцинированные BCG телята не отвечали на этот пептидный пул.

Rv2348c. Rv2348c представляет собой гипотетический белок с неизвестной функцией.

25 Ген Rv2348c расположен в участке RD7. Было показано, что этот участок отсутствовал в BCG (Behr, 1999) и белок, таким образом, может быть использован для диагностики ТБ без интерференции от предшествующей вакцинации BCG. Ген является высоко-транскрибируемым *in vitro* (Arnvig, 2011), а белок идентифицирован в протеомных исследованиях (de Souza, 2011). Фрагмент аминокислот 23-50 в ORF Rv2348c (открытой

30 рамке считывания) характеризуется высокой гомологией с геном Mav_2040 *M. avium*.

Rv3873 Участок из аминокислотной последовательности Rv3873, включающий аминокислоты 12-70, был покрыт перекрывающимися пептидами. Среди нескольких оцениваемых пептидных пулов RD этот пул из пептидов Rv3873, названный Rv3873A,

идентифицировали в качестве одного из наиболее многообещающих пулов, распознаваемых 46% РВМС от пациентов с ТВ (Brock, 2004). Потенциальные перекрестно-реактивные отрезки не присутствовали в этой части молекулы.

- 5 **Rv3878** Как описано выше для Rv3873, определяли и оценивали пептидный пул, названный Rv3878В, включающий аминокислоты 122-189 этого белка RD1. Он распознавался 32% РВМС от пациентов-людей с ТВ, и был предложен в качестве пептидного коктейля или пула, который можно было комбинировать с ESAT-6 и CFP10 до максимального повышения чувствительности (Brock, 2004).

10

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

15

Таблица 1. Перечень последовательностей для выбранных пептидов.

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

20

Пример 2. Выбор антигенов

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

25

го, PPD включали в Египте в качестве примера неспецифической антигенной стимуляции.

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

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

В обоих исследованиях свежеотобранную разбавленную цельную кровь стимулировали в планшетах с выбранными антигенами (10 мкг/мл каждого пептида). Синтетические пептиды (полученные из Genecust) из антигенов ESAT-6, CFP10, Rv3873, Rv3878, Rv3615c, Rv3865, Rv3877 и Rv2348 подвергали скринингу в обоих исследованиях и
25 также включали положительный (РНА) и отрицательный (только средний) контроль и (только в Египте) PPD (не показано). Разбавленную цельную кровь инкубировали при 37 градусах Цельсия в течение 5 дней, а затем супернатанты собирали и исследовали в отношении (IFN- γ) при помощи внутрилабораторного ELISA. Положительный ответ в
этих исследованиях определяли в виде концентрации IFN- γ 100 или 50 пг/мл для египетского и гренландского исследования, соответственно.
30

На фигурах 1, 2 и 3 представлены графические представления (тепловые карты) данных, где отдельные содержащиеся величины представлены цветом, при этом белый цвет показывает отсутствие ответа, серый цвет указывает на ответ на определенный

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

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

Диагностические возможности комбинации CFP10 и Rv3615c затем сравнивали с таковыми комбинации CFP10 и ESAT-6. Включали образцы цельной крови от 35 индивидов из Гренландии, из которых 18 характеризовались латентной формой инфекции *M.tuberculosis*, определяемой в виде положительного квантиферонового теста и/или подтвержденного воздействия *M.tuberculosis* и изменением туберкулиновой кожной пробы, и 17 пациентов характеризовались микробиологически подтвержденным ТВ.

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

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

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

**Таблица 2. Сравнение чувствительности CFP10, Rv3615c и ESAT-6 и их комбина-
25 ций.**

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

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

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

10

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

20

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

25

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

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

Аналогично, диагностическая способность Rv3877 составляла лишь 11%, однако, этот антиген также усиливал общую чувствительность CFP10 и Rv3615c с 60% до 69% (таблица 4).

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

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

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

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

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

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

20

Пример 5. Исследование чувствительности и специфичности пептидного пула А

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

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

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

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

- CFP10: 6 пептидов, включающие всю аминокислотную последовательность CFP10 (SEQ ID NO 9-14)
- Rv3615c: 4 пептида, включающие аминокислоты 55-103 (SEQ ID NO 15-18)
- Rv3865: 3 пептида, включающие аминокислоты 9-44 (SEQ ID NO 19-21)
- Rv2348c: 4 пептида, включающие аминокислоты 56-109 из последовательности белка полной длины (SEQ ID NO 22-25).

Второе и независимое исследование в Египте проводили с целью исследования чувствительности 4 антигенов при объединении в пептидный пул А. В исследование включали 73 пациента с ТВ с подтвержденной положительной культурой мокроты и каждый субъект предоставлял образец крови, отобранный непосредственно в предварительно подготовленные покрытые антигенами пробирки с вакуумом. Пробирки покрывали либо пептидами ESAT-6+CFP10+Rv2654c (т.е. теми же самыми пептидами, как и в квантифероновом тесте, и использовали в качестве эталона, обозначенного пептидным пулом квантиферона) или пептидным пулом А (CFP10 + Rv3516c + Rv3865 + Rv2348, как указано выше). Через 16-24 часов инкубации супернатанты собирали и исследовали в отношении высвобождения цитокина IP-10 при помощи внутрилабораторного анализа ELISA. Как показано на фигуре 4, большая часть пациентов с ТВ распознавала как пептидный пул А, так и пептидный пул квантиферона. Медианные ответы составляли 5,5 нг/мл IP10 для пептидного пула А и 6,0 для пептидного пула квантиферона.

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

вартильная широта (IQR) -0,5-5,2 пг/мл и пептидный пул квантиферона – медиана 4,9 пг/мл, IQR -0,6-32,45 пг/мл.

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

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

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

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

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

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

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

15

Пример 6. Валидация пептидного пула А.

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

- 25 От каждого донора забирали 1 мл крови в 5 пробирок с вакуумом, содержащих лиофилизированный гепарин (18 МЕ) и пептиды (5 мкг/пептид), приведенные ниже: пептидный пул квантиферона (ESAT-6, CFP10 и TB7.7p4 (пробирка 1), сопоставимый с

квантифероновым тестом), пептидный пул А (CFP10, Rv3615, Rv3865 и Rv2348B (пробирка 2)) и пробирку для отрицательного контроля (пробирка 3).

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

10

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

20

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

25

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

В эндемичной контрольной популяции отсутствовал золотой стандарт для инфекции, в связи с этим частоту представляли в виде положительных респондеров. При помощи пептидного пула А было выявлено 39% (14/36) в качестве положительных, а при по-

мощи стандартного пептидного пула квантиферона - 31% (11/36), что еще раз указывало на более высокую чувствительность. Соответствие также было очень высоким (92% соответствия в 33 случаях из 36 включенных).

5

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

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

10

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

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

30

Ссылки

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

- Hall, L. J., S. Clare, et al. (2009). Characterisation of a live Salmonella vaccine stably expressing the Mycobacterium tuberculosis Ag85B-ESAT-6/ESAT-6 fusion protein. Vaccine **27**(49): 6894-6904.
- Harboe, M., A. S. Malin, et al. (1998). B-cell epitopes and quantification of the ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis. Infection and immunity **66**(2): 717-723.
- 5 Kilgus, J., T. Jardetzky, et al. (1991). Analysis of the permissive association of a malaria T cell epitope with DR molecules. The Journal of Immunology **146**(1): 307-315.
- Liu, X. Q., D. Dosanjh, et al. (2004). Evaluation of T-cell responses to novel RD1- and RD2-encoded Mycobacterium tuberculosis gene products for specific detection of human tuberculosis infection. Infection and immunity **72**(5): 2574-2581.
- 10 Lustig, J. V., H. L. Rieger, et al. (1976). Humoral and cellular responses to native antigen following oral and parenteral immunization with lipid-conjugated bovine serum albumin. Cellular immunology **24**(1): 164-172.
- MacGurn, J. A., S. Raghavan, et al. (2005). A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in Mycobacterium tuberculosis. Molecular microbiology **57**(6): 1653-1663.
- 15 Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. Journal of the American Chemical Society **85**(14): 2149-2154.
- Millington, K. A., S. M. Fortune, et al. (2011). Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for Mycobacterium tuberculosis infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(14): 5730-5735.
- 20 Moon, H. W. and M. Hur (2013). Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an updated review. Annals of clinical and laboratory science **43**(2): 221-229.
- 25 Mowat, A. M., A. M. Donachie, et al. (1991). Immune-stimulating complexes containing Quil A and protein antigen prime class I MHC-restricted T lymphocytes in vivo and are immunogenic by the oral route. Immunology **72**(3): 317-322.
- Mustafa, A. S., R. Al-Attayah, et al. (2008). Efficient testing of large pools of Mycobacterium tuberculosis RD1 peptides and identification of major antigens and immunodominant peptides recognized by human Th1 cells. Clinical and vaccine immunology : CVI **15**(6): 916-924.
- 30 Nagai, S., H. G. Wiker, et al. (1991). Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. Infection and immunity **59**(1): 372-382.
- 35 Pai, M., L. W. Riley, et al. (2004). Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. The Lancet infectious diseases **4**(12): 761-776.
- Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988). Improved tools for biological sequence comparison. Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(8): 2444-2448.
- Ravn, P., A. Demissie, et al. (1999). Human T Cell Responses to the ESAT-6 Antigen from Mycobacterium tuberculosis. Journal of Infectious Diseases **179**(3): 637-645.
- 40 Redelman-Sidi, G. and K. A. Sepkowitz (2013). IFN-gamma release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults. American journal of respiratory and critical care medicine **188**(4): 422-431.
- Rosenkrands, I., P. B. Rasmussen, et al. (1998). Identification and characterization of a 29-kilodalton protein from Mycobacterium tuberculosis culture filtrate recognized by mouse memory effector cells. Infection and immunity **66**(6): 2728-2735.
- 45

- Ruhwald, M. and P. Ravn (2009). Biomarkers of latent TB infection. Expert review of respiratory medicine **3**(4): 387-401.
- Schopfer, K., H. L. Rieder, et al. (2013). The sensitivity of an interferon-gamma release assay in microbiologically confirmed pediatric tuberculosis. European journal of pediatrics.
5
- Sester, U., M. Fousse, et al. (2011). Whole-Blood Flow-Cytometric Analysis of Antigen-Specific CD4 T-Cell Cytokine Profiles Distinguishes Active Tuberculosis from Non-Active States. PloS one **6**(3): e17813.
- Sidders, B., C. Pirson, et al. (2008). Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the Mycobacterium tuberculosis complex. Infection and immunity **76**(9): 3932-3939.
10
- Sinigaglia, F., M. Guttinger, et al. (1988). A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. Nature **336**(6201): 778-780.
- Skjot, R. L., T. Oettinger, et al. (2000). Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from Mycobacterium tuberculosis identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. Infection and immunity **68**(1): 214-220.
15
- Sonnenberg, P., J. R. Glynn, et al. (2005). How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. The Journal of infectious diseases **191**(2): 150-158.
- Stryhn, A., L. Ø. Pedersen, et al. (1996). Peptide binding specificity of major histocompatibility complex class I resolved into an array of apparently independent subspecificities: quantitation by peptide libraries and improved prediction of binding. European Journal of Immunology **26**(8): 1911-1918.
20
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research **22**(22): 4673-4680.
25
- van Dissel, J. T., S. M. Arend, et al. (2010). Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in naive human volunteers. Vaccine **28**(20): 3571-3581.
30
- van Dissel, J. T., D. Soonawala, et al. (2011). Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31(R) promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. Vaccine **29**(11): 2100-2109.
- Xu, Y., W. Liu, et al. (2009). Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the chimeric protein of antigen 85B and ESAT-6 enhances the Th1 cell-mediated response. Clinical and vaccine immunology : CVI **16**(8): 1121-1126.
35
- Yang, X., L. Bao, et al. (2011). A novel recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin strain expressing human granulocyte macrophage colony-stimulating factor and Mycobacterium tuberculosis early secretory antigenic target 6 complex augments Th1 immunity. Acta biochimica et biophysica Sinica **43**(7): 511-518.
40
- Young, F., J. A. Critchley, et al. (2009). A review of co-morbidity between infectious and chronic disease in Sub Saharan Africa: TB and diabetes mellitus, HIV and metabolic syndrome, and the impact of globalization. Globalization and health **5**: 9.
45

- Zhang, H., P. Peng, et al. (2010). Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT-6/ESAT-6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. Scandinavian journal of immunology **72**(4): 349-357.
- 5 Zweig, M. H. and G. Campbell (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clinical chemistry **39**(4): 561-577.
- Aagaard, C., I. Brock, et al. (2004). Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The Journal of infectious diseases **189**(5):
- 10 812-819.
- Aagaard, C., T. Hoang, et al. (2011). A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. Nature medicine **17**(2): 189-194.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Statens Serum Institut
 <120> Диагностические реагенты для улучшенной in vivo или in vitro
 клеточно-опосредованной иммунологической диагностики туберкулеза
 <130> 15051
 <160> 63
 <170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 100
 <212> Белок
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 1

Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly
 1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val
 20 25 30

Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly
 35 40 45

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys
 50 55 60

Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly
 65 70 75 80

Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser
 85 90 95

Gln Met Gly Phe
 100

- <210> 2
 <211> 103
 <212> Белок
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 2

Met Thr Glu Asn Leu Thr Val Gln Pro Glu Arg Leu Gly Val Leu Ala
 1 5 10 15

Ser His His Asp Asn Ala Ala Val Asp Ala Ser Ser Gly Val Glu Ala
 20 25 30

Ala Ala Gly Leu Gly Glu Ser Val Ala Ile Thr His Gly Pro Tyr Cys

35

40

45

Ser Gln Phe Asn Asp Thr Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala
50 55 60

Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
65 70 75 80

Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys
85 90 95

Ala Ile Asp Gly Leu Phe Thr
100

<210> 3
<211> 103
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 3

Met Thr Gly Phe Leu Gly Val Val Pro Ser Phe Leu Lys Val Leu Ala
1 5 10 15

Gly Met His Asn Glu Ile Val Gly Asp Ile Lys Arg Ala Thr Asp Thr
20 25 30

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

Ser Lys Phe Asn Asp Thr Leu Gln Glu Phe Glu Thr Thr Arg Ser Ser
50 55 60

Thr Gly Thr Gly Leu Gln Gly Val Thr Ser Gly Leu Ala Asn Asn Leu
65 70 75 80

Leu Ala Ala Ala Gly Ala Tyr Leu Lys Ala Asp Asp Gly Leu Ala Gly
85 90 95

Val Ile Asp Lys Ile Phe Gly
100

<210> 4
<211> 108
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

Met Leu Leu Pro Leu Gly Pro Pro Leu Pro Pro Asp Ala Val Val Ala
1 5 10 15

Lys Arg Ala Glu Ser Gly Met Leu Gly Gly Leu Ser Val Pro Leu Ser
20 25 30

Trp Gly Val Ala Val Pro Pro Asp Asp Tyr Asp His Trp Ala Pro Ala
35 40 45

Pro Glu Asp Gly Ala Asp Val Asp Val Gln Ala Ala Glu Gly Ala Asp
50 55 60

Ala Glu Ala Ala Ala Met Asp Glu Trp Asp Glu Trp Gln Ala Trp Asn
65 70 75 80

Glu Trp Val Ala Glu Asn Ala Glu Pro Arg Phe Glu Val Pro Arg Ser
85 90 95

Ser Ser Ser Val Ile Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
100 105

<210> 5

<211> 184

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5

Val Asp Leu Pro Gly Asn Asp Phe Asp Ser Asn Asp Phe Asp Ala Val
1 5 10 15

Asp Leu Trp Gly Ala Asp Gly Ala Glu Gly Trp Thr Ala Asp Pro Ile
20 25 30

Ile Gly Val Gly Ser Ala Ala Thr Pro Asp Thr Gly Pro Asp Leu Asp
35 40 45

Asn Ala His Gly Gln Ala Glu Thr Asp Thr Glu Gln Glu Ile Ala Leu
50 55 60

Phe Thr Val Thr Asn Pro Pro Arg Thr Val Ser Val Ser Thr Leu Met
65 70 75 80

Asp Gly Arg Ile Asp His Val Glu Leu Ser Ala Arg Val Ala Trp Met
85 90 95

Ser Glu Ser Gln Leu Ala Ser Glu Ile Leu Val Ile Ala Asp Leu Ala
100 105 110

Arg Gln Lys Ala Gln Ser Ala Gln Tyr Ala Phe Ile Leu Asp Arg Met
115 120 125

Ser Gln Gln Val Asp Ala Asp Glu His Arg Val Ala Leu Leu Arg Lys
130 135 140

Thr Val Gly Glu Thr Trp Gly Leu Pro Ser Pro Glu Glu Ala Ala Ala
145 150 155 160

Ala Glu Ala Glu Val Phe Ala Thr Arg Tyr Ser Asp Asp Cys Pro Ala
165 170 175

Pro Asp Asp Glu Ser Asp Pro Trp
180

<210> 6

<211> 81

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 6

Met Ser Gly His Ala Leu Ala Ala Arg Thr Leu Leu Ala Ala Ala Asp
1 5 10 15

Glu Leu Val Gly Gly Pro Pro Val Glu Ala Ser Ala Ala Ala Leu Ala
20 25 30

Gly Asp Ala Ala Gly Ala Trp Arg Thr Ala Ala Val Glu Leu Ala Arg
35 40 45

Ala Leu Val Arg Ala Val Ala Glu Ser His Gly Val Ala Ala Val Leu
50 55 60

Phe Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg Gly Asp Pro
65 70 75 80

Pro

<210> 7

<211> 511

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 7

Met Ser Ala Pro Ala Val Ala Ala Gly Pro Thr Ala Ala Gly Ala Thr
1 5 10 15

Ala Ala Arg Pro Ala Thr Thr Arg Val Thr Ile Leu Thr Gly Arg Arg
20 25 30

Met Thr Asp Leu Val Leu Pro Ala Ala Val Pro Met Glu Thr Tyr Ile
35 40 45

Asp Asp Thr Val Ala Val Leu Ser Glu Val Leu Glu Asp Thr Pro Ala
 50 55 60

Asp Val Leu Gly Gly Phe Asp Phe Thr Ala Gln Gly Val Trp Ala Phe
 65 70 75 80

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Pro Leu Lys Leu Asp Gln Ser Leu Asp Asp
 85 90 95

Ala Gly Val Val Asp Gly Ser Leu Leu Thr Leu Val Ser Val Ser Arg
 100 105 110

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

Val Leu Asp Glu Ser Pro Glu Phe Asp Arg Thr Ala Leu Asn Arg Phe
 130 135 140

Val Gly Ala Ala Ile Pro Leu Leu Thr Ala Pro Val Ile Gly Met Ala
 145 150 155 160

Met Arg Ala Trp Trp Glu Thr Gly Arg Ser Leu Trp Trp Pro Leu Ala
 165 170 175

Ile Gly Ile Leu Gly Ile Ala Val Leu Val Gly Ser Phe Val Ala Asn
 180 185 190

Arg Phe Tyr Gln Ser Gly His Leu Ala Glu Cys Leu Leu Val Thr Thr
 195 200 205

Tyr Leu Leu Ile Ala Thr Ala Ala Ala Leu Ala Val Pro Leu Pro Arg
 210 215 220

Gly Val Asn Ser Leu Gly Ala Pro Gln Val Ala Gly Ala Ala Thr Ala
 225 230 235 240

Val Leu Phe Leu Thr Leu Met Thr Arg Gly Gly Pro Arg Lys Arg His
 245 250 255

Glu Leu Ala Ser Phe Ala Val Ile Thr Ala Ile Ala Val Ile Ala Ala
 260 265 270

Ala Ala Ala Phe Gly Tyr Gly Tyr Gln Asp Trp Val Pro Ala Gly Gly
 275 280 285

Ile Ala Phe Gly Leu Phe Ile Val Thr Asn Ala Ala Lys Leu Thr Val
 290 295 300

Ala Val Ala Arg Ile Ala Leu Pro Pro Ile Pro Val Pro Gly Glu Thr
305 310 315 320

Val Asp Asn Glu Glu Leu Leu Asp Pro Val Ala Thr Pro Glu Ala Thr
325 330 335

Ser Glu Glu Thr Pro Thr Trp Gln Ala Ile Ile Ala Ser Val Pro Ala
340 345 350

Ser Ala Val Arg Leu Thr Glu Arg Ser Lys Leu Ala Lys Gln Leu Leu
355 360 365

Ile Gly Tyr Val Thr Ser Gly Thr Leu Ile Leu Ala Ala Gly Ala Ile
370 375 380

Ala Val Val Val Arg Gly His Phe Phe Val His Ser Leu Val Val Ala
385 390 395 400

Gly Leu Ile Thr Thr Val Cys Gly Phe Arg Ser Arg Leu Tyr Ala Glu
405 410 415

Arg Trp Cys Ala Trp Ala Leu Leu Ala Ala Thr Val Ala Ile Pro Thr
420 425 430

Gly Leu Thr Ala Lys Leu Ile Ile Trp Tyr Pro His Tyr Ala Trp Leu
435 440 445

Leu Leu Ser Val Tyr Leu Thr Val Ala Leu Val Ala Leu Val Val Val
450 455 460

Gly Ser Met Ala His Val Arg Arg Val Ser Pro Val Val Lys Arg Thr
465 470 475 480

Leu Glu Leu Ile Asp Gly Ala Met Ile Ala Ala Ile Ile Pro Met Leu
485 490 495

Leu Trp Ile Thr Gly Val Tyr Asp Thr Val Arg Asn Ile Arg Phe
500 505 510

<210> 8

<211> 18

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 8

Ala Trp Arg Thr Ala Ala Val Glu Leu Ala Arg Ala Leu Val Arg Ala
1 5 10 15

Val Ala

<210> 9
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 9

Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu
20 25

<210> 10
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 10

Gly Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln
1 5 10 15

Val Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln
20 25

<210> 11
<211> 26
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11

Asp Gln Val Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly
1 5 10 15

Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val
20 25

<210> 12
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 12

Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala
1 5 10 15

Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu Leu Asp
20 25

<210> 13
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 13

Ala Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile
1 5 10 15

Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser Arg
20 25

<210> 14
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 14

Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln
1 5 10 15

Gln Ala Leu Ser Ser Gln Met Gly Phe
20 25

<210> 15
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 15

Leu Asn Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala Leu Gly Ser Ser Leu His
1 5 10 15

Thr Ala Gly Val
20

<210> 16
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 16

Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
1 5 10 15

Arg Ile Ala Ala
20

<210> 17
<211> 20
<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 17

Asp Leu Ala Lys Ser Leu Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala
1 5 10 15

Asp Glu Ala Trp
20

<210> 18

<211> 19

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 18

Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys Ala Ile Asp Gly
1 5 10 15

Leu Phe Thr

<210> 19

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 19

Pro Ser Phe Leu Lys Val Leu Ala Gly Met His Asn Glu Ile Val Gly
1 5 10 15

Asp Ile Lys Arg
20

<210> 20

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 20

Gly Met His Asn Glu Ile Val Gly Asp Ile Lys Arg Ala Thr Asp Thr
1 5 10 15

Val Ala Gly Ile
20

<210> 21

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 21

Asp Ile Lys Arg Ala Thr Asp Thr Val Ala Gly Ile Ser Gly Arg Val
1 5 10 15

Gln Leu Thr His
20

<210> 22
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 22

Asp Val Gln Ala Ala Glu Gly Ala Asp Ala Glu Ala Ala Ala Met Asp
1 5 10 15

Glu Trp Asp Glu
20

<210> 23
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 23

Ala Ala Ala Met Asp Glu Trp Asp Glu Trp Gln Ala Trp Asn Glu Trp
1 5 10 15

Val Ala Glu Asn
20

<210> 24
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 24

Ala Trp Asn Glu Trp Val Ala Glu Asn Ala Glu Pro Arg Phe Glu Val
1 5 10 15

Pro Arg Ser Ser
20

<210> 25
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 25

Pro Arg Phe Glu Val Pro Arg Ser Ser Ser Ser Val Ile Pro His Ser
1 5 10 15

Pro Ala Ala Gly
20

<210> 26
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 26

Val Asp Leu Pro Gly Asn Asp Phe Asp Ser Asn Asp Phe Asp Ala Val
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 27
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 27

Ser Asn Asp Phe Asp Ala Val Asp Leu Trp Gly Ala Asp Gly Ala Glu
1 5 10 15

Gly Trp

<210> 28
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 28

Trp Gly Ala Asp Gly Ala Glu Gly Trp Thr Ala Asp Pro Ile Ile Gly
1 5 10 15

Val Gly

<210> 29
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 29

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

Gly Pro

<210> 30
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 30

Ser Ala Ala Thr Pro Asp Thr Gly Pro Asp Leu Asp Asn Ala His Gly
1 5 10 15

Gln Ala

<210> 31
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 31

Asp Leu Asp Asn Ala His Gly Gln Ala Glu Thr Asp Thr Glu Gln Glu
1 5 10 15

Ile Ala

<210> 32
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 32

Glu Thr Asp Thr Glu Gln Glu Ile Ala Leu Phe Thr Val Thr Asn Pro
1 5 10 15

Pro Arg

<210> 33
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33

Leu Phe Thr Val Thr Asn Pro Pro Arg Thr Val Ser Val Ser Thr Leu
1 5 10 15

Met Asp

<210> 34
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 34

Thr Val Ser Val Ser Thr Leu Met Asp Gly Arg Ile Asp His Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser

<210> 35

<211> 18

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 35

Gly Arg Ile Asp His Val Glu Leu Ser Ala Arg Val Ala Trp Met Ser
1 5 10 15

Glu Ser

<210> 36

<211> 18

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 36

Ala Arg Val Ala Trp Met Ser Glu Ser Gln Leu Ala Ser Glu Ile Leu
1 5 10 15

Val Ile

<210> 37

<211> 18

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 37

Gln Leu Ala Ser Glu Ile Leu Val Ile Ala Asp Leu Ala Arg Gln Lys
1 5 10 15

Ala Gln

<210> 38

<211> 18

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 38

Ala Asp Leu Ala Arg Gln Lys Ala Gln Ser Ala Gln Tyr Ala Phe Ile

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 39
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 39

Ser Ala Gln Tyr Ala Phe Ile Leu Asp Arg Met Ser Gln Gln Val Asp
1 5 10 15

Ala Asp

<210> 40
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 40

Arg Met Ser Gln Gln Val Asp Ala Asp Glu His Arg Val Ala Leu Leu
1 5 10 15

Arg Lys

<210> 41
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 41

Glu His Arg Val Ala Leu Leu Arg Lys Thr Val Gly Glu Thr Trp Gly
1 5 10 15

Leu Pro

<210> 42
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 42

Thr Val Gly Glu Thr Trp Gly Leu Pro Ser Pro Glu Glu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Glu

<210> 43
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 43

Ser Pro Glu Glu Ala Ala Ala Ala Glu Ala Glu Val Phe Ala Thr Arg
1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 44
<211> 18
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 44

Ala Glu Val Phe Ala Thr Arg Tyr Ser Asp Asp Cys Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15

Asp Glu

<210> 45
<211> 13
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 45

Asp Asp Cys Pro Ala Pro Asp Asp Glu Ser Asp Pro Trp
1 5 10

<210> 46
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 46

Ala Val Pro Leu Pro Arg Gly Val Asn Ser Leu Gly Ala Pro Gln Val
1 5 10 15

Ala Gly Ala Ala
20

<210> 47
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 47

Gly Ala Pro Gln Val Ala Gly Ala Ala Thr Ala Val Leu Phe Leu Thr
1 5 10 15

Leu Met Thr Arg
20

<210> 48

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 48

Val Leu Phe Leu Thr Leu Met Thr Arg Gly Gly Pro Arg Lys Arg His
1 5 10 15

Glu Leu Ala Ser
20

<210> 49

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 49

Pro Arg Lys Arg His Glu Leu Ala Ser Phe Ala Val Ile Thr Ala Ile
1 5 10 15

Ala Val Ile Ala
20

<210> 50

<211> 21

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 50

Val Ile Thr Ala Ile Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Ala Phe Gly Tyr
1 5 10 15

Gly Tyr Gln Asp Trp
20

<210> 51

<211> 95

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 51

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
1 5 10 15

Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
20 25 30

Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
35 40 45

Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu
50 55 60

Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
65 70 75 80

Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
85 90 95

<210> 52
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 52

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
1 5 10 15

Ala Ile Gln Gly
20

<210> 53
<211> 16
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 53

Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile
1 5 10 15

<210> 54
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 54

Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu
1 5 10 15

Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala
20 25

<210> 55

<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 55

Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln
20 25

<210> 56
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 56

Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr
1 5 10 15

Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln
20 25

<210> 57
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 57

Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile
1 5 10 15

Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser
20 25

<210> 58
<211> 25
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 58

Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile
1 5 10 15

Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser
20 25

<210> 59
<211> 20
<212> Белок
<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 59

Val Tyr Leu Thr Ala His Asn Ala Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala
1 5 10 15

Gly Val Asp Leu
20

<210> 60

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 60

Leu Gly Ser Ser Leu His Thr Ala Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu
1 5 10 15

Arg Ile Ala Ala
20

<210> 61

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 61

Gly Val Asp Leu Ala Lys Ser Leu Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser
1 5 10 15

Glu Ala Asp Glu
20

<210> 62

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 62

Arg Ile Ala Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys
1 5 10 15

Ala Ile Asp Gly
20

<210> 63

<211> 20

<212> Белок

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 63

Ala Lys Ile Tyr Ser Glu Ala Asp Glu Ala Trp Arg Lys Ala Ile Asp
1 5 10 15

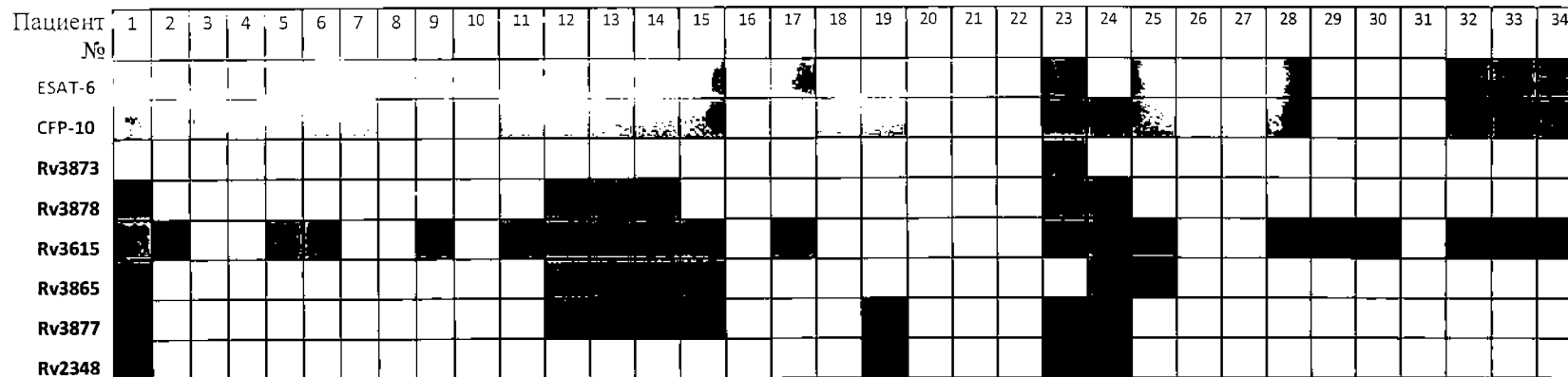
Gly Leu Phe Thr
20

Формула изобретения

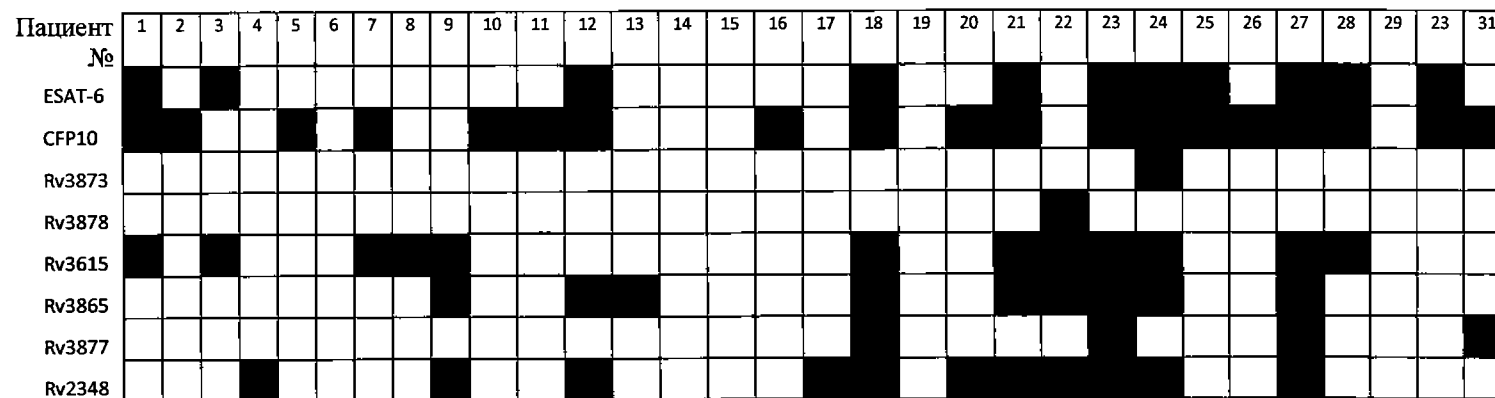
- 1) Диагностическая композиция, содержащая смесь практически чистых полипептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей, выбранных из
- 5 а) Rv3874 (SEQ ID NO 1), Rv3615 (SEQ ID NO 2) и одного или нескольких из Rv3865 (SEQ ID NO 3), Rv2348 (SEQ ID NO 4), Rv3614 (SEQ ID NO 5), Rv2654 (SEQ ID NO 6) и Rv3877 (SEQ ID NO 7),
- или б)
- 10 фрагментов, содержащих иммуногенные эпитопы из указанных полипептидов, или с),
- где в выбранной смеси последовательности полипептидов или фрагментов указанных полипептидов по меньшей мере на 80% идентичны любому из полипептидов из набора а) или б), и при этом она является иммуногенной.
- 15
- 2) Диагностическая композиция по п. 1, содержащая Rv3874 (SEQ ID NO 1), Rv3615 (SEQ ID NO 2) и Rv3865 (SEQ ID NO 3) или фрагменты, содержащие их иммуногенные эпитопы.
- 20 3) Диагностическая композиция по п. 1, содержащая Rv3874 (SEQ ID NO 1), Rv3615 (SEQ ID NO 2) и Rv2348 (SEQ ID NO 4) или фрагменты, содержащие их иммуногенные эпитопы.
- 4) Диагностическая композиция по п. 1, содержащая Rv3874 (SEQ ID NO 1),
- 25 Rv3615 (SEQ ID NO 2) и Rv3877 (SEQ ID NO 7) или фрагменты, содержащие их иммуногенные эпитопы.
- 5) Диагностическая композиция по п. 1, содержащая Rv3874 (SEQ ID NO 1), Rv3615 (SEQ ID NO 2), Rv3865 (SEQ ID NO 3) и Rv2348 (SEQ ID NO 4) или фраг-
- 30 менты, содержащие их иммуногенные эпитопы.
- 6) Диагностическая композиция по любому из пп. 1-4, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 1, выбраны из SEQ ID NO 9-14.

- 7) Диагностическая композиция по любому из пп. 1-4, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 2, выбраны из SEQ ID NO 15-18 или SEQ ID NO 59-63.
- 5 8) Диагностическая композиция по любому из пп. 1-7, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 3, выбраны из SEQ ID NO 19-21.
- 9) Диагностическая композиция по любому из пп. 1-7, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 4, выбраны из SEQ ID NO 22-25.
- 10 10) Диагностическая композиция по любому из пп. 1-7, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 5, выбраны из SEQ ID NO 26-45.
- 11) Диагностическая композиция по любому из пп. 1-7, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 6, представляют собой SEQ ID NO 8.
- 15 12) Диагностическая композиция по любому из пп. 1-7, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 7, выбраны из SEQ ID NO 46-50.
- 20 13) Диагностическая композиция по любому из пп. 1-12, дополнительно содержащая Rv3875 (SEQ ID NO 51) или один или несколько его фрагментов.
- 14) Диагностическая композиция по п. 13, где указанные фрагменты и
25 фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из SEQ ID NO 51, выбраны из SEQ ID NO 52-58.
- 15) Диагностическая композиция по п. 1, где фрагменты, содержащие иммуногенные эпитопы из указанных полипептидов, присутствуют в виде перекрывающихся пептидов по меньшей мере из 10 аминокислот в длину.
- 30 16) Диагностическая композиция по п. 5, где смесь содержит SEQ ID NO 9-25.
- 35 17) Диагностическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где некоторые или все из полипептидов слиты вместе необязательно посредством линкеров или спейсеров.

- 18) Применение диагностических композиций по любому из предыдущих пунктов для получения фармацевтической композиции для диагностики ТВ, вызванного вирулентными микобактериями, например, *Mycobacterium tuberculosis*,
5 *Mycobacterium bovis* или *Mycobacterium africanum*.
- 19) Средство или набор для СМІ диагностики, содержащие диагностическую композицию по любому из пп. 1-17.
- 10 20) Средство или набор для СМІ диагностики по п. 19, предназначенные для *in vitro* или *in vivo* диагностики туберкулеза.
- 21) Способ *in vitro* или *in vivo* диагностики туберкулеза, вызванного вирулентными микобактериями, например, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* или *Mycobacterium bovis*, у животного, в том числе человека, при помощи
15 диагностической композиции по любому из пп. 1-17.
- 22) Способ диагностики туберкулеза по п. 21, включающий внутривенную инъекцию животному диагностической композиции, определенной выше, где положительная кожная реакция в месте инъекции указывает на то, что у животного имеется туберкулез, а отрицательная кожная реакция в месте инъекции указывает на то, что у животного отсутствует туберкулез.
- 20 23) Способ диагностики туберкулеза по п. 16, включающий
25 приведение в контакт образца, например, образца крови, с диагностической композицией согласно настоящему изобретению для выявления положительной реакции, например, пролиферации клеток или высвобождения цитокинов, таких как IFN- γ или IP-10.



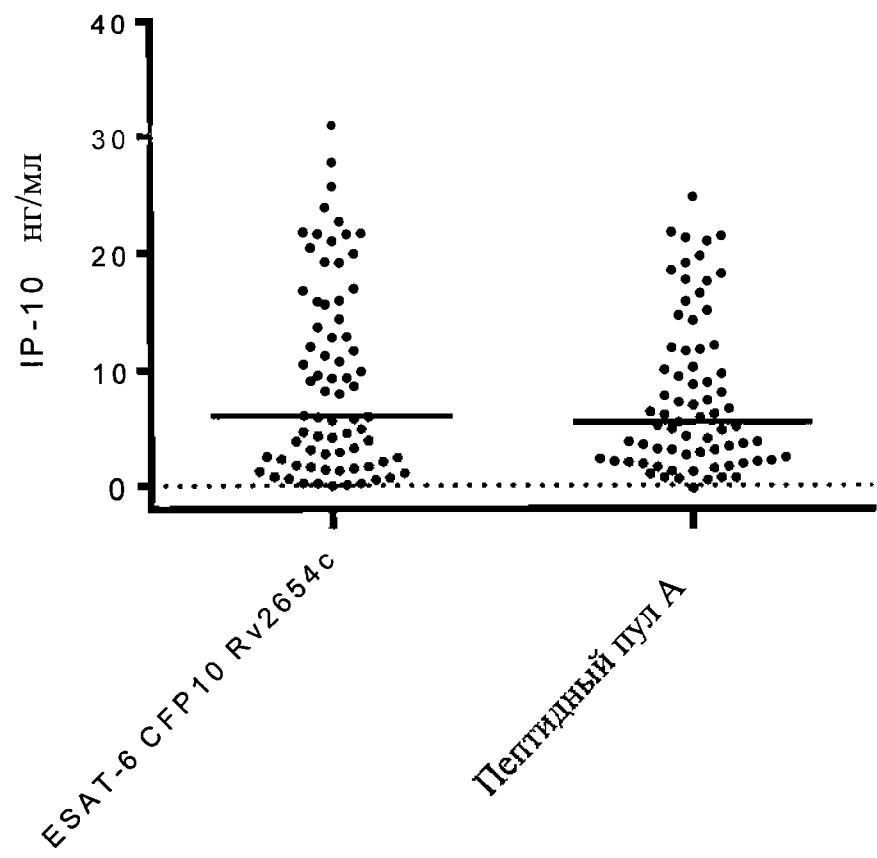
Фиг. 1



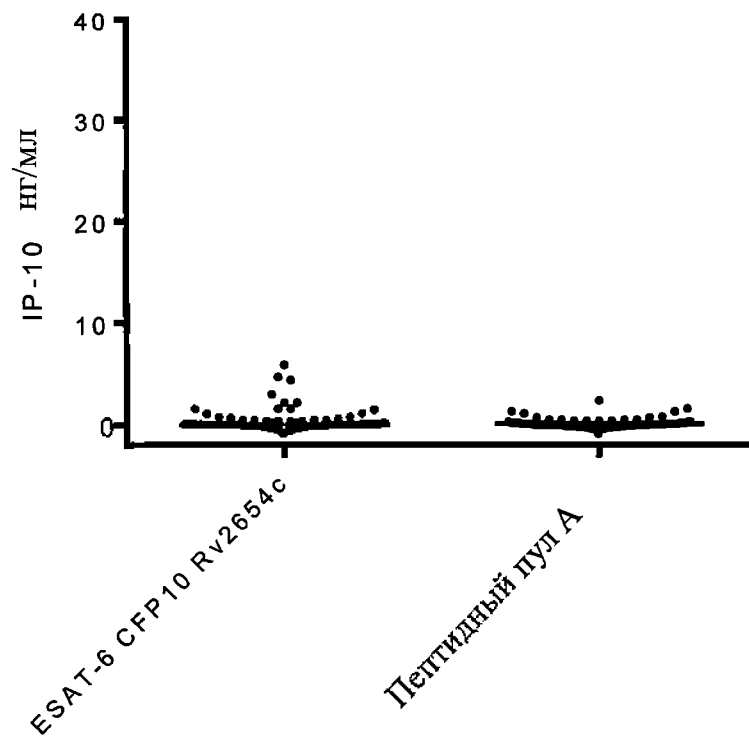
Фиг. 2

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

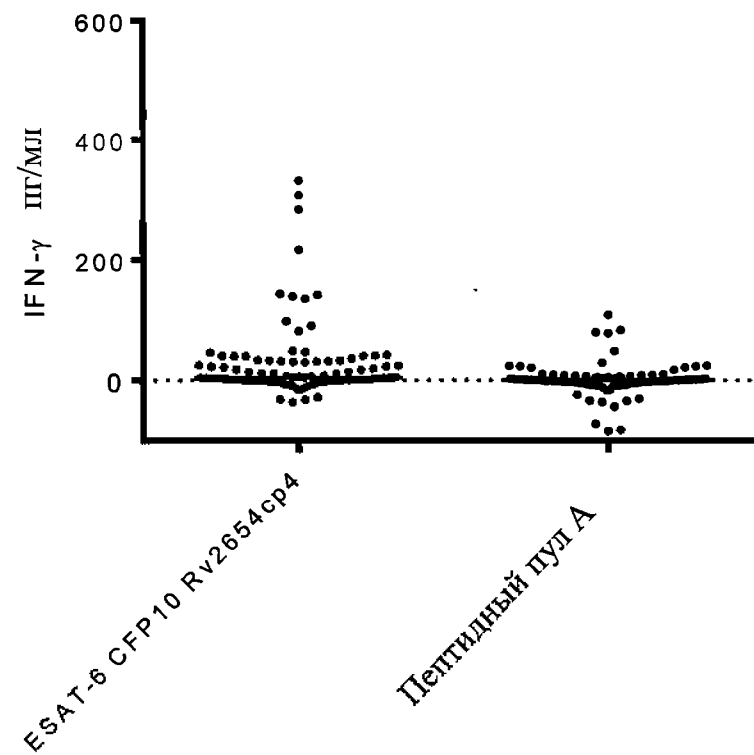
Фиг. 3



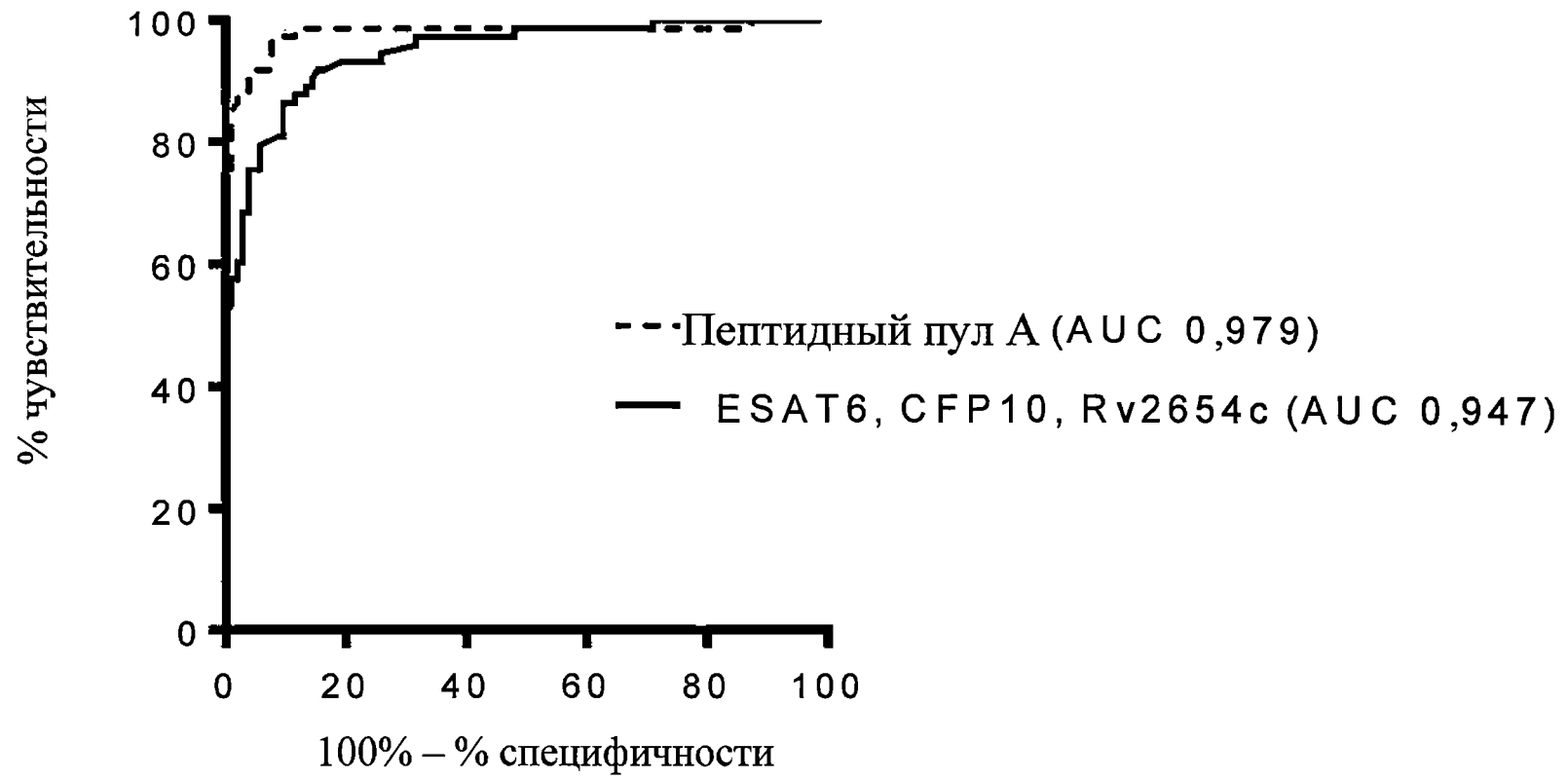
Фиг. 4



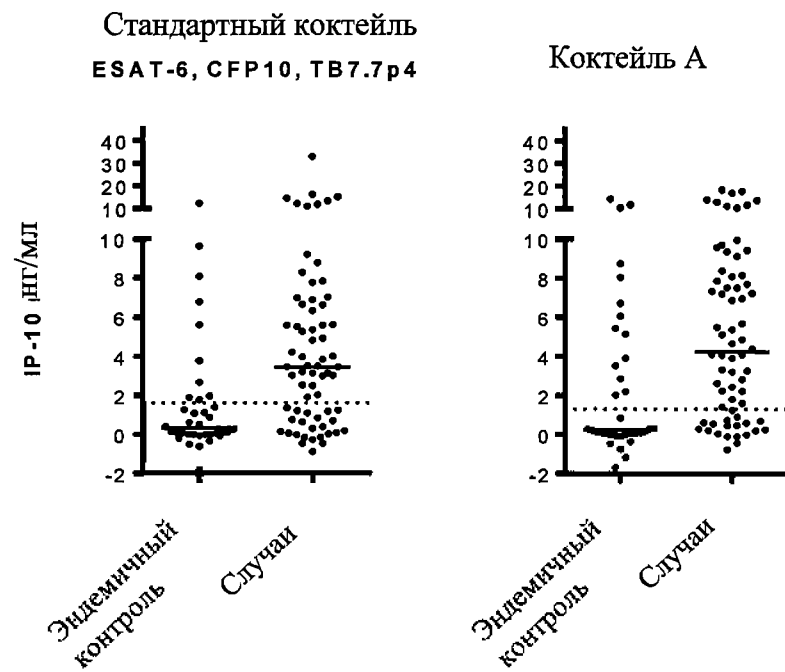
Фиг. 5



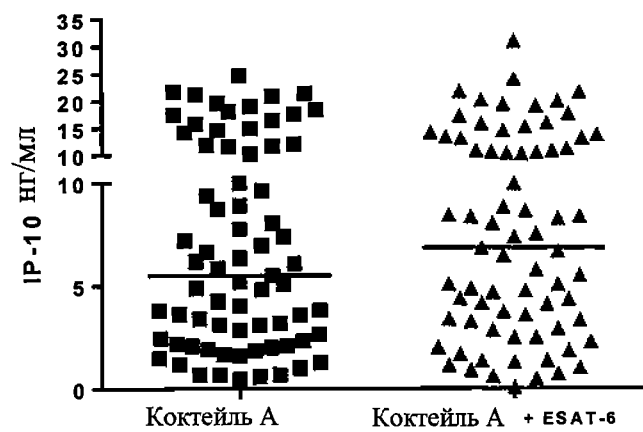
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9