

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490499

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.04.22

(22) Дата подачи заявки  
2022.08.30

(51) Int. Cl. C07K 14/35 (2006.01)  
C12N 9/10 (2006.01)  
C12N 9/52 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01)  
C12N 15/869 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)  
A61K 39/04 (2006.01)

(54) ВАКЦИНЫ ОТ ТУБЕРКУЛЕЗА

(31) 63/239,278; 63/392,778

(32) 2021.08.31; 2022.07.27

(33) US

(86) PCT/US2022/075645

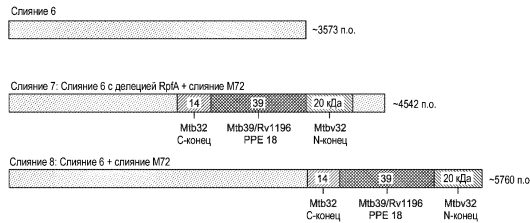
(87) WO 2023/034783 2023.03.09

(71) Заявитель:  
ВИР БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Арвин Анн М., Ди Юлио Джулия,  
Дуглас Дженет Л., Маршалл Эмили,  
Сориага Ли Б., Вирджин Герберт В.  
(US)

(74) Представитель:  
Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина  
Д.В., Алексеев В.В., Буре Н.Н. (RU)

(57) Данное изобретение относится к туберкулезным антигенам и векторам для доставки этих антигенов. Данное изобретение также относится к содержащим их иммуногенным композициям и их применению.



A1

202490499

202490499

A1

## ВАКЦИНЫ ОТ ТУБЕРКУЛЕЗА

Пояснение в отношении Перечня последовательностей.

5 Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, предоставлен в формате XML вместо бумажной копии и включен в описание посредством ссылки. XML-файл, содержащий Перечень последовательностей, имеет название 930485\_439WO\_SequenceListing.xml. XML-файл имеет размер 558770 байт, был создан 22 августа 2022 г. и был подан в электронной форме посредством EFS-Web.

Уровень техники

10 Туберкулез остается основной причиной заболеваемости и смертности в мировом масштабе (Schito, M et al. Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines. Clin Infect Dis. 61 Suppl 3, S102-118 (2015)). Соответственно, остается потребность в эффективных превентивных или терапевтических вакцинах от инфекций *Mycobacterium tuberculosis*.

15 Было обнаружено, что вакцинные векторы на основе цитомегаловируса (CMV) вызывают сильные иммунные ответы на доставляемые антигены, даже в случае патогенов, которые традиционно были способны избегать естественного иммунитета и вызывать повторные или хронические инфекции. Например, штамм 68-1 цитомегаловируса (RhCMV) резусов, модифицированный для кодирования вируса иммунодефицита обезьян (SIV), был связан с долгосрочной защитой при стимуляции SIV (Hansen, SG et al., Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. Nature 502, 100–104 (2013); Hansen, SG et al., Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. Nature 473, 523–527 (2011); Hansen, SG et al., Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. Nat Med. 15, 293–299 (2009)). Последующее исследование с CMV-векторами показало, что можно вызывать разные иммунные ответы в зависимости от конкретных генетических компонентов остова CMV (Früh, K et al., CD8+ T cell programming by cytomegalovirus vectors: applications in prophylactic and therapeutic vaccination. Curr Opin Immunol. 47, 52–56 (2017); Hansen, SG et al. Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms. Science 340, 1237874 (2013)).

30 Было показано, что 68-1 цитомегаловируса (RhCMV) резусов индуцирует CD8+ Т-клетки, которые распознают пептиды, презентруемые ГКГС-II и ГКГС-E вместо традиционных ГКГС-I. Этот эффект также наблюдали для CMV яванских макаков (СуCMV), продемонстрировав, что удаление RhCMV- и СуCMV-гомологов HCMV UL128, UL130, UL146 и UL147 делает возможной индукцию ГКГС-E-ограниченных CD8+ Т-

клеток (публикации международных заявок №№ WO2016/130693A1, WO2018/075591A1). Кроме того, эти векторы индуцируют ГКГС-II-рестриктированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Индукцию ГКГС-II-рестриктированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток можно устранить путем вставки нацеливающего сайта для специфической в отношении эндотелиальных клеток микроРНК (miR) 126 в ключевые вирусные гены этих векторов, что приводит к получению «только

5 ГКГС-E» векторов, которые индуцируют исключительно ГКГС-E-рестриктированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки (публикация международной заявки № WO2018/075591A1). В отличие от этого, было показано, что вставка специфической в отношении миелоидных клеток miR142-3p в 68-1 RhCMV предотвращает индукцию ГКГС-E-рестриктированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток,

10 что приводит к получению векторов, которые индуцируют CD8<sup>+</sup> Т-клетки, рестриктированные исключительно по ГКГС-II (публикация международной заявки № WO2017/087921A1). Также было показано, что удаление гомолога UL40 Rh67 предотвращает индукцию ГКГС-E рестриктированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, что приводит к получению «только ГКГС-II векторов»-(публикация международной заявки №

15 WO2016/130693A1). Соответственно, за счет конструирования CMV-векторов, имеющих конкретные генные делеции, CMV можно использовать для доставки антигенов и «программирования» иммунных ответов на эти антигены.

#### Краткое описание сущности изобретения

В данном документе описаны слитые белки, содержащие антигены *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), и нуклеиновые кислоты, кодирующие слитые белки. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий

20 один или более из Mtb Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35, или их частей или фрагментов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены векторы, кодирующие слитый белок, описанный выше.

#### 25 Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 проиллюстрированы примеры слитых белков, содержащих антигены Mtb.

На Фиг. 2 проиллюстрированы слитые белки слияние 6, слияние 7 и слияние 8, содержащие антигены Mtb. «M72» на фигуре относится к M72-слиянию-2.

На Фиг. 3 приведена общая информация по консервативности белков антигенов Mtb

30 и вариантов RpfA. В аналитику по всем антигенам Mtb и вариантам RpfA было включено всего 4884 штаммов/изолятов. Число выровненных изолятов на аминокислотную позицию указано на фигуре. Изоляты, аннотированные «Rv0867c», были включены в анализ вариантов RpfA.

На Фиг. 4 проиллюстрирована переменная длина белка RpfA среди изолятов Mtb.

35 Обведенные участки указывают группы изолятов с разными категориями усечений и/или

делеций.

На Фиг. 5 проиллюстрировано географическое распределение полноразмерных вариантов RpfA. Анализ проводили на группе изолятов, помеченной «изоляты с полноразмерным белком», с Фиг. 4. Показаны первые двадцать географических локаций с 5 наибольшей долей изолятов, несущих гены полноразмерного RpfA. Длина полноразмерного RpfA была определена как составляющая более 400 аминокислот. Отметка «отсутствует» по оси у относится к изолятам с неизвестной информацией о локации.

На Фиг. 6A–6L проиллюстрированы частоты «отвечающих» (цитокин- 10 экспрессирующих) CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток (как указано) в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), выделенных у макаков-резусов, которым вводили вирусные векторы, экспрессирующие слияние 6 под управлением промотора UL78 или UL82. МКПК собирали в недели 0, 2, 4, 6, 8 и 10 после введения дозы и стимулировали пептидными пулами Mtb, содержащими пептиды из генов, экспрессируемых в слиянии 6 15 (Ag58A (Фиг. 6A–6B), Rv2626 (Фиг. 6C–6D), RpfA (Фиг. 6E–6F), ESAT6 (Фиг. 6G–6H), Rv3407 (Фиг. 6I–6J) или RpfD (Фиг. 6K–6L)), перед внутриклеточным окрашиванием цитокинов (ВОК). Сплошными линиями указана доза вирусного вектора 10<sup>6</sup> БОЕ, пунктирными линиями указана доза вирусного вектора 10<sup>5</sup> БОЕ.

На Фиг. 7A–7N проиллюстрированы частоты «отвечающих» (цитокин- 20 экспрессирующих) CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток (как указано) в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), выделенных у макаков-резусов, которым вводили вирусные векторы, экспрессирующие слияние 7 под управлением промотора UL78 или UL82 или слияние 8 под управлением промотора UL82. МКПК собирали в недели 0, 2, 4 и 6 после введения дозы и стимулировали пептидными пулами Mtb, содержащими пептиды 25 из генов, экспрессируемых в слиянии 6 (Ag58A (Фиг. 7A–7B), Rv2626 (Фиг. 7C–7D), RpfA (Фиг. 7E–7F), ESAT6 (Фиг. 7G–7H), Rv3407 (Фиг. 7I–7J) или RpfD (Фиг. 7K–7L)) и M72-слияние-2 (помеченное «M72» на Фиг. 7M–7N), перед внутриклеточным окрашиванием цитокинов (ВОК). Сплошными линиями указана доза вирусного вектора 10<sup>6</sup> БОЕ, пунктирными линиями указана доза вирусного вектора 10<sup>5</sup> БОЕ.

На Фиг. 8 обобщены потенциальные показания для вектора 4 (SEQ ID NO: 44). «ТБ» 30 относится к туберкулезу. «ОЧП» относится к отличным от человека приматам.

На Фиг. 9 проиллюстрирован план разработки для оценки вектора 4 (SEQ ID NO: 44) для применения в предотвращении туберкулеза легких у подростков и взрослых.

На Фиг. 10 проиллюстрирован план разработки для оценки вектора 4 (SEQ ID NO: 35 44) для применения в предотвращении инфекции Mtb и предотвращении рецидива

туберкулеза у подростков и взрослых.

## Подробное описание

### I. Словарь

5 В следующих разделах приведено подробное описание туберкулезных антигенов и связанных с ними фармацевтических композиций и способов индукции иммунного ответа, такого как иммунный ответ против *Mycobacterium tuberculosis*, а также способов лечения или предотвращения туберкулеза. Перед более подробным изложением данного изобретения, для его понимания может быть полезно привести определения некоторых  
10 используемых в данном документе терминов. Дополнительные определения приведены в тексте данного изобретения.

Если контекст не подразумевает иное, в тексте представленного описания и формулы изобретения слово «содержать» и его вариации, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать в открытом включительном смысле, то есть, как  
15 «включающий, но не ограничивающийся этим». «Состоящий из» означает исключение более чем следовых элементов других ингредиентов и существенных этапов способов, описанных в данном документе, и в случае аминокислотной или нуклеотидной последовательности, исключение дополнительных аминокислот или нуклеотидов, соответственно. Термин «состоящий преимущественно из» ограничивает объем пункта  
20 формулы изобретения указанными материалами или этапами или теми, которые не оказывают материального влияния на основные характеристики заявленного изобретения. Например, в композиции, состоящей преимущественно из элементов, определенных в данном документе, не исключается наличие следовых примесей от способа выделения и очистки и фармацевтически приемлемых носителей, таких как фосфатно-солевой  
25 буферный раствор, консервантов и т. п. Аналогично, белок состоит преимущественно из конкретной аминокислотной последовательности, когда белок содержит дополнительные аминокислоты, которые составляют не более 20 % длины белка и не оказывают существенного влияния на активность белка (например, изменяют активность белка не более чем на 50 %). Варианты осуществления, определяемые каждым из переходных  
30 терминов, входят в объем данного изобретения.

В представленном описании термин «около» означает  $\pm 20\%$  от указанных диапазона, значения или структуры, если не указано иное.

Следует понимать, что в контексте данного документа термины в единственном числе включают «один или более» пронумерованных компонентов, если не указано иное.

35 Использование альтернативного варианта (например, «или») следует понимать как

означающее один, оба или любую комбинацию альтернативных вариантов, и может использоваться как синоним «и/или». В контексте данного документа термины «включать» и «иметь» используются как синонимы, при этом данные термины и их варианты следует считать неограничивающими.

5 Слово «практически» не исключает «полностью»; например, композиция, которая «практически не содержит» Y может вообще не содержать Y. При необходимости слово «практически» может быть исключено из предложенных в данном документе определений.

В контексте данного документа термины «пептид», «полипептид» и «белок», а также вариации этих терминов, относятся к молекуле, в частности пептиду, олигопептиду или  
10 белку, включая слитый белок, соответственно, содержащей по меньшей мере две аминокислоты, соединенные друг с другом нормальной пептидной связью или модифицированной пептидной связью, например, как в случаях изостерических пептидов. Например, пептид, полипептид или белок может состоять из аминокислот, выбранных из  
15 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом, связанных друг с другом нормальной пептидной связью («классический» полипептид). Пептид, полипептид или белок может состоять из L-аминокислот и/или D-аминокислот. В частности, термины «пептид», «полипептид» и «белок» также включают «пептидомиметики», которые определяются как пептидные аналоги, содержащие непептидные структурные элементы, при этом такие пептиды способны имитировать или антагонизировать биологическое действие природного  
20 родительского пептида. У пептидомиметика отсутствуют характеристики классического пептида, такие как ферментативно расщепляемые пептидные связи. В частности, пептид, полипептид или белок может содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом, помимо этих аминокислот, или он может состоять из аминокислот, отличных от 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом. В  
25 частности, пептид, полипептид или белок в контексте настоящего изобретения может в равной мере состоять из аминокислот, модифицируемых естественными процессами, такими как процессы посттрансляционного созревания, или химическими процессами, которые хорошо известны специалисту в данной области техники. Такие модификации полностью подробно описаны в литературе. Эти модификации могут присутствовать в  
30 любом месте в полипептиде: в пептидном скелете, в аминокислотной цепи или даже на карбокси- или амино-концах. В частности, пептид или полипептид может быть разветвленным после убиквитинирования или быть циклическим с разветвлением или без. Этот тип модификации может быть результатом природных или синтетических посттрансляционных процессов, которые хорошо известны специалисту в данной области  
35 техники. В частности, термины «пептид», «полипептид» или «белок» в контексте

настоящего изобретения также включают модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Например, пептидные, полипептидные или белковые модификации могут включать ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентную фиксацию нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентную фиксацию липида или липидного производного, ковалентную фиксацию фосфатидилинозитола, ковалентное или нековалентное перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, гликозилирование, включая пэгилирование, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристиолирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, сенолоилирование, сульфатацию, добавление аминокислоты, например аргинина, или убиквитинирование. Такие модификации полностью подробно описаны в литературе. (Proteins Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, New York (1993); Post-translational Covalent Modifications of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter, et al., Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182:626-46 (1990); и Rattan, et al., Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci 663:48-62(1992)). Соответственно, термины «пептид», «полипептид» и «белок» включают, например, липопептиды, липопротеины, гликопептиды, гликопротеины и т. п.

«Ортологи» белков, как правило, характеризуются наличием более чем 75 % идентичности последовательности, рассчитываемой при выравнивании на протяжении полной длины с аминокислотной последовательностью конкретного белка с использованием алгоритма выравнивая, например программы ALIGN (версия 2.0) с установленными параметрами по умолчанию. Белки с даже большим сходством с эталонной последовательностью демонстрируют возрастающий процент идентичности при оценке этим способом, например по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 95 %, или по меньшей мере 98 % идентичности последовательности. Помимо этого, идентичность последовательности можно сравнивать вдоль полной длины конкретных доменов описанных пептидов.

В контексте данного документа «(поли)пептид» содержит одну цепь аминокислотных мономеров, соединенных пептидными связями, как объяснено выше. В контексте данного документа «белок» содержит один или более, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (поли)пептидов, т. е. одну или более цепей аминокислотных мономеров, связанных пептидными связями, как объяснено выше. В конкретных вариантах осуществления белок в соответствии с настоящим изобретением содержит 1, 2, 3 или 4 полипептида.

В контексте данного документа термины «нуклеиновая кислота», «молекула

нуклеиновой кислоты», «последовательность нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо и включают молекулы ДНК и молекулы РНК, включая, без ограничения, матричную РНК (мРНК), гибриды ДНК/РНК или синтетические нуклеиновые кислоты. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или частично или полностью  
5 двухцепочечной (дуплексной). Дуплексные нуклеиновые кислоты могут быть гомодуплексными или гетеродуплексными. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

В контексте данного документа подразумевается, что термин «кодирующая последовательность» относится к молекуле полинуклеотида, которая кодирует  
10 аминокислотную последовательность белкового продукта. Границы кодирующей последовательности в общем случае определяются открытой рамкой считывания, которая обычно начинается со стартового кодона ATG.

В контексте данного документа термин «экспрессия» относится к любому этапу, касающемуся выработки полипептида, включая транскрипцию, посттранскрипционную  
15 модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию, секрецию и т. п.

В контексте данного документа термин «вариант по последовательности» относится к любой последовательности, имеющей одно или более изменений по сравнению с эталонной последовательностью, при этом эталонная последовательность представляет собой любую из последовательностей, перечисленных в перечне последовательностей, т. е.  
20 от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 40. Таким образом, термин «вариант по последовательности» включает варианты по нуклеотидной последовательности и варианты по аминокислотной последовательности. В случае варианта по последовательности в контексте нуклеотидной последовательности эталонная последовательность также представляет собой нуклеотидную последовательность, а в случае варианта по  
25 последовательности в контексте аминокислотной последовательности эталонная последовательность также представляет собой аминокислотную последовательность. В контексте данного документа «вариант по последовательности» является по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичным эталонной  
30 последовательности. Идентичность последовательности обычно рассчитывают в отношении полной длины эталонной последовательности (т. е. последовательности, приведенной в заявке), если не указано иное. Процент идентичности согласно данному документу можно определять, например, используя различные способы выравнивания, известные в данной области техники, такие как BLAST с использованием параметров по  
35 умолчанию, определенных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации;



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [матрица Blosum 62; штраф за открытие гэпа = 1 и штраф за продление гэпа = 1]. «Вариант по последовательности» в контексте последовательности нуклеиновой кислоты (нуклеотидной последовательности) имеет измененную последовательность, в которой один или более нуклеотидов в эталонной последовательности удалены или замещены, или же один или более нуклеотидов вставлены в последовательность эталонной нуклеотидной последовательности. Нуклеотиды обозначены в данном документе с помощью стандартного однобуквенного обозначения (A, C, G или T). Вследствие вырожденности генетического кода «вариант по последовательности» нуклеотидной последовательности может приводить к изменению в соответствующей эталонной аминокислотной последовательности, т. е. к «варианту по аминокислотной последовательности», или нет. В определенных вариантах осуществления варианты по нуклеотидной последовательности представляют собой варианты, которые не приводят к вариантам по аминокислотной последовательности (т. е. содержат молчащие мутации). При этом варианты по нуклеотидной последовательности, приводящие к «не молчащим» мутациям, также входят в объем, в частности, такие варианты по нуклеотидной последовательности, которые приводят к получению аминокислотной последовательности, являющейся по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичной с эталонной аминокислотной последовательностью. «Вариант по последовательности» в контексте аминокислотной последовательности имеет измененную последовательность, в которой удалены, замещены или вставлены одна или более аминокислот по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью. В результате изменений такой вариант по последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичной эталонной аминокислотной последовательности. Например, на 100 аминокислот эталонной последовательности вариант по последовательности, имеющий не более 10 изменений, т. е. любую комбинацию делеций, вставок или замен, является «по меньшей мере на 90 % идентичным» эталонной последовательности.

Хотя возможны неконсервативные аминокислотные замены, в определенных вариантах осуществления замены представляю собой консервативные аминокислотные замены, при которых замещенная аминокислота имеет сходные структурные или химические свойства с соответствующей аминокислотой в эталонной последовательности. В качестве примера консервативные аминокислотные замены включают замену одной

алифатической или гидрофобной аминокислоты, например аланина, валина, лейцина и изолейцина, другой; замену одной гидроксил-содержащей аминокислоты, например серина и треонина, другой; замену одного кислого остатка, например глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, другим; замещение одного амид-содержащего остатка, например аспарагина и глутамина, другим; замещение одного ароматического остатка, например фенилаланина и тирозина, другим; замещение одного основного остатка, например лизина, аргинина и гистидина, другим; и замещение одной небольшой аминокислоты, например аланина, серина, треонина, метионина и глицина, другой.

Вставки аминокислотной последовательности включают amino- и/или карбокси-концевые слияния, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают слияние с N- или C-концом аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

Если не указано иное, изменения в вариантах по последовательности не устраняют функциональность соответствующей эталонной последовательности, например, в представленном случае, функциональность антигена или вектора, описанного в данном документе. Руководства по определению того, какие нуклеотиды и аминокислотные остатки, соответственно, можно замещать, вставлять или удалять без устранения такой функциональности, можно найти, используя компьютерные программы, известные в данной области техники.

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть кодон-оптимизированными, например, кодоны могут быть оптимизированными для использования в клетках человека. Например, таким образом можно изменять любую вирусную или бактериальную последовательность. Многие вирусы, включая ВИЧ и другие лентивирусы, используют большое количество редких кодонов, и за счет изменения этих кодонов так, чтобы они соответствовали кодонам, обычно используемым у необходимого субъекта, можно обеспечить повышенную экспрессию антигенов, как описано в André, S et al. (Increased Immune Response Elicited by DNA Vaccination with a Synthetic gp120 Sequence with Optimized Codon Usage. *J Virol.* 72, 1497-1503 (1998)).

В контексте данного документа последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, «полученная из» указанных нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, относится к происхождению нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность,

которая получена из конкретной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной последовательности, из которой она получена, или ее части, при этом «по существу идентичные» включает варианты по последовательности согласно определению выше. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного пептида или белка, получена из соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. Следовательно, «соответствующая» относится, в частности, к такой же функциональности. Например, «внеклеточный домен» соответствует другому «внеклеточному домену» (другого белка), или «трансмембранный домен» соответствует другому «трансмембранному домену» (другого белка). «Соответствующие» части пептидов, белков и нуклеиновых кислот, следовательно, могут быть идентифицированы специалистом в данной области техники. Аналогично, последовательности, «полученные из» других последовательностей, обычно могут быть идентифицированы специалистом в данной области техники, как происходящие из этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из других нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентичной исходным нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (из которых она получена). При этом последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из других нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может также иметь одну или более мутаций относительно исходных нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которых она получена), в частности последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из других нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может представлять собой функциональный вариант по последовательности, описанный выше, исходных нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которых она получена). Например, в пептиде/белке один или более аминокислотных остатков могут быть замещены другими аминокислотными остатками или могут присутствовать одна или более вставок или делеций аминокислотных остатков.

В контексте данного документа термин «мутация» относится к изменению в последовательности нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью. Мутация, например по сравнению с геномной последовательностью, может представлять собой, например (встречающуюся в природе) соматическую мутацию,

спонтанную мутацию, индуцированную мутацию, например, индуцированную ферментами, химическими веществами или излучением, или мутацию, обусловленную сайт-направленным мутагенезом (способы молекулярной биологии для создания специфических и преднамеренных изменений в последовательности нуклеиновой кислоты и/или аминокислотной последовательности). Таким образом, термины «мутация» или «мутирование» следует понимать как включающие также физическое создание мутации, например, в последовательности нуклеиновой кислоты или в аминокислотной последовательности. Мутация включает замену, делецию и вставку одного или более нуклеотидов или одной или более аминокислот, а также инверсию нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Некоторые типы мутаций кодирующей последовательности включают точечные мутации (различия в отдельных нуклеотидах или аминокислотах); молчащие мутации (различия в нуклеотидах, которые не приводят к аминокислотным изменениям); делеции (различия, при которых отсутствуют один или более нуклеотидов или одна или более аминокислот, вплоть до и включительно с делецией всей кодирующей последовательности гена); мутации со сдвигом рамки (различия, при которых делеция числа нуклеотидов, не делящегося на 3, приводит к изменению аминокислотной последовательности). Мутацию, которая приводит к различию в аминокислотах, также можно назвать мутацией аминокислотной замены. Мутации аминокислотных замен можно описать аминокислотным изменением относительно дикого типа в конкретной позиции в аминокислотной последовательности. Для обеспечения мутации в аминокислотной последовательности можно вносить мутацию в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную аминокислотную последовательность, с целью экспрессии (рекомбинантного) мутированного полипептида. Мутацию можно обеспечить, например, путем изменения, например путем сайт-направленного мутагенеза, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующего одну аминокислоту, для получения кодона, кодирующего отличную аминокислоту, или путем синтеза варианта по последовательности, например, зная нуклеотидную последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, и путем разработки синтеза молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида, без необходимости мутации одного или более нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты.

В контексте данного документа термин «рекомбинантный» (например, рекомбинантный белок, рекомбинантная нуклеиновая кислота, рекомбинантное антитело и т. д.) относится к любой молекуле (например, нуклеиновой кислоте, антителу и т. д.), которая получена, экспрессирована, создана или выделена рекомбинантными способами и

которая не встречается в природе. В отношении нуклеиновой кислоты или полипептида «рекомбинантный» относится к такому, который имеет последовательность, которая не встречается в природе, или имеет последовательность, которая создана путем искусственной комбинации двух или более в ином случае разделенных сегментов последовательности, например, CMV-вектору, содержащему гетерологичный антиген. Эту искусственную комбинацию часто осуществляют путем химического синтеза или, что более распространено, искусственной манипуляции с выделенными сегментами нуклеиновых кислот, например, с помощью технологий генной инженерии. Рекомбинантный полипептид также может относиться к полипептиду, который был создан с использованием рекомбинантных нуклеиновых кислот, включая рекомбинантные нуклеиновые кислоты, перенесенные в организм-хозяин, который не является естественным источником полипептида (например, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, который образуют CMV-вектор, содержащий гетерологичный антиген).

В контексте данного документа термин «вектор» относится к носителю, в который можно включать молекулы нуклеиновых кислот с конкретной последовательностью, а затем вносить в клетку-хозяина, тем самым получая трансформированную клетку-хозяина. Вектор может содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, такие как точка начала репликации. Вектор также может содержать один или более генов селективных маркеров и другие генетические элементы, известные в данной области техники, включая промоторные элементы, которые управляют экспрессией нуклеиновых кислот. Векторы могут представлять собой вирусные векторы, такие как CMV-векторы. Вирусные векторы можно конструировать из вирусов дикого типа или аттенуированных вирусов, включая дефектный по репликации вирус.

В контексте использования в данном документе термина «функционально связанный», первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты размещена таким образом, чтобы она имела эффект на вторую последовательность нуклеиновой кислоты. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть непрерывными или же могут функционировать на расстоянии.

В контексте данного документа термин «промотор» может относиться в любому числу регуляторных последовательностей нуклеиновых кислот, которые управляют транскрипцией нуклеиновой кислоты. Как правило, эукариотический промотор содержит необходимые последовательности нуклеиновой кислоты вблизи сайта инициации транскрипции, такие как, в случае промотора типа полимеразы II, ТАТА-элемент, или любую другую последовательность ДНК, которая распознается одним или более

транскрипционными факторами. Экспрессию промотором можно дополнительно модулировать с помощью энхансерных или репрессорных элементов. Многочисленные примеры промоторов доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники. Нуклеиновая кислота, содержащая промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный полипептид, может называться экспрессионным вектором. Промоторы могут быть получены из генов CMV, включая, но не ограничиваясь этим, UL82 и UL78.

В контексте данного документа термины «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» используются взаимозаменяемо, при этом все такие обозначения включают потомство. Таким образом, слова «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную рассматриваемую клетку и полученные от нее культуры вне зависимости от числа переносов. Также понятно, что все потомство может не быть точно идентичным по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Включено вариантное потомство, которое обладает такой же самой функцией или биологической активностью, что и отобранная первоначально трансформированная клетка. То, что предусмотрены различные обозначения, будет ясно из контекста.

В контексте данного документа термин «миРНК» относится к основному классу биомолекул, участвующих в регуляции генной экспрессии. Например, в сердце, печени или головном мозге человека миРНК играют роль в тканевой спецификации или определении клеточной линии дифференцировки. Кроме того, миРНК влияют на ряд процессов, включая раннее развитие, клеточную пролиферацию и клеточную гибель, а также апоптоз и метаболизм жиров. Большое число геном миРНК, разнообразные профили экспрессии и распространенность потенциальных мишеней миРНК позволяют предположить, что миРНК могут быть существенным источником генетического разнообразия. Зрелая миРНК, как правило, представляет собой некодирующую РНК из 8–25 нуклеотидов, которая регулирует экспрессию мРНК, включая последовательности, комплементарные миРНК. Известно, что эти малые молекулы РНК контролируют генную экспрессию за счет регуляции стабильности и/или трансляции мРНК. Например, миРНК связываются с 3' НТО целевых мРНК и подавляют трансляцию. миРНК также могут связываться с целевыми мРНК и опосредовать сайленсинг генов посредством пути РНКи. миРНК также могут регулировать генную экспрессию за счет инициации конденсации хроматина.

миРНК обуславливает сайленсинг трансляции одной или более конкретных молекул мРНК за счет связывания с элементом распознавания миРНК (ЭРМ), который определяется как любая последовательность, которая непосредственно подвергается спариванию оснований и взаимодействует с миРНК в каком-либо участке мРНК-транскрипта. Часто

ЭРМ находится в 3' нетранслируемой области (НТО) мРНК, но также может присутствовать в кодирующей последовательности или в 5' НТО. ЭРМ не обязательно идеально комплементарны миРНК, обычно они содержат всего несколько оснований, комплементарных с миРНК, и часто содержат одно или более несовпадений в основаниях комплементарности. ЭРМ могут представлять собой любую последовательность, которую миРНК может связывать в достаточной степени, чтобы подавлять трансляцию гена, с которым ЭРМ функционально связан (такого как ген CMV, который важен для роста *in vivo* или способствует ему), за счет механизма сайленсинга миРНК, такого как RISC.

В контексте данного документа термин «вакцина», как правило, понимается как профилактический или терапевтический материал, обеспечивающий по меньшей мере один антиген или иммуноген. Антиген или иммуноген могут быть получены из любого материала, который подходит для вакцинации. Например, антиген или иммуноген могут быть получены из патогена, например из бактериальных или вирусных частиц и т. д., или из опухолевой или раковой ткани. Антиген или иммуноген стимулирует адаптивную иммунную систему организма для обеспечения адаптивного иммунного ответа. В частности, «антиген» или «иммуноген», как правило, относится к веществу, которое может распознаваться иммунной системой (например, адаптивной иммунной системой) и которое способно инициировать антиген-специфический иммунный ответ, например, путем образования антител и/или антиген-специфических Т-клеток как части адаптивного иммунного ответа. Как правило, антиген может представлять собой или может содержать пептид или белок, который ГКГС может презентировать Т-клеткам. Вакцины можно использовать профилактически или терапевтически. Таким образом, вакцины можно использовать для снижения вероятности развития заболевания (такого как опухоль или патологическая инфекция) или для снижения тяжести симптомов заболевания или патологического состояния, ограничения прогрессирования заболевания или патологического состояния (такого как опухоль или патологическая инфекция) или ограничения повторного появления заболевания или патологического состояния (такого как опухоль). В конкретных вариантах осуществления вакцина содержит дефицитный по репликации CMV, экспрессирующий гетерологичный антиген. В конкретных вариантах осуществления вакцина содержит дефицитный по репликации CMV, экспрессирующий слитый белок, содержащий антигены Mtb. В контексте данного документа термины «антиген» или «иммуноген» используются взаимозаменяемо для обозначения вещества, как правило белка, которое способно индуцировать иммунный ответ у субъекта. Этот термин также относится к белкам, которые являются иммуногенно активными в том смысле, что после введения субъекту (непосредственно или путем введения субъекту нуклеотидной

последовательности или вектора, которые кодируют белок) белок способен вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа направленный против этого белка.

В контексте данного документа «гетерологичная» или «экзогенная» молекула, конструкция или последовательность нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты или части молекулы нуклеиновой кислоты, которая не является нативной для второй молекулы нуклеиновой кислоты или для клетки-хозяина, в зависимости от контекста, но может быть гомологичной молекуле нуклеиновой кислоты или части второй молекулы нуклеиновой кислоты или клетке-хозяину. Источником гетерологичной или экзогенной молекулы, конструкции или последовательности нуклеиновой кислоты может быть другой род или вид, или же она может быть синтетической. В определенных вариантах осуществления гетерологичная или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты добавлена (т. е. не является эндогенной или нативной) в клетку-хозяина или геном хозяина, например, посредством конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации и т. п., при этом добавленная молекула может интегрироваться в геном хозяина или существовать в виде внехромосомного генетического материала (например, в виде плазмиды или другой формы самореплицирующегося вектора) и может быть представлена в множестве копий. Кроме того, термин «гетерологичный» включает ненативный фермент, белок или другой активный компонент, кодируемый экзогенной молекулой нуклеиновой кислоты, внесенной во вторую молекулу нуклеиновой кислоты или клетку-хозяина, даже если вторая молекула нуклеиновой кислоты или клетка-хозяин кодирует гомологичный белок или активный компонент.

В контексте данного документа термин «гетерологичный антиген» относится к любому белку или его фрагменту, который не получен из вектора, в который он был вставлен. Например, в некоторых вариантах осуществления «гетерологичный антиген» представляет собой любой белок или его фрагмент, который не получен из CMV. Гетерологичные антигены могут представлять собой патоген-специфические антигены, опухолевые вирусные антигены, опухолевые антигены, собственные антигены клетки-хозяина или любой другой антиген.

В контексте данного документа «антиген-специфическая Т-клетка» относится к CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> лимфоциту, который распознает конкретный антиген. В общем случае антиген-специфические Т-клетки специфически связываются с конкретным антигеном, презентруемым молекулами ГКГС, но не с другими антигенами, презентруемыми тем же ГКГС.

В контексте данного документа «иммуногенный пептид» относится к пептиду, который содержит аллель-специфический мотив или другую последовательность, такую



как N-концевой повтор, так, чтобы пептид связывался с молекулой ГКГС и индуцировал ответ цитотоксических Т-лимфоцитов («ЦТЛ») или ответ В-клеток (например, выработку антител) против антигена, из которого получен иммуногенный пептид. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные пептиды идентифицируют, используя мотивы последовательностей или другие способы, такие как нейросетевые или полиномиальные определения, известные в данной области техники. Как правило, алгоритмы используют для определения «порога связывания» пептидов, чтобы выбрать имеющие оценки, которые обеспечивают им высокую вероятность связывания с определенной аффинностью и иммуногенности. Эти алгоритмы основаны на действии на связывание ГКГК конкретной аминокислоты в конкретной позиции, действии на связывании антителом конкретной аминокислоты в конкретной позиции или действии на связывание конкретной замены в содержащем мотив пептиде. В контексте иммуногенного пептида «консервативный остаток» представляет собой такой, который встречается со значительно большей частотой, чем ожидалось бы при случайном распределении в конкретной позиции в пептиде. В некоторых вариантах осуществления консервативный остаток представляет собой такой, где структура ГКГС может обеспечить точку контакта с иммуногенным пептидом.

В контексте данного документа термин «введение» означает предоставлять или давать субъекту агент, такой как композиция, содержащая эффективное количество антигена, или фармацевтическая композиция, содержащая экзогенный антиген, любым эффективным путем. Типовые пути введения включают, но не ограничиваются этим, инъекционный (такой как подкожный, внутримышечный, интрадермальный, внутривенный и внутривенный), пероральный, подязычный, ректальный, трансдермальный, интраназальный, вагинальный и ингаляционный пути.

В контексте данного документа применяемый «фармацевтически приемлемый носитель» является традиционным. В Remington's Pharmaceutical Sciences авторства E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition, 1995, описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки описанных в данном документе композиций. В общем, природа носителя будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический солевой раствор, сбалансированные растворы солей, водный раствор декстрозы, глицерин и т. п., в качестве носителя. В случае твердых композиций (таких как, в форме порошков, пилюль, таблеток или капсул) традиционные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтической степени чистоты. Помимо биологически нейтральных носителей

предназначенные для введения фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и рН-буферные агенты и т. п., например ацетат натрия или сорбитанмонолаурат.

5 Дозы часто выражают по отношению к массе тела. Таким образом, доза, выраженная как [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и т. д.) обычно относится к [г, мг или другой единице] «на кг (или г, мг и т. д.) массы тела», даже если термин «масса тела» явным образом не упомянут.

10 В контексте данного документа подразумевается, что термин «заболевание» в общем случае является синонимом и используется взаимозаменяемо с терминами «нарушение» и «патологическое состояние» (как в случае медицинского состояния) в том, что все они отображают аномальное состояние организма человека или животного или одной из его частей, которое нарушает нормальное функционирование, как правило, проявляется в виде различных признаков и симптомов, и приводит к снижению продолжительности или  
15 качества жизни человека или животного.

В контексте данного документа «туберкулез» означает заболевание, которое в общем случае вызвано *Mycobacterium tuberculosis*, которая обычно инфицирует легкие. При этом другие «атипичные» микобактерии, такие как *M. kansasii*, могут приводить к аналогичному клиническому и патологическому появлению заболевания. Передача *M. tuberculosis* происходит воздушным путем в ограниченных пространствах с плохой вентиляцией. В более чем 90 % случаев после инфицирования *M. tuberculosis* иммунная система предотвращает развитие заболевания от *M. tuberculosis*, часто называемого активным туберкулезом. Однако не все *M. tuberculosis* уничтожаются, и, таким образом, формируются крошечные твердые капсулы. «Первичным туберкулезом» считается  
20 заболевание, которое развивается после исходной инфекции, обычно у детей. Начальным очагом инфекции является небольшая субплевральная гранулема, сопровождаемая гранулематозной инфекцией прикорневых лимфатических узлов. Вместе они образуют комплекс Гона. Практически во всех случаях эти гранулемы разрешаются, а дальнейшее распространение инфекции отсутствует. «Вторичный туберкулез» наблюдается  
25 преимущественно у взрослых как повторная активация предшествующей инфекции (или повторной инфекции), в частности, когда ухудшается состояние здоровья. Гранулематозное воспаление является намного более выраженным и распространенным. Как правило, наиболее поражаются верхние доли легких, при этом могут образовываться полости. Распространение туберкулеза за пределы легких может привести к появлению ряда  
30 необычных проявлений с характерными профилями, которые включают скелетный

туберкулез, туберкулез половых путей, туберкулез мочевыводящих путей, туберкулез центральной нервной системы (ЦНС), желудочно-кишечный туберкулез, туберкулез надпочечников, скрофулу и туберкулез сердца. «Латентный» туберкулез представляет собой инфекцию *Mtb* у индивида, которую можно выявить с помощью диагностического анализа, такого как, не без ограничения этим, туберкулиновая кожная проба (ТКП), при этом инфекция не приводит к развитию симптомов у этого индивида. «Активный» туберкулез относится к симптоматической инфекции *Mtb* у субъекта. Микроскопически воспаление, вызываемое инфекцией ТБ, является гранулематозным с эпителиоидными макрофагами и гигантскими клетками Лангханса наряду с лимфоцитами, плазматическими клетками, возможно небольшим количеством полиморфноядерных клеток, фибробластами с коллагеном и характерным казеозным некрозом в центре. Воспалительный ответ опосредуется реакцией гиперчувствительности типа IV, и кожная проба основана на этой реакции. В некоторых примерах туберкулез можно диагностировать по кожной пробе, окрашиванию по Цилю — Нильсену, окрашиванию аураминол или их комбинации. Наиболее обычным анализируемым образцом является мокрота, но гистологическое окрашивание также можно проводить на тканях или других жидкостях организма. «Легочный» туберкулез относится к любому бактериологически подтвержденному или клинически диагностированному случаю туберкулеза, затрагивающего легкие, включая паренхиму легких и/или трахеобронхиальное дерево. «Внелегочный» туберкулез относится к любому бактериологически подтвержденному или клинически диагностированному случаю туберкулеза, затрагивающего органы, отличные от легких, включая, но не ограничиваясь этим, плевру, лимфатические узлы, брюшную полость, мочеполовой тракт, кожу, суставы, кости и/или оболочку головного мозга.

В контексте данного документа «рецидивирующий» туберкулез относится к повторной активации эндогенной первичной инфекции *M. tuberculosis* или к недавней экзогенной повторной инфекции *M. tuberculosis*. Рецидивирующий туберкулез также относится к «постпервичному туберкулезу», который может возникать спустя много лет после первичной инфекции.

В контексте данного документа «вспомогательное» относится к лечению, применяемому вместе с первичным лечением, при этом целью вспомогательного лечения является способствование первичному лечению.

## II. Туберкулезные антигены

В данном документе описаны слитые белки, содержащие антигены *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), и кодирующие их нуклеиновые кислоты.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий один или более из Mtb Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35, или их частей или фрагментов.

Ag85A представляет собой фермент ацетилтрансферазу Mtb, который образует комплекс с Ag85B и Ag85C и участвует в синтезе компонентов микобактериальной клеточной оболочки (смотрите, например, Elamin, AA et al., *The Mycobacterium tuberculosis Ag85A is a novel diacylglycerol acyltransferase involved in lipid body formation. Molecular Microbiology* 81, 1577-1592 (2011)). В контексте данного документа «Ag85A» может относиться к ферменту или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид Ag85A, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления Ag85A относится к аминокислотной последовательности в соответствии с UniProtKB - P9WQP3 (A85A\_MYCTU) (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления Ag85A относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления Ag85A относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления Ag85A относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления Ag85A относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 1, или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления Ag85A относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления Ag85A относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 12.

ESAT-6 представляет собой секретируемый белок Mtb, связанный с патогенной вирулентностью и модуляцией иммунных ответов хозяина (Sreejit, G et al. *The ESAT-6 Protein of Mycobacterium tuberculosis Interacts with Beta-2-Microglobulin (β2M) Affecting*

Antigen Presentation Function of Macrophage. PLoS Pathog 10, e1004446 (2014)). В контексте данного документа «ESAT-6» может относиться к белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид ESAT-6, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления ESAT-6 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с UniProtKB - P9WNK7 (ESXA\_MYCTU) (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления ESAT-6 относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления ESAT-6 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления ESAT-6 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2, или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления ESAT-6 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 13.

Rv3407 представляет собой антиген Mtb (Mollenkopf, HJ et al. Application of Mycobacterial Proteomics to Vaccine Design: Improved Protection by Mycobacterium bovis BCG Prime-Rv3407 DNA Boost Vaccination against Tuberculosis. Infection and Immunity 72, 6471-6479 (2004)). В контексте данного документа «Rv3407» может относиться к антигенному белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид Rv3407, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления Rv3407 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с UniProtKB - P9WF23 (VPB47\_MYCTU) (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления Rv3407 относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления Rv3407 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления Rv3407 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3, или

ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления Rv3407 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 14.

Rv2626c был идентифицирован как антиген латентности Mtb (Amiano, NO et al. IFN- $\gamma$  and IgG responses to Mycobacterium tuberculosis latency antigen Rv2626c differentiate remote from recent tuberculosis infection. Sci Rep 10, 7472 (2020)). В контексте данного документа «Rv2626c» может относиться к антигенному белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид Rv2626c, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления Rv2626c относится к аминокислотной последовательности в соответствии с UniProtKB - P9WJA3 (HRP1\_MYCTU) (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления Rv2626c относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления Rv2626c относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления Rv2626c относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4, или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления Rv2626c относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 15.

RpfA и RpfD относятся к семейству белков Mtb, связанных с вирулентностью и ресусцитацией из латентного состояния, но в общем случае не являются необходимыми для *in vitro* роста (Kana, BD et al. The resuscitation-promoting factors of Mycobacterium tuberculosis are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. Mol Microbiol. 67, 672-684 (2008)). В контексте данного документа «RpfA» может относиться к белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид RpfA, или их частям, в зависимости от контекста. RpfA характеризуется вариабельной экспрессией в штаммах Mtb. RpfA в штаммах Mtb может

быть полноразмерным или содержать только С-конец, только N-конец, и/или в нем может отсутствовать центральная часть белка. В некоторых вариантах осуществления RpfA относится к аминокислотной последовательности в соответствии с UniProtKB - P9WG31 (RPFA\_MYCTU) (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления RpfA относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления RpfA относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления RpfA относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 5, или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления RpfA относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 16.

В контексте данного документа «RpfD» может относиться к белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид RpfD, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления RpfD относится к аминокислотной последовательности в соответствии с UniProtKB - P9WG27 (RPFID\_MYCTU) (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления RpfD относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления RpfD относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления RpfD относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 6, или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления RpfD относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 %

или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 17.

Ra12 относится к С-концевой части Mtb32A, как правило, содержащей последние приблизительно 132 аминокислоты Mtb32A (публикация международной заявки № WO2006/117240A2, которая включена в данный документ посредством ссылки в отношении информации, касающейся антигенов Ra12 и Ra35 и содержащих их слияний). Mtb32A представляет собой сериновую протеазу Mtb (Skeiky, YAW et al. Cloning, Expression, and Immunological Evaluation of Two Putative Secreted Serine Protease Antigens of Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immunity 67, 3998-4007 (1999)). Примером является последовательность Mtb32A, соответствующая UniProtKB - O07175 (O07175\_MYCTU) (SEQ ID NO: 7). В контексте данного документа «Ra12» может относиться к белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид Ra12, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления Ra12 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления Ra12 относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления Ra12 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 23.

Ra35 относится к N-концевой части Mtb32A (публикация международной заявки № WO2006/117240A2). В контексте данного документа «Ra35» может относиться к белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид Ra35, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления Ra35 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления Ra35 относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления Ra35 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления Ra35 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах



осуществления Ra35 относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления Ra35 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 26.

ТbН9 (также известный как Mtb39a или PPE18) является членом семейства микобактериальных белков на основе пролин-пролин-глутаминовой кислоты (PPE) и причастен к внутриклеточной выживаемости Mtb (Bhat, KH et al. Role of PPE18 Protein in Intracellular Survival and Pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis in Mice. PLoS ONE 7, e52601 (2012)). ТbН9 (Mtb39a) является в высокой степени гомологичным с Mtb39b и Mtb39c, который вместе составляют семейство генов Mtb39. В контексте данного документа «ТbН9» может относиться к белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид ТbН9, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления ТbН9 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с UniProtKB - L7N675 (PPE18\_MYCTU) (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления ТbН9 относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления ТbН9 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления ТbН9 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8, или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления ТbН9 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 24.

Mtb72f представляет собой слитый белок, содержащий белки M. tuberculosis Mtb32a и ТbН9. Mtb72f был сконструирован путем слияния ТbН9 с С- и N-концевыми частями Mtb32a следующим образом: Mtb32 С-конец - Mtb39 - Mtb32 N-конец. Открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую приблизительно 14 кДа С-концевой фрагмент Mtb32a,

последовательно связывали с полноразмерной ОРС ТбН9, а потом — с приблизительно 20 кДа N-концевой частью Mtb32a. В контексте данного документа «Mtb72f» может относиться к антигенному слитому белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид Mtb72f, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления Mtb72f относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления Mtb72f относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления Mtb72f относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 18, или ее фрагменту.

Mtb72f также может относиться к Mtb72f, в котором был удален метионин в аминокислотной позиции 1 в соответствии с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления Mtb72f относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления Mtb72f относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 19, или ее фрагменту.

M72 представляет собой вариант Mtb72f, который содержит тег из двух остатков гистидина на N-конце и замену серина аланином в аминокислотной позиции 710. C-концевая часть Mtb32a и полноразмерная ОРС ТбН9 в остальном имеют такую же последовательность, как и в Mtb72f (SEQ ID NO: 18). N-концевая часть Mtb32a содержит замену S710A. В контексте данного документа «M72» может относиться к антигенному слитому белку или пептиду, или аминокислотной последовательности, кодирующей белок или пептид M72, или их частям, в зависимости от контекста. В некоторых вариантах осуществления M72 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления M72 относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления M72 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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

мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 21, или ее фрагменту.

«M72-слияние-2» представляет собой вариант M72 с делецией 3 аминокислот на N-конец, при этом удалены как метионин в аминокислотной позиции 1, так и тег из двух остатков гистидина. В некоторых вариантах осуществления M72-слияние-2 относится к аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления M72-слияние-2 относится к фрагменту аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления M72-слияние-2 относится к аминокислотной последовательности, имеющей 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 22, или ее фрагменту.

На Фиг. 1 и 2 приведены неограничивающие примеры слитых белков, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий, состоящий из или состоящий преимущественно из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, Ra12, TbH9, Ra35 и RpfD или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-Ra12-TbH9-Ra35-RpfD. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий, состоящий из или состоящий преимущественно из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA и RpfD или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-RpfA-RpfD. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 9-10. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9. В

некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий, состоящий из или состоящий преимущественно из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35 или их фрагментов. Если не указано иное, отдельные антигены Mtb могут присутствовать в слитом белке в любом порядке. Кроме того, они могут быть соединены в С-конце с N-концом с С-концом способом с линкерами или без, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-RpfA-RpfD-Ra12-TbH9-Ra35. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит (i) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 9-10; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 18-22. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий, состоящий из или состоящий преимущественно из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD и TbH9 или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок Ag85A-ESAT-6-  
5 Rv3407-Rv2626c-RpfA-RpfD-TbH9. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит (i) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 9-10; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %  
10 или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %  
15 или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий, состоящий из или состоящий преимущественно из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35 или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок Ag85A-ESAT-6-  
25 Rv3407-Rv2626c-RpfD-Ra12-TbH9-Ra35. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит (i) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 и 11-12; (ii) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2 или 13; (iii) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3 или 14; (iv) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в  
35

соответствии с SEQ ID NO: 4 или 15; (v) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 17; (vi) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 23; (vii) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 24; и (viii) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 25–26. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий, состоящий из или состоящий преимущественно из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfD и TbH9 или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок Ag85A–ESAT-6–Rv3407–Rv2626c–RpfD–TbH9. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит (i)

аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 и 11–12; (ii) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2 или 13; (iii) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3 или 14; (iv) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4 или 15; (v) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 17; и (vi) аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 24. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 42 и 1–38.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 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 %







ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 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 5 меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит из аминокислотной последовательности в 10 соответствии с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит преимущественно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 15 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах 20 осуществления слитый белок состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит преимущественно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную 25 последовательность, имеющую 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную 30 последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит преимущественно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 35.

35 В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную

последовательность, имеющую 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит преимущественно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит преимущественно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую 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 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит преимущественно из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 38.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления слитый белок может дополнительно содержать тег. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может дополнительно содержать поли-His тег. В некоторых вариантах осуществления поли-His

тег содержит или состоит из от двух до шести остатков His. В некоторых вариантах осуществления поли-His расположен на N-конце слитого белка или вставлен после начального остатка Met на N-конце. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления слитый белок может дополнительно содержать тег гемагглютинина (HA) вируса гриппа человека, содержащий аминокислотную последовательность YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления HA-тег расположен на C-конце слитого белка. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может быть конъюгирован с тегом или другим агентом для визуализации, таким как биотин, флуоресцентные фрагменты, радиоактивные фрагменты или другие пептидные теги.

Отдельные антигены Mtb могут быть связаны вместе по типу C-конец с N-концом или N-конец с C-концом без какого-либо линкера. В альтернативном варианте в любом из описанных в данном документе слитых белков между двумя антигенами Mtb может присутствовать линкер. В некоторых вариантах осуществления слитый белок может дополнительно содержать один или более линкеров, соединяющих один или более из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35. Например, линкеры могут содержать или состоять из одного или более аминокислотных остатков, включенных в соединение двух антигенов Mtb. В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется сегментом ДНК, необязательно содержащим один или более сайтов рестрикции, при этом сегмент ДНК вставлен между молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими два антигена Mtb, любого из слитых белков, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сайт рестрикции включает сайт рестрикции EcoRI или сайт рестрикции EcoRV. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит линкер между Ra12 и TbH9, что приводит к образованию сайта рестрикции EcoRI. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит линкер между TbH9 и Ra35, что приводит к образованию сайта рестрикции EcoRV.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая любой из слитых белков, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит из аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления слитый белок состоит преимущественно из аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты в

соответствии с SEQ ID NO: 41.

### III. Векторы

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены векторы, кодирующие слитый белок, описанный выше.

5 Вектор может представлять собой любой экспрессионный вектор, известный в данной области техники. В случае предназначенных для экспрессии антигенов кодирующая белок последовательность слитого белка должна быть «функционально связанной» с регуляторными или контрольными последовательностями нуклеиновой кислоты, которые управляют транскрипцией и трансляцией белка. Говорят, что кодирующая  
10 последовательность и контрольная последовательность нуклеиновой кислоты или промотор «функционально связаны», когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция и/или трансляция кодирующей последовательности находилась под влиянием или управлением контрольной последовательности нуклеиновой кислоты. «Контрольная последовательность нуклеиновой кислоты» может представлять  
15 собой любой элемент нуклеиновой кислоты, такой как, но не ограничиваясь этим, промоторы, энхансеры, IRES, интроны и другие элементы, описанные в данном документе, которые управляют экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты или кодирующей последовательности, функционально связанной с ними. Термин «промотор» относится к группе модулей транскрипционного контроля, которые кластеризованы  
20 вокруг сайта инициации для РНК-полимеразы II и, когда они функционально связаны с кодирующими белок последовательностями по изобретению, приводят к экспрессии кодируемого белка. Экспрессия гетерологичных антигенов и слитых белков по настоящему изобретению может находиться под управлением конститутивного промотора или индуцибельного промотора, который иницирует транскрипцию только при воздействии  
25 некоторых конкретных внешних стимулов, таких как, без ограничения, антибиотики, такие как тетрациклин, гормоны, такие как экдизон, или тяжелые металлы. Промотор также может быть специфическим в отношении конкретного типа клеток, тканей или органов. Многие подходящие промоторы и энхансеры известны в данной области техники, и при этом любой такой подходящий промотор или энхансер можно использовать для экспрессии  
30 трансенов по изобретению. Например, подходящие промоторы и/или энхансеры можно выбрать из базы данных эукариотических промоторов (EPDB).

В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий слитый белок, представляет собой плазмиду, космиду, фаг, бактериальный вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор,  
35 например, на основе поксвируса, аденовируса, вируса краснухи, вируса Сендай, вируса

бешенства, альфавируса, вируса герпеса, лентивируса, ретровируса или аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий слитый белок, представляет собой бактериальную искусственную хромосому (BAC). В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий слитый белок, представляет собой CMV-вектор, например, RhCMV- или HCMV-вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий слитый белок, представляет собой рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор представляет собой или получен из HCMV TR3. В контексте данного документе «HCMV TR3» или «TR3» относится к векторному остову HCMV-TR3, полученному из клинического изолята HCMV TR, как описано в Caposio, P et al. (Characterization of a live attenuated HCMV-based vaccine platform. *Scientific Reports* 9, 19236 (2019)).

Как описано в данном документе, рекомбинантные CMV-векторы можно характеризовать присутствием или отсутствием одного или более генов CMV. CMV-векторы также можно характеризовать присутствием или отсутствием одного или более белков, кодируемых одним или более генами CMV. Белок, кодируемый геном CMV, может отсутствовать из-за наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ген CMV. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать ортолог или гомолог гена CMV. Примеры генов CMV включают, но не ограничиваются этим, UL82, UL128, UL130, UL146, UL147, UL18 и UL78.

Ген UL82 цитомегаловируса человека кодирует pp71, белок, который локализован в наружном домене вирусной частицы. Например, ген UL82 штамма CMV TR составляет от 118811 до 120490 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

Pp71 может осуществлять одну или более функций, включая ингибирование репрессии Daхх транскрипции вирусного гена, негативную регуляцию STING и уклонение от клеточных противовирусных ответов (Kalejta RF, et al. Expanding the Known Functional Repertoire of the Human Cytomegalovirus pp71 Protein. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Mar 12;10:95). Удаление UL82 или разрушение UL82 путем вставки чужеродного гена в локус UL82 приводит к отсутствию белка pp71 и, следовательно, снижает репликацию в фибробластах, эндотелиальных клетках, эпителиальных клетках и астроцитах (Caposio P et al., Characterization of a live-attenuated HCMV-based vaccine platform. *Sci Rep.* 2019 Dec 17;9(1):19236). Эффекты делеции или разрушения UL82 обратимы с помощью ингибиторов клеточных киназ. Ген цитомегаловируса макака-резус (RhCMV) RhCMV 110 гомологичен CMV UL82 человека (Hansen SG, et al. Complete sequence and genomic analysis of rhesus cytomegalovirus. *J Virol.* 2003 Jun;77(12):6620-36).

Гены цитомегаловируса человека UL128 и UL130 кодируют структурные компоненты вирусной оболочки (Patrone, M et al. Human cytomegalovirus UL130 protein promotes endothelial cell infection through a producer cell modification of the virion. *J Virol.* 79(13):8361-73 (2005); Ryckman, BJ et al. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol.* 82(1):60-70 (2008); Wang, D et al. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(50):18153-8 (2005)). Например, ген UL128 штамма CMV TR составляет от 176206 до 176964 для номера доступа GenBank № KF021605.1, а ген UL130 штамма CMV TR составляет от 177004 до 177648 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

Гены цитомегаловируса человека UL146 и UL147 кодируют хемокины CXC vCXC-1 и vCXC-2, соответственно (Penfold, ME et al. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(17):9839-44 (1999)). Например, ген UL146 штамма CMV TR составляет от 180954 до 181307 для номера доступа GenBank № KF021605.1, а ген UL147 штамма CMV TR составляет от 180410 до 180889 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

Ген цитомегаловируса человека UL18 кодирует мембранный гликопротеин типа I, который ассоциирует с  $\beta$ 2-микроглобулином и может связывать эндогенные пептиды (Park, B et al. Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity.* 20(1):71-85 (2004); Browne, H et al. A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin. *Nature.* 347(6295):770-2 (1990); Fahnestock, ML et al. The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity.* 3(5):583-90 (1995)). Например, ген UL18 штамма CMV TR составляет от 24005 до 25111 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

Ген цитомегаловируса человека UL78 кодирует предполагаемый сопряженный с протеином G рецептор (Chee, MS et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1154:125-69 (1990)) и также может играть роль в репликации вируса (Michel, D et al. The human cytomegalovirus UL78 gene is highly conserved among clinical isolates, but is dispensable for replication in fibroblasts and a renal artery organ-culture system. *J Gen Virol.* 86(Pt 2):297-306 (2005)). Например, ген UL78 штамма CMV TR составляет от 114247 до 115542 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор экспрессирует UL128 или UL130 или их ортологи. В некоторых вариантах осуществления

рекомбинантный CMV-вектор экспрессирует UL146 и UL147 или их ортологи. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор экспрессирует UL128, UL130, UL146 и UL147.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) не экспрессирует UL128 или UL130 или их ортологи вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL128 и UL130 или их ортологи. В некоторых вариантах осуществления CMV-вектор является дефицитным в отношении одного или более из UL146, UL147, UL18, UL78 и UL82 и их ортологов вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL146, UL147, UL18, UL78 или UL82 или их ортолог. В некоторых вариантах осуществления CMV-вектор является дефицитным в отношении US11 и его ортологов вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей US11 или его ортолог. В вышеупомянутых вариантах осуществления мутация или мутации могут представлять собой мутацию, которая приводит к отсутствию экспрессии активных белков. Такие мутации включают, например, точечные мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции менее чем всей последовательности, которая кодирует белок (мутации усечения), или делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) экспрессирует UL40 и US28 или их ортологи.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) не экспрессирует UL78, UL128 или UL130 или их ортологи вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL78, UL128 и UL130 или их ортологи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, описанный в данном документе, замещает UL78. В некоторых дополнительных вариантах осуществления слитый белок функционально связан с и экспрессируется промотором UL78.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) не экспрессирует UL78, UL128 или UL130 или их ортологи вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL78, UL128 и UL130 или их ортологи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор экспрессирует UL18, UL82, UL146 и UL147 или их ортологи. В некоторых



дополнительных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, описанный в данном документе, замещает UL78. В некоторых дополнительных вариантах осуществления слитый белок функционально связан с и экспрессируется промотором UL78.

5 В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) не экспрессирует UL82, UL128 или UL130 или их ортологи вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL82, UL128 и UL130 или их ортологи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления молекула  
10 нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, описанный в данном документе, замещает UL82. В некоторых дополнительных вариантах осуществления слитый белок функционально связан с и экспрессируется промотором UL82.

Затруднением для производства HCMV-векторов, имеющих необходимые свойства для вакцин, является то, что векторы часто разрабатывают так, чтобы они имели сниженные  
15 вирусные репликацию или рост. Например, некоторые HCMV-HIV векторы для живой аттенуированной вакцины конструируют так, чтобы они были дефицитными по росту, путем делеции гена UL82 HCMV (который кодирует покровный белок pp71), что приводит к низкому вирусному выходу. pp71 важен для инфекции HCMV дикого типа, поскольку его покровный белок транслоцируется в ядро, где он подавляет клеточную функцию Daхх, таким образом обеспечивая возможность немедленно-ранней (НР) экспрессии гена CMV, которая инициирует цикл репликации. Некоторые процессы производства основаны на функциональном дополнении с использованием временной трансфекции клеток MRC-5 мРНК, нацеленной на Daхх, что имитирует одну из функций HCMV pp71. Другим  
20 подходом является использование трансфекции мРНК, кодирующей pp71, чтобы клетка-хозяин могла экспрессировать важный вирусный ген. Трансфекция мРНК для экспрессии важного вирусного гена может быть способна обеспечить все функции гена, которые вероятно усилят инфекционный процесс, такие как стимуляция клеточного цикла, эффективная упаковка вирионов и стабильности вируса. Кроме того, белок, присутствующий на поздней стадии инфекции, потенциально может быть упакован в  
25 вирусное потомство, что может снизить необходимую дозу вакцины за счет более эффективной инфекции в первом раунде и развития персистентной инфекции. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения рекомбинантного CMV-вирусного вектора, включающий: (а) внесение в клетку мРНК, кодирующей белок pp71; (b) инфицирование клетки  
30 рекомбинантным CMV; (с) инкубацию клетки; и (d) сбор рекомбинантного CMV-вирусного

вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую белок pp71, доставляют в клетку, используя трансфекцию. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку MRC-5. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV представляет собой рекомбинантный HCMV, описанный в данном документе (например, рекомбинантный HCMV-вектор, полученный из остова TR3). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV и рекомбинантный CMV-вирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный патоген-специфический антиген, такой как антиген Mtb, описанный в данном документе. CMV-вирусный вектор, полученный таким способом, также входит в объем изобретения.

10 В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (миРНК) (ЭРМ). В некоторых вариантах осуществления HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЭРМ, который  
15 содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в эндотелиальных клетках. Примерами миРНК, экспрессируемых в эндотелиальных клетках, являются miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) содержит  
20 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЭРМ, который содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в миелоидных клетках. Примерами миРНК, экспрессируемых в миелоидных клетках, являются miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21, miR-124 и miR-125.

ЭРМ, которые могут быть включены в векторы, описанные в данном документе,  
25 могут представлять собой любой элемент распознавания миРНК, который обеспечивает сайленсинг экспрессии в присутствии миРНК, экспрессируемой эндотелиальными клетками, или миРНК, экспрессируемой миелоидными клетками. Такой ЭРМ может быть полностью комплементарным миРНК. В альтернативном варианте для заданной миРНК можно использовать другие последовательности в качестве ЭРМ. Например, ЭРМ можно  
30 спрогнозировать из последовательностей с использованием общедоступных баз данных. В одном примере можно проводить поиск миРНК на веб-сайте [microRNA.org](http://www.microRNA.org) ([www.microRNA.org](http://www.microRNA.org)). В свою очередь, будет приведен перечень мРНК-мишеней миРНК. Для каждой перечисленной на странице мишени можно получить доступ к «подробностям выравнивания» и доступ к предположительным ЭРМ. Специалист в данной области  
35 техники может выбрать валидированную, предположительную или мутированную

последовательность ЭРМ из литературы, которая прогнозируемо будет индуцировать сайленсинг в присутствии миРНК, экспрессируемой в миелоидных клетках, таких как макрофаг. Один из примеров включает указанный выше веб-сайт. Специалист в данной области техники затем может получить экспрессионную конструкцию, в которой  
5 экспрессия репортерного гена (например, флуоресцентного белка, фермента или другого репортерного гена) управляется промотором, таким как конститутивно активный промотор или клеточноспецифический промотор. Последовательность ЭРМ затем можно вносить в экспрессионную конструкцию. Экспрессионную конструкцию можно трансфицировать в соответствующую клетку, а клетку трансфицировать представляющей интерес миРНК.  
10 Отсутствие экспрессии репортерного гена указывает на то, что ЭРМ обеспечивает сайленсинг генной экспрессии в присутствии миРНК.

В некоторых вариантах осуществления CMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая не кодирует какие-либо ЭРМ.

В некоторых вариантах осуществления CMV-векторы, описанные в данном документе, содержат мутации, которые могут предотвращать распространение от хозяина  
15 к хозяину, тем самым делая вирус неспособным инфицировать субъектов с ослабленным иммунитетом или других субъектов, которые могут столкнуться с осложнениями в результате инфекции CMV. CMV-векторы, описанные в данном документе, также могут содержать мутации, которые приводят в презентации иммунодоминантных и  
20 неиммунодоминантных эпитопов, а также неканонической рестрикции ГКГС. При этом в некоторых вариантах осуществления мутации в CMV-векторах, описанных в данном документе, не влияют на способность вектора повторно инфицировать субъекта, который ранее был инфицирован CMV. Такие мутации CMV описаны, например, в публикации патентных заявок США №№ US2013/0136768A1, US2013/0142823A1; US2014/0141038A1;  
25 и публикации международной заявки № WO2014/138209A1, которые включены в данный документ посредством ссылки в отношении информации, связанной с этими мутациями.

CMV-векторы, описанные в данном документе, можно получать путем вставки ДНК, содержащей последовательность, которая кодирует антиген Mtb (например, слитый белок, описанный в данном документе), в важную или не важную область генома CMV. Способ  
30 может дополнительно включать удаление одной или более областей из генома CMV. Способ может включать *in vivo* рекомбинацию. Таким образом, способ может включать трансфекцию клетки ДНК CMV в клеточно-совместимой среде в присутствии донорной ДНК, содержащей гетерологичную ДНК, фланкируемую последовательностями ДНК, гомологичными с частями генома CMV, при этом гетерологичную ДНК вносят в геном  
35 CMV, и, необязательно, выделение после этого CMV, модифицированного путем *in vivo*

рекомбинации. Способ также может включать расщепление ДНК CMV для получения расщепленной ДНК CMV, лигирование гетерологичной ДНК в расщепленную ДНК CMV для получения гибридной CMV-гетерологичной ДНК, трансфекцию клетки гибридной CMV-гетерологичной ДНК и, необязательно, выделение после этого CMV, модифицированного наличием гетерологичной ДНК. Поскольку предусмотрена *in vivo* рекомбинация, в способе также предложена плазида, содержащая донорную ДНК, которая естественным образом не встречается в CMV, кодирующую полипептид, чужеродный для CMV, при этом донорная ДНК находится в сегменте ДНК CMV, который в ином случае был бы коллинеарным с важной или не важной областью генома CMV, так, чтобы ДНК из важной или не важной области генома CMV фланкировалась донорной ДНК. Гетерологичную ДНК можно вставлять в CMV для создания рекомбинантного CMV в любой ориентации, которая обеспечивает интеграцию этой ДНК и ее экспрессию, при необходимости.

ДНК, кодирующая антиген Mtb (например, слитый белок, описанный в данном документе) в рекомбинантном CMV-векторе, также может содержать промотор. Промотор может быть из любого источника, такого как вирус герпеса, включая эндогенный промотор цитомегаловируса (CMV), такой как промотор CMV человека (HCMV), CMV макака-резуса (RhCMV), мышинный или другой промотор CMV. Промотор также может представлять собой невирусный промотор, такой как промотор EF1 $\alpha$ . Промотор может представлять собой усеченный транскрипционно активный промотор, который содержит область, трансактивированную трансактивирующим белком, обеспечиваемым вирусом, и минимальную промоторную область полноразмерного промотора из которого получен усеченный транскрипционно активный промотор. Промотор может состоять из ассоциации последовательностей ДНК, соответствующей минимальному промотору и вышележащим регуляторным последовательностям. Минимальный промотор состоит из сайта CAP плюс АТА-бокс (минимальные последовательности для базового уровня транскрипции; нерегулируемого уровня транскрипции); «вышележащие регуляторные последовательности» состоят из вышележащего(их) элемента(ов) и энхарсерной(ых) последовательности(ей). Кроме того, термин «усеченный» указывает на то, что полноразмерный промотор не полностью присутствует, т. е., что некоторая часть полноразмерного промотора была удалена. Усеченный промотор может быть получен из вируса герпеса, такого как MCMV или HCMV, например, HCMV-IE или MCMV-IE. Уменьшение размера может составлять до 40 % и даже до 90 % от полноразмерного промотора на основании пар оснований. Промотор также может представлять собой модифицированный невирусный промотор. Информацию по промоторам HCMV можно

найти по ссылке на патенты США №№ 5168062 и 5385839. Информацию по трансфекции клеток плазмидной ДНК для экспрессии из них можно найти по ссылке Felgner, JH et al. (Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol. Chem.* 269, 2550-2561 (1994)). Информацию по прямой инъекции плазмидной ДНК в качестве простого и эффективного способа вакцинации от ряда инфекционных заболеваний можно найти по ссылке Ulmer, JB et al. (Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749 (1993)). Следовательно, в объем данного изобретения входит то, что вектор можно использовать для прямой инъекции векторной ДНК. Также описана экспрессионная кассета, которую можно вставлять в рекомбинантный вирус или плазмиду, содержащая усеченный транскрипционно активный промотор. Экспрессионная кассета может дополнительно содержать функциональный усеченный сигнал полиаденилирования; например, сигнал полиаденилирования SV40, который усечен, но сохраняет функциональность. Усеченный сигнал полиаденилирования решает проблемы ограничения размера вставки рекомбинантных вирусов, таких как CMV. Экспрессионная кассета также может содержать гетерологичную ДНК в отношении вируса или системы, в которые она вставлена; и при этом эта ДНК может представлять собой гетерологичную ДНК, описанную в данном документе.

Следует отметить, что ДНК, содержащая последовательность, кодирующую слитый белок, может сама содержать промотор для управления экспрессией в CMV-векторе или же ДНК может быть ограничена кодирующей ДНК слитого белка. Эту конструкцию можно размещать в такой ориентации относительно эндогенного промотора CMV, чтобы она была функционально связана с промотором и за счет этого экспрессировалась. Кроме того, для того чтобы приумножить или повысить экспрессию можно использовать множество копий ДНК, кодирующей слитый белок, или сильный или ранний промотор, или ранний и поздний промотор, или любую их комбинацию. Таким образом, ДНК, кодирующую слитый белок, можно предпочтительно размещать относительно эндогенного промотора CMV, или же эти промоторы можно транслоцировать для вставки в другой локации вместе с ДНК, кодирующей слитый белок. В CMV-вектор могут быть упакованы нуклеиновые кислоты, кодирующие более одного слитого белка или слитый белок и дополнительные антигены.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44. В некоторых

вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

#### IV. Фармацевтические композиции

В настоящем изобретении предложена, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция (например, иммуногенная или вакцинная композиция), содержащая слитый белок, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В настоящем изобретении также предложена, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция (например, иммуногенная или вакцинная композиция), содержащая вектор, кодирующий слитый белок, описанный в данном документе (например, рекомбинантные CMV-векторы, описанные в данном документе). Иммуногенная или вакцинная композиция, содержащая рекомбинантный вирус или вектор CMV (или продукт его экспрессии), вызывает иммунологический ответ (местный или системный). Ответ может быть, но необязательно, защитным. Другими словами, иммуногенная или вакцинная композиция вызывает местный или системный защитный или терапевтический ответ.

Такие фармацевтические композиции можно готовить в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармации. Такие композиции можно вводить в дозировках и с помощью методов, хорошо известных специалистам в области медицины, учитывая такие факторы, как порода или вид, возраст, пол, масса и состояние конкретного пациента, а также путь введения. Композиции можно вводить отдельно или можно вводить совместно или последовательно с другими белками или пептидами, с другими векторами (например, другими CMV-векторами) или с другими иммунологическими, антигенными или вакцинными или терапевтическими композициями. Такие другие композиции могут содержать очищенные нативные антигены или эпитопы, или антигены или эпитопы, являющиеся продуктом экспрессии рекомбинантного CMV-вектора или другой векторной системы.

Описанные в данном документе фармацевтические композиции можно составлять так, чтобы использовать их в любой процедуре введения, известной в данной области техники. Такие фармацевтические композиции можно вводить парентеральным путем (интрадермальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутривенным или другими). Введение также можно осуществлять мукозальным путем, например, пероральным, назальным, генитальным и т. д.

Примеры композиций включают жидкие препараты для введения через отверстия, например, перорального, назального, анального, генитального, например, вагинального и т. д., такие как суспензии, сиропы или эликсиры; и препараты для парентерального,

подкожного, внутрибрюшинного, интрадермального, внутримышечного или внутривенного введения (например, инъекционного введения), такие как стерильные суспензии или эмульсии. В таких композициях рекомбинантный вектор может находиться в смеси с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, трегалоза и т. п.

Описанные в данном документе фармацевтические композиции, как правило, могут содержать адъювант и такое количество антигена (например, слитого белка) или вектора, кодирующего антиген, чтобы вызывать необходимый ответ. В случае применения на людях типичным адъювантом являются квасцы (фосфат алюминия или гидроксид алюминия).

Сапонин и его очищенный компонент Quil A, полный адъювант Фрейнда и другие адъюванты, используемые в исследованиях и ветеринарных применениях, имеют токсичность, которая ограничивает их потенциальное применение в человеческих вакцинах. Также можно использовать химически определенные препараты, такие как мурамилдипептид, монофосфориллипид А, фосфолипидные конъюгаты, такие как описаны в Goodman-Snitkoff, G. et al. (Role of intrastructural/intermolecular help in immunization with peptide-phospholipid complexes. *J Immunol.* 147, 410-415 (1991)), инкапсуляцию белка в протеолипосоме, как описано в Miller, MD et al. (Vaccination of rhesus monkeys with synthetic peptide in a fusogenic proteoliposome elicits simian immunodeficiency virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Exp. Med.* 176, 1739-1744 (1992)), и инкапсуляцию белка в липидных везикулах, таких как липидные везикулы Novasome (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, N.H.).

Композиция может быть упакована в единичную лекарственную форму для иммунизации путем парентерального (например, внутримышечного, интрадермального или подкожного) введения или введения через отверстия, например, перлингвального (например, перорального), внутрижелудочного, мукозального, в том числе внутривагинального, внутрианального, внутривагинального и т. п. введения. Эффективная дозировка и путь введения определяются природой композиции, природой продукта экспрессии, уровнем экспрессии в случае непосредственного применения вектора и известными факторами, такими как порода или вид, возраст, пол, масса, состояние и природа субъекта, а также LD50 и другими исследовательскими процедурами, которые являются известными и не требуют проведения необязательных экспериментов. Дозировки экспрессируемого продукта могут находиться в диапазоне от нескольких до нескольких сотен микрограмм, например, от 5 до 500 мкг. Антиген или вектор, кодирующий антиген, можно вводить в любом подходящем количестве для обеспечения экспрессии при этих уровнях дозировок. В неограничивающих примерах: CMV-вектор, кодирующий слитый белок, описанный в

данном документе, можно вводить в количестве по меньшей мере  $10^2$  ФОЕ; или в диапазоне от около  $10^2$  ФОЕ до около  $10^7$  ФОЕ. Другие подходящие носители или разбавители могут представлять собой воду или буферный солевой раствор с консервантом или без. Композицию можно лиофилизировать для ресуспендирования во время введения или она может находиться в растворе.

#### V. Способы лечения и другие применения

Слитые белки и векторы (такие как рекомбинантные CMV-векторы), описанные в данном документе, можно применять в способах индукции иммунологического или иммунного ответа у субъекта, включающих введение субъекту композиции, содержащей слитый белок, вектор или рекомбинантный вирус или вектор CMV и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В контексте данного документа термин «субъект» относится к живым многоклеточным позвоночным организмам, категории, которая включает как людей, так и отличных от людей млекопитающих. Субъект может представлять собой животное, такое как млекопитающее, включая любое млекопитающее, которое может быть инфицировано *Mycobacterium tuberculosis*, например примата (такого как человек, отличный от человека примат, например обезьяна или шимпанзе), или животное, которое считается приемлемой клинической моделью туберкулезной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В дополнительных вариантах осуществления субъект представляет собой взрослого возрастом 18 лет или старше. В дополнительных вариантах осуществления субъект представляет собой подростка возрастом от 13 до 17 лет.

В некоторых вариантах осуществления субъект живет в географическом местоположении, где туберкулез не является эндемичным. В некоторых вариантах осуществления субъект живет в географическом местоположении, где туберкулез является эндемичным (например, Южная Африка). В контексте данного документа термин «эндемичный» используют для описания заболевания, которое постоянно присутствует в определенной географической зоне или в определенной группе людей.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет положительный результат теста на CMV. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет отрицательный результат теста на CMV. Тестирование на CMV относится к анализам, которые позволяют определить наличие вируса в моче, слюне, крови, мокроте или других жидкостях организма. Неограничивающие примеры тестов на CMV включают полимеразная цепная реакцию (ПЦР), например, ПЦР-тест слюны на CMV.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет положительный результат в



анализе высвобождения интерферона- $\gamma$  (IGRA). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет отрицательный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ . Анализ высвобождения интерферона- $\gamma$  используют для диагностики туберкулеза. Т-лимфоциты будут высвобождать интерферон- $\gamma$  после воздействия специфических антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, что указывает на воздействие тестируемых антигенов *Mycobacterium tuberculosis* в прошлом.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет положительный результат теста на CMV и имеет положительный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления субъект имеет отрицательный результат теста на CMV и имеет отрицательный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления субъект имеет отрицательный результат теста на CMV и имеет положительный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления субъект имеет положительный результат теста на CMV и имеет отрицательный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ . В дополнительных вариантах осуществления субъекту ранее вводили вакцину на основе бациллы Кальмета — Герена (БЦЖ). В дополнительных вариантах осуществления субъект имеет положительный результат теста на CMV, имеет отрицательный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$  и дополнительно ему ранее вводили вакцину на основе бациллы Кальмета — Герена (БЦЖ).

В некоторых вариантах осуществления субъект является HIV-положительным. В дополнительных вариантах осуществления субъект является HIV-положительным и на данный момент находится на антиретровирусной терапии (АРТ).

В контексте данного документа термин «лечение» относится к вмешательству, которое облегчает признак или симптом заболевания или патологического состояния. В контексте данного документа термины «лечение», «лечить» и «проведение лечения» в отношении заболевания патологического состояния или симптома, также относятся к любому наблюдаемому благоприятному эффекту лечения. О благоприятном эффекте может свидетельствовать, например, задержка появления клинических симптомов заболевания у восприимчивого субъекта, снижение тяжести некоторых или всех клинических симптомов заболевания, замедленное прогрессирование заболевания, снижение количества рецидивов заболевания, улучшение общего состояния здоровья или самочувствия субъекта или другие хорошо известные в данной области параметры, которые являются специфическими для конкретного заболевания. Профилактическое лечение представляет собой лечение, которое назначают субъекту, у которого не проявляются признаки заболевания или проявляются только ранние признаки, в целях снижения риска

развития патологии. Терапевтическое лечение представляет собой лечение, которое назначают субъекту после развития признаков и симптомов заболевания.

В контексте данного документа термины «предотвращать» или «предотвращение» относятся к отсутствию развития заболевания, нарушения или патологического состояния или снижению развития признаков или симптомов, связанных с таким заболеванием, нарушением или патологическим состоянием (например, в клинически релевантной степени), или проявлению отсроченных признаков или симптомов (например, на дни, недели, месяцы или года). Для предотвращения может быть необходимо введение более чем одной дозы.

В контексте данного документа термин «эффективное количество» относится к количеству агента (например, слитого белка или вектора, кодирующего слитый белок), которое является достаточным для генерации необходимого ответа, такого как снижение или устранение признака или симптома патологического состояния или заболевания или индукция иммунного ответа на антиген. В некоторых примерах «эффективное количество» представляет собой количество, которое обеспечивает лечение (включая профилактику) одного или более симптомов и/или первопричин любого нарушения или заболевания. Эффективное количество может представлять собой терапевтически эффективное количество, включая количество, которое обеспечивает предотвращение развития одного или более признаков или симптомов конкретного заболевания или патологического состояния, например одного или более признаков или симптомов, связанных с инфекционным заболеванием или раком.

Описанные слитые белки или векторы можно вводить *in vivo*, например, когда целью является получение иммуногенного ответа, включая CD4<sup>+</sup> Т-клеточный/иммунный и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеточный/иммунный. Например, в некоторых примерах может быть желательно использовать описанные слитые белки или векторы в организме лабораторного животного, такого как макаки-резус, для доклинического тестирования иммуногенных композиций и вакцин с использованием RhCMV. В других примерах может быть желательно использовать слитые белки или векторы в отношении субъектов-людей, например, в клинических исследованиях и для актуального клинического применения иммунологических композиций с использованием HCMV.

В случае таких *in vivo* применений описанные слитые белки или векторы можно вводить в качестве компонента иммуногенной или фармацевтической композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции по изобретению применимы для стимуляции иммунного ответа против слитого белка, при этом их можно использовать в

качестве одного или более компонентов профилактической или терапевтической вакцины. Нуклеиновые кислоты и векторы по изобретению, в частности, применимы для создания генетических вакцин, т. е. вакцин для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих антигены по изобретению, субъекту, такому как человек, чтобы антигены затем экспрессировались в

5 организме субъекта, чтобы вызвать иммунный ответ.

Программы (схемы) иммунизации хорошо известны для животных (включая людей) и могут быть легко определены для конкретного субъекта и иммуногенной композиции. Следовательно, иммуногены можно вводить субъекту один или более раз. Предпочтительно между отдельными введениями иммуногенной композиции существует

10 установленный временной интервал. Хотя этот интервал варьируется для каждого субъекта, как правило, он находится в диапазоне от 10 дней до нескольких недель и часто составляет 2, 4, 6 или 8 недель. Для людей интервал, как правило, составляет от 2 до 6 недель. В особенно преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения этот интервал составляет больше, преимущественно около 10 недель, 12 недель, 14 недель, 16

15 недель, 18 недель, 20 недель, 22 недель, 24 недель, 26 недель, 28 недель, 30 недель, 32 недель, 34 недель, 36 недель, 38 недель, 40 недель, 42 недель, 44 недель, 46 недель, 48 недель, 50 недель, 52 недель, 54 недель, 56 недель, 58 недель, 60 недель, 62 недель, 64 недель, 66 недель, 68 недель или 70 недель. Программы иммунизации, как правило, подразумевают от 1 до 6 введений иммуногенной композиции, но могут включать лишь

20 одну, или две, или четыре. Способы индукции иммунного ответа также могут включать введение адъюванта с иммуногенами. В некоторых случаях исходный протокол иммунизации может быть дополнен бустерной иммунизацией через год, два года или более длинный интервал (5–10 лет). Представленные способы также включают ряд схем по типу прайм-буст. В этих способах за одной или более прайм-иммунизациями следуют одна или

25 более бустерных иммунизаций. Фактическая иммуногенная композиция может быть одинаковой или разной для каждой иммунизации, при этом тип иммуногенной композиции (например, содержащей белок или экспрессионный вектор), путь и состав иммуногенов могут варьироваться. Например, если для праймирующего и бустерного этапов используют экспрессионный вектор, он может быть одинаковым или разным (например, ДНК, или

30 бактериальный, или вирусный экспрессионный вектор). В одной из применимых прайм-буст схем предусмотрены две праймирующие иммунизации с интервалом в четыре недели, за которыми следуют две бустерные иммунизации через 4 и 8 недель после последней праймирующей иммунизации. Специалист в данной области техники без труда поймет, что существует несколько предусмотренных вариантов или комбинаций с использованием

35 ДНК, бактериальных и вирусных экспрессионных векторов по изобретению для

обеспечения схем праймирования и бустеризации. CMV-векторы можно использовать повторно, при условии, что они экспрессируют разные антигены, полученные из разных патогенов.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ генерации иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту любых из вышеупомянутых слитых белков, нуклеиновых кислот, векторов или композиций. Также в данном документе предложено применение любых из вышеупомянутых слитых белков, нуклеиновых кислот, векторов или композиций в производстве лекарственного средства для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения туберкулеза у субъекта, включающий введение субъекту слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или композицию, описанные в данном документе, применяют в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта. В некоторых вариантах осуществления туберкулез представляет собой латентную инфекцию туберкулеза. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ предотвращения заболевания туберкулезом у субъекта. В дополнительных вариантах осуществления субъект имел положительный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ предотвращения инфекции *Mycobacterium tuberculosis*. В дополнительных вариантах осуществления субъект имел отрицательный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ .

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ предотвращения рецидива туберкулеза и/или инфекции *M. tuberculosis* у субъекта. В дополнительных вариантах осуществления предотвращение рецидива происходит после предшествующего лечения туберкулеза.

В некоторых вариантах осуществления слитые белки и векторы (такие как рекомбинантные CMV-векторы), описанные в данном документе, вводят до, одновременно или после второго лечения туберкулеза. В некоторых вариантах осуществления слитые белки и векторы, описанные в данном документе, являются вспомогательными при втором лечении. В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий вспомогательное лечение, инфицирован лекарственно-резистентным *M. tuberculosis*.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ

предотвращения туберкулеза легких у субъекта.

В некоторых из вышеупомянутых способов, применений или композиций для применения вектор представляет собой CMV-вектор, и при этом CMV-вектор вводят в количестве, эффективном, чтобы вызвать ответ CD4<sup>+</sup> Т-клеток на антиген Mtb. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10 % CD4<sup>+</sup> Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу. В некоторых дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % CD4<sup>+</sup> Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

В некоторых из вышеупомянутых способов, применений или композиций для применения вектор представляет собой CMV-вектор, и при этом CMV-вектор вводят в количестве, эффективном, чтобы вызвать ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток на антиген Mtb. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10 % CD8<sup>+</sup> Т-клеток, индуцированных CMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Ia или его ортологу. В некоторых дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % CD8<sup>+</sup> Т-клеток, индуцированных CMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Ia или его ортологу.

В некоторых дополнительных аспектах в настоящем изобретении предложен способ генерации CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид, путем введения CMV-вектора, кодирующего слитый белок, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает:

(a) введение первому субъекту CMV-вектора, описанного в данном документе, в количестве, эффективном для генерации группы CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид;

(b) идентификацию первого CD4<sup>+</sup> TCR из группы CD4<sup>+</sup> Т-клеток, причем первый CD4<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-II/полученный из слитого белка пептид;

(c) выделение одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и

(d) трансфекцию одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD4<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD4<sup>+</sup> TCR,

при этом второй CD4<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD4<sup>+</sup> TCR, с генерацией, таким образом, одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид.

В некоторых вариантах осуществления способ включает:

- 5 (a) идентификацию первого CD4<sup>+</sup> TCR из группы CD4<sup>+</sup> Т-клеток, при этом группа CD4<sup>+</sup> Т-клеток выделена от субъекта, которому ввели CMV-вектор, описанный в данном документе, и при этом первый CD4<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-II/полученный из слитого белка пептид;
- (b) выделение одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и
- 10 (c) трансфекцию одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD4<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD4<sup>+</sup> TCR, при этом второй CD4<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD4<sup>+</sup> TCR, с генерацией,
- 15 таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид.

В некоторых дополнительных аспектах в настоящем изобретении предложен способ генерации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид, путем введения CMV-вектора, кодирующего слитый белок, описанный в данном документе. В

20 некоторых вариантах осуществления способ включает:

- (a) введение первому субъекту CMV-вектора, описанного в данном документе, в количестве, эффективном для генерации группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид;
- (b) идентификацию первого CD8<sup>+</sup> TCR из группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, причем первый
- 25 CD8<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-Ia/полученный из слитого белка пептид;
- (c) выделение одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и
- (d) трансфекцию одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально
- 30 связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8<sup>+</sup> TCR, при этом второй CD8<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD8<sup>+</sup> TCR, с генерацией, таким образом, одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид.

В некоторых вариантах осуществления способ включает:

- 35 (a) идентификацию первого CD8<sup>+</sup> TCR из группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, при этом группа

CD8<sup>+</sup> Т-клеток выделена от субъекта, которому ввели CMV-вектор, описанный в данном документе, и при этом первый CD8<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-Ia/полученный из слитого белка пептид;

(b) выделение одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и

5 (c) трансфекцию одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8<sup>+</sup> TCR, при этом второй CD8<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD8<sup>+</sup> TCR, с генерацией,  
10 таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид.

В некоторых вариантах осуществления способов генерации Т-клеток, в которых первый CD4<sup>+</sup> TCR или первый CD8<sup>+</sup> TCR идентифицируют с помощью ДНК- или РНК-секвенирования. В некоторых вариантах осуществления, в которых последовательность  
15 нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD4<sup>+</sup> TCR, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8<sup>+</sup> TCR, является идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD4<sup>+</sup> TCR или первый CD8<sup>+</sup> TCR. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты представляют собой людей.

20 В настоящем изобретении также предложена CD4<sup>+</sup> Т-клетка или CD8<sup>+</sup> Т-клетка, созданная вышеупомянутыми способами. В некоторых дополнительных вариантах осуществления CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетку используют в способе лечения или предотвращения заболевания у субъекта. CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетку можно использовать в других дополнительных вариантах осуществления в производстве лекарственного средства  
25 для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

#### VI. Типовые варианты осуществления

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено:

1. Слитый белок, содержащий или состоящий из:

(a) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, Ra12, TbH9, Ra35 и RpfD или их фрагментов;

30 (b) Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-Ra12-TbH9-Ra35-RpfD;

(c) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 42;

(d) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 42;

35 (e) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35 или их

фрагментов;

(f) Ag85A–ESAT-6–Rv3407–Rv2626c–RpfA–RpfD–Ra12–TbH9–Ra35;

5 (g) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 9–10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 18–22;

10 (h) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 19;

15 (i) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 22;

(j) (i) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 19;

(k) (i) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 22;

25 (l) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 27;

(m) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 28;

(n) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 29;

35 (o) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной



последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 30;

(p) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 27;

(q) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 28;

(r) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 29;

5 (s) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 30;

(t) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD и TbH9 или их фрагментов;

(u) Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-RpfA-RpfD-TbH9;

(v) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 9-10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 24;

(w) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 24;

20 (x) (i) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 24;

(y) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 31;

25 (z) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 32;

(aa) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 31;

(bb) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 32;

30 (cc) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35 или их фрагментов;

(dd) Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-RpfD-Ra12-TbH9-Ra35;

(ee) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 и 11-12; (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %

или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2 или 13; (iii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3 или 14; (iv) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4 или 15; (v) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 17; (vi) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 23; (vii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 24; и (viii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 25–26;

(ff) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 33;

(gg) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 34;

(hh) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 35;

(ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 36;

(jj) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 33;

(kk) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 34;

(ll) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 35;

(mm) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 36;

(nn) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfD и TbH9 или их фрагментов;

(oo) Ag85A–ESAT-6–Rv3407–Rv2626c–RpfD–TbH9;

(pp) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 и 11–12; (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2 или 13; (iii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3 или 14; (iv) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4 или 15; (v) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 17; и (vi) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 24;

(qq) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 37;

(rr) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 38;

(ss) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 37; или

(tt) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 38.

2. Слитый белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 41.

3. Слитый белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 41.

4. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1–3, дополнительно содержащий поли-His тег.

5. Слитый белок по варианту осуществления 4, отличающийся тем, что поли-His тег содержит или состоит из от двух до шести остатков His.

6. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1–5, отличающийся

тем, что поли-His тег расположен на N-конце слитого белка.

7. Слитый белок по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что поли-His тег вставлен после начального остатка Met.

8. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1–7, дополнительно содержащий HA тег.

9. Слитый белок по варианту осуществления 8, отличающийся тем, что HA тег расположен на C-конце слитого белка.

10. Слитый белок по любому из вариантов осуществления 1–9, отличающийся тем, что дополнительно содержит один или более линкеров, соединяющих один или более из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35, при этом каждый из одного или более линкеров содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков.

11. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок по любому из вариантов осуществления 1–10.

12. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 11.

13. Вектор по варианту осуществления 12, дополнительно содержащий промотор, при этом промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок.

14. Вектор по варианту осуществления 12 или варианту осуществления 13, отличающийся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор.

15. Вектор по варианту осуществления 14, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой цитомегаловирусный (CMV) вектор.

16. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

17. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

18. Вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

19. Вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

20. Вектор по любому из вариантов осуществления 15–19, отличающийся тем, что он представляет собой RhCMV-вектор, HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-

вектор.

21. Вектор по любому из вариантов осуществления 15–20, отличающийся тем, что промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, при этом промотор представляет собой промотор UL78 или его ортолог.

5 22. Вектор по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, замещает весь или часть UL78.

23. Вектор по варианту осуществления 22, отличающийся тем, что вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с  
10 последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

24. Вектор по варианту осуществления 15 или варианту осуществления 20, отличающийся тем, что промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, при этом промотор представляет собой промотор UL82 или его ортолог.

15 25. Вектор по варианту осуществления 24, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, замещает весь или часть UL82.

26. Вектор по любому из вариантов осуществления 15–25, отличающийся тем, что RhCMV-вектор или HCMV-вектор не экспрессирует UL128 или UL130 или их ортологи.

27. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3 и  
20 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген в соответствии с SEQ ID NO: 42, при этом:

(a) вектор не экспрессирует UL128 или UL130 или их ортологи;

(b) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL146, UL147, UL18 и UL82 или их ортологи; и

25 (c) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 и функционально связан с промотором UL78.

28. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что рекомбинантный HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой  
30 кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

29. Вектор по любому из вариантов осуществления 15–28, отличающийся тем, что RhCMV- или HCMV-вектор (i) содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL146, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL147,  
35 или их ортологи; и (ii) не экспрессирует UL128 или UL130 или их ортологи.

30. Вектор по любому из вариантов осуществления 26–29, отличающийся тем, что он не экспрессирует белок UL128 или белок UL130 в результате наличия одной или более мутаций в последовательностях нуклеиновых кислот, кодирующих UL128 и UL130.

31. Вектор по варианту осуществления 30, отличающийся тем, что мутация в последовательностях нуклеиновых кислот, кодирующих UL128 и UL130, представляет собой точечную мутацию, мутацию со сдвигом рамки, мутацию усечения или делецию всех последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих вирусный белок.

32. Вектор по любому из вариантов осуществления 15–31, отличающийся тем, что он представляет собой HCMV-вектор, содержащий остов TR3.

33. Вектор по любому из вариантов осуществления 15–32, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (миРНК) (ЭРМ), при этом ЭРМ содержит целевой сайт для миРНК, экспрессируемой в эндотелиальных клетках.

34. Вектор по любому из вариантов осуществления 15–33, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЭРМ, при этом ЭРМ содержит целевой сайт для миРНК, экспрессируемой в миелоидных клетках.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) (a) слитый белок по любому из вариантов осуществления 1–10, (b) нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 11 или (c) вектор по любому из вариантов осуществления 12–34; и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

36. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 35, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гистидин-трегалозовый (ГТ) буфер.

37. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 35 или 36, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гистидин-трегалозовый (ГТ) буфер, содержащий около 20 мМ L-гистидина и около 10 % (масс./об.) трегалозы.

38. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 35–37, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гистидин-трегалозовый (ГТ) буфер, содержащий 20 мМ L-гистидина и 10 % (масс./об.) трегалозы.

39. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 35–38, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гистидин-трегалозовый (ГТ) буфер, имеющий рН 7,2, содержащий 20 мМ L-гистидина и 10 % (масс./об.) трегалозы.

40. Иммуногенная композиция, содержащая (i) (a) слитый белок по любому из вариантов осуществления 1–10, (b) нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 11 или (c) вектор по любому из вариантов осуществления 12–34; и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

5 41. Способ генерации иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–40.

10 42. Применение слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–40 в производстве лекарственного средства для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

43. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40 для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

15 44. Способ лечения или предотвращения туберкулеза у субъекта, включающий введение субъекту слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–40.

45. Применение слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–40 в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта.

20 46. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта.

47. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект является CMV-положительным.

25 48. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект является CMV-негативным.

30 49. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40, 47 или 48 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект имеет положительный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ .

35 50. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40, 47 или 48 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект имеет отрицательный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ .

51. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40 или 47–50 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъекту ранее вводили вакцину на основе бациллы Кальмета — Герена (БЦЖ).

5 52. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40 или 47–51 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект является HIV-позитивным.

10 53. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40 или 47–52 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект является HIV-позитивным и на данный момент принимает антиретровирусные терапевтические средства.

54. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–40 или 47–53 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъекту назначена вторая терапия.

15 55. Способ, применение в производстве или применение по любому из вариантов осуществления 44–54, отличающиеся тем, что туберкулез представляет собой латентную инфекцию туберкулеза.

20 56. Способ, применение в производстве или применение по любому из вариантов осуществления 44–55, отличающиеся тем, что туберкулез представляет собой легочную инфекцию туберкулеза.

57. Способ, применение в производстве или применение по любому из вариантов осуществления 44–56, отличающиеся тем, что туберкулез представляет собой рецидивирующую инфекцию туберкулеза.

25 58. Способ, применение в производстве или применение по любому из вариантов осуществления 44–57, отличающиеся тем, что вектор представляет собой CMV-вектор, и при этом CMV-вектор вводят в количестве, эффективном, чтобы вызвать ответ CD4+ Т-клеток на антиген Mtb.

30 59. Способ, применение в производстве или применение по любому из вариантов осуществления 41–58, отличающиеся тем, что вектор представляет собой CMV-вектор, и при этом CMV-вектор вводят в количестве от около  $10^2$  ФОЕ до около  $10^7$  ФОЕ.

60. Способ, применение в производстве или применение по варианту осуществления 58 или варианту осуществления 59, отличающиеся тем, что по меньшей мере 10 % CD4+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

35 61. Способ, применение в производстве или применение по варианту



осуществления 60, отличающиеся тем, что по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % CD4+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

62. Способ, применение в производстве или применение по любому из вариантов осуществления 44–61, отличающиеся тем, что вектор представляет собой CMV-вектор, и при этом CMV-вектор вводят в количестве, эффективном, чтобы вызвать ответ CD8+ Т-клеток на антиген Mtb.

63. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по варианту осуществления 62, отличающиеся тем, что по меньшей мере 10 % CD8+ Т-клеток, индуцированных CMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Ia или его ортологу.

64. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по варианту осуществления 63, отличающиеся тем, что по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % CD8+ Т-клеток, индуцированных CMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Ia или его ортологу.

65. Способ генерации CD4+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид, включающий:

(a) введение первому субъекту CMV-вектора по любому из вариантов осуществления 15–34 в количестве, эффективном для генерации группы CD4+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид;

(b) идентификацию первого CD4+ TCR из группы CD4+ Т-клеток, причем первый CD4+ TCR распознает комплекс ГКГС-II/полученный из слитого белка пептид;

(c) выделение одной или более CD4+ Т-клеток от второго субъекта; и

(d) трансфекцию одной или более CD4+ Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD4+ TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD4+ TCR, при этом второй CD4+ TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD4+ TCR, с генерацией, таким образом, одной или более CD4+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид.

66. Способ генерации CD4+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-

II/пептид, включающий:

(a) идентификацию первого CD4<sup>+</sup> TCR из группы CD4<sup>+</sup> Т-клеток, при этом группа CD4<sup>+</sup> Т-клеток выделена от субъекта, которому ввели CMV-вектор по любому из вариантов осуществления 15–34, и при этом первый CD4<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-  
5 II/полученный из слитого белка пептид;

(b) выделение одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и

(c) трансфекцию одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD4<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально  
10 связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD4<sup>+</sup> TCR, при этом второй CD4<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD4<sup>+</sup> TCR, с генерацией, таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид.

67. Способ генерации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-  
15 Ia/пептид, включающий:

(a) введение первому субъекту CMV-вектора по любому из вариантов осуществления 15–34 в количестве, эффективном для генерации группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид;

(b) идентификацию первого CD8<sup>+</sup> TCR из группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, причем первый  
20 CD8<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-Ia/полученный из слитого белка пептид;

(c) выделение одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и

(d) трансфекцию одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально  
25 связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8<sup>+</sup> TCR, при этом второй CD8<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD8<sup>+</sup> TCR, с генерацией, таким образом, одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид.

68. Способ генерации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-  
30 Ia/пептид, включающий:

(a) идентификацию первого CD8<sup>+</sup> TCR из группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, при этом группа CD8<sup>+</sup> Т-клеток выделена от субъекта, которому ввели CMV-вектор по любому из вариантов осуществления 15–34, и при этом первый CD8<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-Ia/полученный из слитого белка пептид;

35 (b) выделение одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и

(с) трансфекцию одной или более CD8+ Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8+ TCR, при этом второй CD8+ TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD8+ TCR, с генерацией, таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид.

69. Способ по любому из вариантов осуществления 65–68, отличающийся тем, что первый CD4+ TCR или первый CD8+ TCR идентифицируют с помощью ДНК- или РНК-секвенирования.

70. Способ по любому из вариантов осуществления 65–69, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD4+ TCR, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8+ TCR, является идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD4+ TCR или первый CD8+ TCR.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 65–70, отличающийся тем, что первый субъект представляет собой человека.

72. Способ по любому из вариантов осуществления 65–71, отличающийся тем, что второй субъект представляет собой человека.

73. CD4+ Т-клетка, полученная способом по любому из вариантов осуществления 65, 66 и 69–72.

74. Способ лечения или предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту CD4+ Т-клетки по варианту осуществления 73.

75. Применение CD4+ Т-клетки по варианту осуществления 73 в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

76. CD4+ Т-клетка по варианту осуществления 73 для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

77. CD8+ Т-клетка, полученная способом по любому из вариантов осуществления 67–72.

78. Способ лечения или предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту CD8+ Т-клетки по варианту осуществления 77.

79. Применение CD8+ Т-клетки по варианту осуществления 77 в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

80. CD8+ Т-клетка по варианту осуществления 77 для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

## ПРИМЕРЫ

### 5 Пример 1: Конструирование касет антигенов Mtb

Разрабатывали CMV-вектор человека, кодирующий слитый белок, содержащий антигены *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). оценивали касеты антигенов Mtb, включая слияние 6, слияние 7 (слияние 6 с делецией RpfA и вставкой варианта слитого белка M72, «M72-слияние-2», в сайте RpfA) и слияние 8 (слияние 6 плюс добавление M72-слияние-2 на С-конце) (Фиг. 2). Вариант M72, «M72-слияние-2», включенный в слияние 7 и слияние 8, представляет собой M72, в котором были удалены N-концевой тег из двух остатков гистидина и метионин в аминокислотной позиции 1 (SEQ ID NO: 22). Таблица с обобщенной информацией по консервативности антигенов Mtb и вариантов RpfA  
15 приведена на Фиг. 3.

#### Компоненты слияния 6

Слияние 6 представляет собой слитый белок Mtb, содержащий Ag85A, ESAT6, Rv3407, Rv2626c, RpfA и RpfD.  
20

#### Дизайн слияния 7

Слияние 7 конструировали на основе слияния 6. Чтобы создать слияние 7, сначала удаляли RpfA. RpfA характеризуется вариабельной экспрессией в штаммах Mtb (Фиг. 4). Например, RpfA во многих штаммах Mtb содержит только С-конец (начиная с 321 п. о. в RpfA) изоформы слияния 6. Кроме того, подгруппа штаммов Mtb имеют только N-конец RpfA, а в других отсутствуют как N-конец, так и центральная часть. Изоляты Mtb с наиболее коротким RpfA (только С-конец; < 100 аминокислот) преимущественно характерны для Великобритании и Нидерландов. Изоляты Mtb из Южной Африки имеют вариабельные RpfA и могут включать только С-конец, только N-конец или полноразмерный RpfA (Фиг. 5). После этого в сайт RpfA вставляли M72-слияние-2. M72-слияние-2 получен из M72, слитого белка, полученного из двух антигенов *M. tuberculosis*, Mtb32a и TbH9, который имеет функцию вакцинного антигена. Mtb32a представляет собой сериновую протеазу, консервативную в вирулентных и авирулентных штаммах Mtb. TbH9 (также известный как Mtb39a) представляет собой белок семейства PPE/PE, кодируемый Rv1196/ppe18. Известно, что белки PPE/PE являются важными мишенями иммунитета к Mtb. TbH9 относится к  
35

антигенам, идентифицируемым путем профилирования TCR как «контроллеров» и «прогрессоров» в Mtb. RpfA был удален, чтобы обеспечить экспрессию антигенов M72, сохраняя при этом генетически стабильный вектор. TbH9 является мишенью CD4 и CD8 Т-клеток в латентных случаях. Конечная конструкция слияния 7 (SEQ ID NO: 42) содержит

5 Ag85A, ESAT6-Rv3407-Rv2626c, M72-слияние-2 (Mtb32A и TbH9) и RpfD.

#### Дизайн слияния 8

Слияние 8 конструировали на основе слияния 6, аналогично конструированию слияния 7, за исключением того, что M72-слияние-2 добавляли к С-концу слияния 6, а RpfA

10 не удаляли.

Пример 2: Оценка кассет антигенов Mtb в отношении экспрессии антигенов, генетической стабильности и иммуногенности

15 Кассеты антигенов Mtb спаривали с промотором UL82 или UL78. Оценивали экспрессию антигенов, генетическую стабильность и иммуногенность (у макаков-резус).

Таблица 1. Комбинации кассеты антигена Mtb и промотора для оценки.

Кассета антигена Mtb	Промотор
Слияние 6	Промотор UL78
Слияние 7	Промотор UL78
Слияние 8	Промотор UL78
Слияние 6	Промотор UL82
Слияние 7	Промотор UL82
Слияние 8	Промотор UL82

20 Экспрессию антигенов для шести комбинаций кассеты антигена и промотора (таблица 1) исследовали в бактериальных искусственных хромосомах (BAC) с помощью вестерн-блоттинга с антителом ESAT-6. Все шесть BAC имели экспрессию антигена Mtb с полосами в ожидаемом диапазоне размеров.

Генетическую стабильность оценивали, используя те же BAC. Пассировали по три

25 клон на конструкцию, чтобы имитировать процесс получения лекарственного препарата (исследовательский посевной материал с тремя дополнительными пассажами (RSS+3), всего четыре пассажа) с секвенированием нового поколения (NGS) на каждом пассаже. Пассирование проводили в колбах T-150 при M3 0,003 для UL78-содержащих конструкций

или при МЗ 0,01 для UL82-содержащих конструкций. Генетическую стабильность определяли как отсутствие наблюдаемых значительных модификаций, которые увеличиваются с каждым пассажем (т. е. делеций и/или перестроек, затрагивающих трансген или область  $U_L/1b'$ ). Было обнаружено, что ВАС, экспрессирующие слияние 6 + промотор UL78 и слияние 6 + промотор UL82, являются стабильными до RSS+3. ВАС, экспрессирующие слияние 8 + промотор UL78, демонстрировали наличие вставок и нестабильность остова. ВАС, экспрессирующие слияние 7 + промотор UL78 и слияние 7 + промотор UL82, были стабильными до RSS+2 и RSS+3. ВАС, экспрессирующая слияние 8 + промотор UL82, была стабильной до RSS+2 и RSS+3.

10 Иммуногенность оценивали на модели с макаками-резус. Макакам-резус вводили вирусные векторы HCMV, экспрессирующие шесть комбинаций кассеты антигена и промотора (таблица 1), в дозе  $10^6$  ФОЕ. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли с двухнедельными интервалами в течение до десяти недель, затем стимулировали пептидными пулами Mtb, содержащими пептиды из генов, экспрессируемых в слиянии 6 или слиянии 6 и M72, перед внутриклеточным окрашиванием цитокинов (ВОК). Определяли частоты CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, частоты IFN $\gamma$ <sup>+</sup> и/или TNF $\alpha$ <sup>+</sup> клеток и фенотипы эффекторных Т-клеток/Т-клеток памяти. У животных, которым вводили вирусные векторы, экспрессирующие слияние 6 + промотор UL78 или слияние 6 + промотор UL82, ответы CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток на пептиды слияния 6 были выявлены через 15 6 недель после введения дозы (Фиг. 6А-6L). У животных, которым вводили вирусные векторы, экспрессирующие слияние 7 + промотор UL78, слияние 7 + промотор UL82 или слияние 8 + промотор UL82, ответы Т-клеток на пептидные пулы были выявлены через 20 6 недель (Фиг. 7А-7N). На ответы Т-клеток указывало выявление IFN $\gamma$ <sup>+</sup> и/или TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

25 Все три дизайна антигена Mtb были функциональными. Кассета антигена слияния 7 вызывала ответы CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток у макаков-резус. RpfA характеризуется вариабельной экспрессией в штаммах Mtb, что обосновывает замещение M72-слияние-2, которое обеспечивает защиту против CMV в исследованиях на людях. Кассета антигена слияния 7 включает широкий спектр антигенов Mtb, взятых с разных стадий 30 инфекционного цикла (активная/латентная/реактивационная стадии), и было показано, что она является защитной в исследованиях с макаками-резус. Кассета антигена слияния 8 содержит кассету слияния 6, а также M72-слияние-2, но может быть связана с генетической нестабильностью.

Пример 3: Выбор остова вектора hCMV-ТВ и промотора антигена ТВ

35 Выбор остова вектора

Mtb-специфические CD4<sup>+</sup> Т-клетки считаются более важными для контроля инфекции, чем CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Исследование внутривенной вакцинации БЦЖ (бацилла Кальмета — Герена) на отличных от человека приматах позволяет предположить важность частоты антиген-специфических Т-клеток. Кроме того, вакцина GSK M72-AS01E индуцирует антитела и CD4<sup>+</sup> Т-клетки, но очень мало или вообще отсутствие CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Penn-Nicholson A. et al., Safety and immunogenicity of candidate vaccine M72/AS01E in adolescents in a Mtb endemic setting. *Vaccine*. 2015 Jul 31;33(32):4025-34). Таким образом, индукция Mtb-специфических CD4<sup>+</sup> Т-клеток важна для дизайна CMV-TB-вакцины и является более предпочтительной, чем индукция CD8<sup>+</sup> Т-клеток за счет ответа CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Кроме того, индукция традиционных класс I-рестриктированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток является более предпочтительной, чем индукция класс II/ГКГС-Е-рестриктированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, поскольку было показано, что рестрикция класс II/ГКГС не нужна для защиты Rh-CMV Mtb.

Известно, что остов CMV-вектора, описанного в данном документе, вызывает мощный ответ CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Кроме того, остов содержит интактный UL146-147, который, как ожидается, будет индуцировать ответ класс I-рестриктированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Остов содержит делеции UL128-130, которые, как известно, способствуют генетической стабильности в клетках фибробластов MRC-5.

Вектор CMV-TB конструировали с характеристиками, приведенными в таблице 2.

Таблица 2. Характеристики вектора CMV-TB

Функция	Характеристика
Тропизм и иммунное программирование	ΔUL128/UL130
	Интактный UL146/147
	Интактный UL18
	ΔUL78 или ΔUL82
Ограничение роста	ΔUL82 или ΔUL78
Доставка антигена	Антиген Mtb
	UL82 или UL78

Выбор промотора кассеты антигена Mtb

Слитый белок Mtb можно вставить в остов CMV-вектора, чтобы заменить ген (например, UL82 или UL78) так, чтобы слитый белок был функционально связан с промотором удаленного гена и экспрессировался им. Было обнаружено, что промотор UL78 эффективно управляет экспрессией слияния 7 или слияния 6, а промотор UL82 эффективно управляет экспрессией слияния 8. Известно, что делеция гена UL82 HCMV (который

кодирует белок оболочки pp71) приводит к недостаточному росту, что приводит к меньшему вирусному выходу. Кроме того, также известно, что экспрессия экзогенного pp71, повышает экспрессию трансгена из CMV-векторов с удаленным UL82 (Caposio P. et al., Characterization of a live-attenuated HCMV-based vaccine platform. Sci Rep. 2019 Dec 5 17;9(1):19236). Следовательно, для применения промотора UL82 будет необходима экспрессия экзогенного pp71, чтобы обеспечить наивысшие уровни экспрессии трансгена и вирусного выхода. В отличие от этого, применение промотора UL78 устраняет необходимость в экспрессии мРНК экзогенного pp71 во время получения.

10 Пример 4: Исследование фазы 1a/1b для оценки безопасности, реактогенности, переносимости и иммуногенности вектора 4

Исследование фазы 1a/1b было разработано для оценки безопасности, реактогенности, переносимости и иммуногенности вектора 4 (SEQ ID NO: 44). Четыре группы пациентов будут оценивать на основании статуса CMV (позитивный или 15 негативный), результата анализа высвобождения интерферона- $\gamma$  (позитивный или негативный) и получения ранее вакцинации БЦЖ (бацилла Кальмета — Герена) (позитивной или негативной). «Часть А» будет включать CMV+/IGRA- субъектов, «часть В» будет включать CMV-/IGRA- субъектов, «часть С» будет включать CMV+/IGRA-/BCG+ субъектов и «часть D» будет включать CMV+/IGRA+/BCG+ субъектов. Исследование будет 20 проводиться в разных центрах в Соединенных Штатах (группы части А и части В) и одном или двух центрах в странах, в которых Mtb является эндемическим (например, Южной Африке). Каждая когорта будет состоять из десяти (10) пациентов, при этом восемь (8) будут получать препарат, а два (2) будут получать плацебо.

25 Пример 5: План разработки для оценки вектора 4 для применения при разных связанных с туберкулезом показаниях

На Фиг. 9 проиллюстрирован план разработки для оценки вектора 4 (SEQ ID NO: 44) для применения в предотвращении туберкулеза легких у подростков и взрослых. На Фиг. 10 проиллюстрирован план разработки для оценки вектора 4 (SEQ ID NO: 44) для 30 применения в предотвращении инфекции M. tuberculosis и предотвращении рецидива туберкулеза у подростков и взрослых.

Хотя были проиллюстрированы и описаны конкретные варианты осуществления, будет очевидно, что различные варианты осуществления, описанные выше, можно комбинировать с получением дополнительных вариантов осуществления, и различные 35 варианты осуществления, описанные выше, можно комбинировать с получением



дополнительных вариантов осуществления.

Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, зарубежные патенты, заявки на зарубежные патенты и непатентные публикации, цитируемые в данном тексте и/или перечисленные в информационном листке заявки, 5 включая предварительные заявки №№ 63/239278, поданную 31 августа 2021 г., и 63/392778, поданную 27 июля 2022 г., в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки, если явно не указано иное. Аспекты вариантов осуществления можно модифицировать, если необходимо использовать концепцию различных патентов, заявок и публикаций для получения дополнительных вариантов осуществления.

10 Эти и другие изменения можно проводить в отношении вариантов осуществления в свете вышеприведенного подробного описания. В целом, в нижеприведенной формуле изобретения используемые термины не следует толковать как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, описанными в тексте и формуле изобретения, но следует толковать как включающие все возможные варианты 15 осуществления наряду с полным объемом эквивалентов, обусловленных формулой изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничена описанием.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок, содержащий или состоящий из:
  - (a) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, Ra12, TbH9, Ra35 и RpfD или их фрагментов;
  - (b) Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-Ra12-TbH9-Ra35-RpfD;
  - (c) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 42;
  - (d) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 42;
  - (e) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35 или их фрагментов;
  - (f) Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-RpfA-RpfD-Ra12-TbH9-Ra35;
  - (g) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 9-10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 18-22;
  - (h) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 19;
  - (i) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 22;
  - (j) (i) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 19;
  - (k) (i) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 22;

(l) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 27;

(m) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 28;

(n) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 29;

(o) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 30;

(p) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 27;

(q) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 28;

(r) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 29;

(s) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 30;

(t) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD и TbH9 или их фрагментов;

(u) Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-RpfA-RpfD-TbH9;

(v) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 9-10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 24;

(w) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 24;

(x) (i) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 10; и (ii) аминокислотной последовательности, имеющей SEQ ID NO: 24;

(y) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 31;

(z) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 32;

(aa) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 31;

(bb) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 32;

(cc) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35 или их фрагментов;

(dd) Ag85A-ESAT-6-Rv3407-Rv2626c-RpfD-Ra12-TbH9-Ra35;

(ee) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 и 11-12; (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2 или 13; (iii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3 или 14; (iv) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4 или 15; (v) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 17; (vi) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 23; (vii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 24; и (viii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 25-26;

(ff) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 33;

(gg) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 34;

(hh) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 35;

(ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 36;

(jj) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 33;

(kk) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 34;

(ll) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 35;

(mm) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 36;

(nn) Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfD и TbH9 или их фрагментов;

(oo) Ag85A–ESAT-6–Rv3407–Rv2626c–RpfD–TbH9;

(pp) (i) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 и 11–12; (ii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2 или 13; (iii) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3 или 14; (iv) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4 или 15; (v) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 6 или 17; и (vi) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 8 или 24;

(qq) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 37;

(rr) аминокислотной последовательности, имеющей 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 38;

(ss) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 37; или

(tt) аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 38.

2. Слитый белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, имеющую 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 41.

3. Слитый белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 41.

4. Слитый белок по любому из пп. 1–3, дополнительно содержащий поли-His тег.

5. Слитый белок по п. 4, отличающийся тем, что поли-His тег содержит или состоит из от двух до шести остатков His.

6. Слитый белок по любому из пп. 1–5, отличающийся тем, что поли-His тег расположен на N-конце слитого белка.

7. Слитый белок по п. 6, отличающийся тем, что поли-His тег вставлен после начального остатка Met.

8. Слитый белок по любому из пп. 1–7, дополнительно содержащий HA тег.

9. Слитый белок по п. 8, отличающийся тем, что HA тег расположен на C-конце слитого белка.

10. Слитый белок по любому из пп. 1–9, дополнительно содержащий один или более линкеров, соединяющих один или более из Ag85A, ESAT-6, Rv3407, Rv2626c, RpfA, RpfD, Ra12, TbH9 и Ra35, при этом каждый из одного или более линкеров содержит или состоит из одного или более аминокислотных остатков.

11. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок по любому из пп. 1–10.

12. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 11.
13. Вектор по п. 12, дополнительно содержащий промотор, при этом промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок.
14. Вектор по п. 12 или 13, отличающийся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор.
15. Вектор по п. 14, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой цитомегаловирусный (CMV) вектор.
16. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.
17. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.
18. Вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.
19. Вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.
20. Вектор по любому из пп. 15–19, отличающийся тем, что он представляет собой RhCMV-вектор, HCMV-вектор или рекомбинантный HCMV-вектор.
21. Вектор по любому из пп. 15–20, отличающийся тем, что промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, при этом промотор представляет собой промотор UL78 или его ортолог.
22. Вектор по п. 21, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, замещает весь или часть UL78.

23. Вектор по п. 22, отличающийся тем, что содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

24. Вектор по п. 15 или 20, отличающийся тем, что промотор функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, при этом промотор представляет собой промотор UL82 или его ортолог.

25. Вектор по п. 24, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, замещает весь или часть UL82.

26. Вектор по любому из пп. 15–25, отличающийся тем, что RhCMV-вектор или HCMV-вектор не экспрессирует UL128 или UL130 или их ортологи.

27. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3 и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген в соответствии с SEQ ID NO: 42, при этом:

- (a) вектор не экспрессирует UL128 или UL130 или их ортологи;
- (b) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL146, UL147, UL18 и UL82 или их ортологи; и
- (c) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 и функционально связан с промотором UL78.

28. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 27, отличающийся тем, что содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 44.

29. Вектор по любому из пп. 15–28, отличающийся тем, что RhCMV- или HCMV-вектор (i) содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL146, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL147, или их ортологи; и (ii) не экспрессирует UL128 или UL130 или их ортологи.



30. Вектор по любому из пп. 26–29, отличающийся тем, что он не экспрессирует белок UL128 или белок UL130 в результате наличия одной или более мутаций в последовательностях нуклеиновых кислот, кодирующих UL128 и UL130.

31. Вектор по п. 30, отличающийся тем, что мутация в последовательностях нуклеиновых кислот, кодирующих UL128 и UL130, представляет собой точечную мутацию, мутацию со сдвигом рамки, мутацию усечения или делецию всех последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих вирусный белок.

32. Вектор по любому из пп. 15–31, отличающийся тем, что он представляет собой HCMV-вектор, содержащий остов TR3.

33. Вектор по любому из пп. 15–32, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (миРНК) (ЭРМ), при этом ЭРМ содержит целевой сайт для миРНК, экспрессируемой в эндотелиальных клетках.

34. Вектор по любому из пп. 15–33, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЭРМ, при этом ЭРМ содержит целевой сайт для миРНК, экспрессируемой в миелоидных клетках.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) (a) слитый белок по любому из пп. 1–10, (b) нуклеиновую кислоту по п. 11 или (c) вектор по любому из пп. 12–34; и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

36. Иммуногенная композиция, содержащая (i) (a) слитый белок по любому из пп. 1–10, (b) нуклеиновую кислоту по п. 11 или (c) вектор по любому из пп. 12–34; и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

37. Способ генерации иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–36.

38. Применение слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–36 в производстве лекарственного средства для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

39. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36 для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

40. Способ лечения или предотвращения туберкулеза у субъекта, включающий введение субъекту слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–36.

41. Применение слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или композиции по любому из пп. 1–36 в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта.

42. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта.

43. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект является CMV-положительным.

44. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект является CMV-негативным.

45. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36, 43 или 44 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект имеет положительный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ .

46. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36, 43 или 44 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект имеет отрицательный результат в анализе высвобождения интерферона- $\gamma$ .

47. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36 или 43–46 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъекту ранее вводили вакцину на основе бациллы Кальмета — Герена (БЦЖ).

48. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36 или 43–47 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект является HIV-положительным.

49. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36 или 43–48 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъект является HIV-положительным и на данный момент принимает антиретровирусные терапевтические средства.

50. Слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или композиция по любому из пп. 1–36 или 43–49 для применения в лечении или предотвращении туберкулеза у субъекта, при этом субъекту назначена вторая терапия.

51. Способ, применение в производстве или применение по любому из пп. 40–50, отличающиеся тем, что туберкулез представляет собой латентную инфекцию туберкулеза.

52. Способ, применение в производстве или применение по любому из пп. 40–51, отличающиеся тем, что туберкулез представляет собой легочную инфекцию туберкулеза.

53. Способ, применение в производстве или применение по любому из пп. 40–52, отличающиеся тем, что туберкулез представляет собой рецидивирующую инфекцию туберкулеза.

54. Способ, применение в производстве или применение по любому из пп. 37–53, отличающиеся тем, что вектор представляет собой CMV-вектор, и при этом CMV-вектор вводят в количестве, эффективном, чтобы вызвать ответ CD4+ Т-клеток на антиген Mtb.

55. Способ, применение в производстве или применение по п. 54, отличающиеся тем, что по меньшей мере 10 % CD4+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

56. Способ, применение в производстве или применение по п. 55, отличающиеся тем, что по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % CD4+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

57. Способ, применение в производстве или применение по любому из пп. 37–56, отличающиеся тем, что вектор представляет собой CMV-вектор, и при этом CMV-вектор вводят в количестве, эффективном, чтобы вызвать ответ CD8+ Т-клеток на антиген Mtb.

58. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по п. 57, отличающиеся тем, что по меньшей мере 10 % CD8+ Т-клеток, индуцированных CMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Ia или его ортологу.

59. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по п. 58, отличающиеся тем, что по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % CD8+ Т-клеток, индуцированных CMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Ia или его ортологу.

60. Способ генерации CD4+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид, включающий:

(a) введение первому субъекту CMV-вектора по любому из пп. 15–34 в количестве, эффективном для генерации группы CD4+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид;

(b) идентификацию первого CD4+ TCR из группы CD4+ Т-клеток, причем первый CD4+ TCR распознает комплекс ГКГС-II/полученный из слитого белка пептид;

(c) выделение одной или более CD4+ Т-клеток от второго субъекта; и

(d) трансфекцию одной или более CD4+ Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD4+ TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD4+ TCR,

при этом второй CD4<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD4<sup>+</sup> TCR, с генерацией, таким образом, одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид.

61. Способ генерации CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид, включающий:

(а) идентификацию первого CD4<sup>+</sup> TCR из группы CD4<sup>+</sup> Т-клеток, при этом группа CD4<sup>+</sup> Т-клеток выделена от субъекта, которому ввели CMV-вектор по любому из пп. 15–34, и при этом первый CD4<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-Ia/полученный из слитого белка пептид;

(b) выделение одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и

(с) трансфекцию одной или более CD4<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD4<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD4<sup>+</sup> TCR, при этом второй CD4<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD4<sup>+</sup> TCR, с генерацией, таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-II/пептид.

62. Способ генерации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид, включающий:

(а) введение первому субъекту CMV-вектора по любому из пп. 15–34 в количестве, эффективном для генерации группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид;

(b) идентификацию первого CD8<sup>+</sup> TCR из группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, причем первый CD8<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-Ia/полученный из слитого белка пептид;

(с) выделение одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и

(d) трансфекцию одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8<sup>+</sup> TCR, при этом второй CD8<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD8<sup>+</sup> TCR, с генерацией, таким образом, одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид.

63. Способ генерации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид, включающий:

(а) идентификацию первого CD8<sup>+</sup> TCR из группы CD8<sup>+</sup> Т-клеток, при этом группа CD8<sup>+</sup> Т-клеток выделена от субъекта, которому ввели CMV-вектор по любому из пп. 15–34, и при этом первый CD8<sup>+</sup> TCR распознает комплекс ГКГС-Ia/полученный из слитого белка пептид;

(b) выделение одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток от второго субъекта; и

(с) трансфекцию одной или более CD8<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8<sup>+</sup> TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8<sup>+</sup> TCR, при этом второй CD8<sup>+</sup> TCR содержит CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$  первого CD8<sup>+</sup> TCR, с генерацией, таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Ia/пептид.

64. Способ по любому из пп. 60–63, отличающийся тем, что первый CD4<sup>+</sup> TCR или первый CD8<sup>+</sup> TCR идентифицируют с помощью ДНК- или РНК-секвенирования.

65. Способ по любому из пп. 60–64, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD4<sup>+</sup> TCR, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8<sup>+</sup> TCR, является идентичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD4<sup>+</sup> TCR или первый CD8<sup>+</sup> TCR.

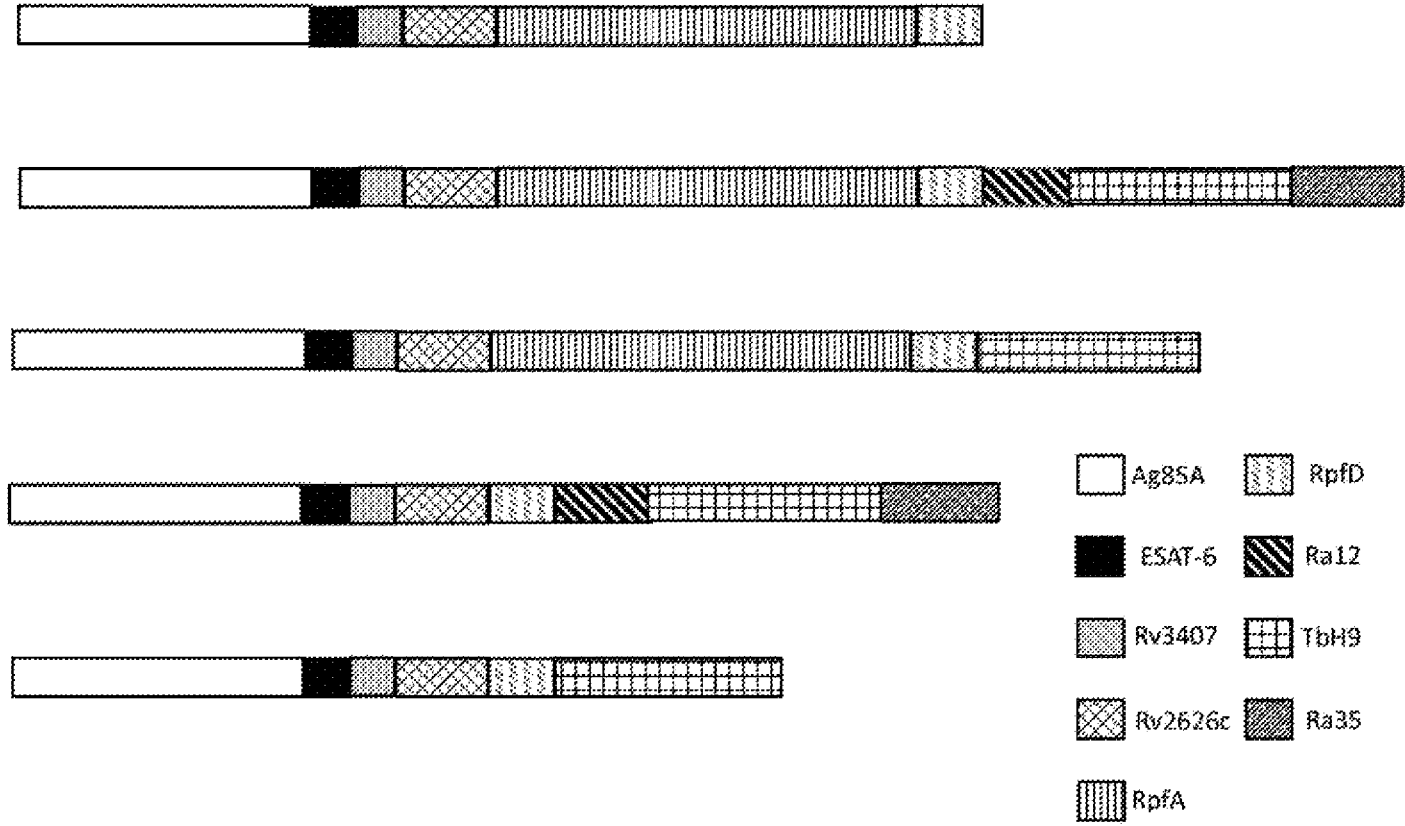
66. Способ по любому из пп. 60–65, отличающийся тем, что первый субъект представляет собой человека.

67. Способ по любому из пп. 60–66, отличающийся тем, что второй субъект представляет собой человека.

68. CD4<sup>+</sup> Т-клетка, полученная способом по любому из пп. 60, 61 и 64–67.

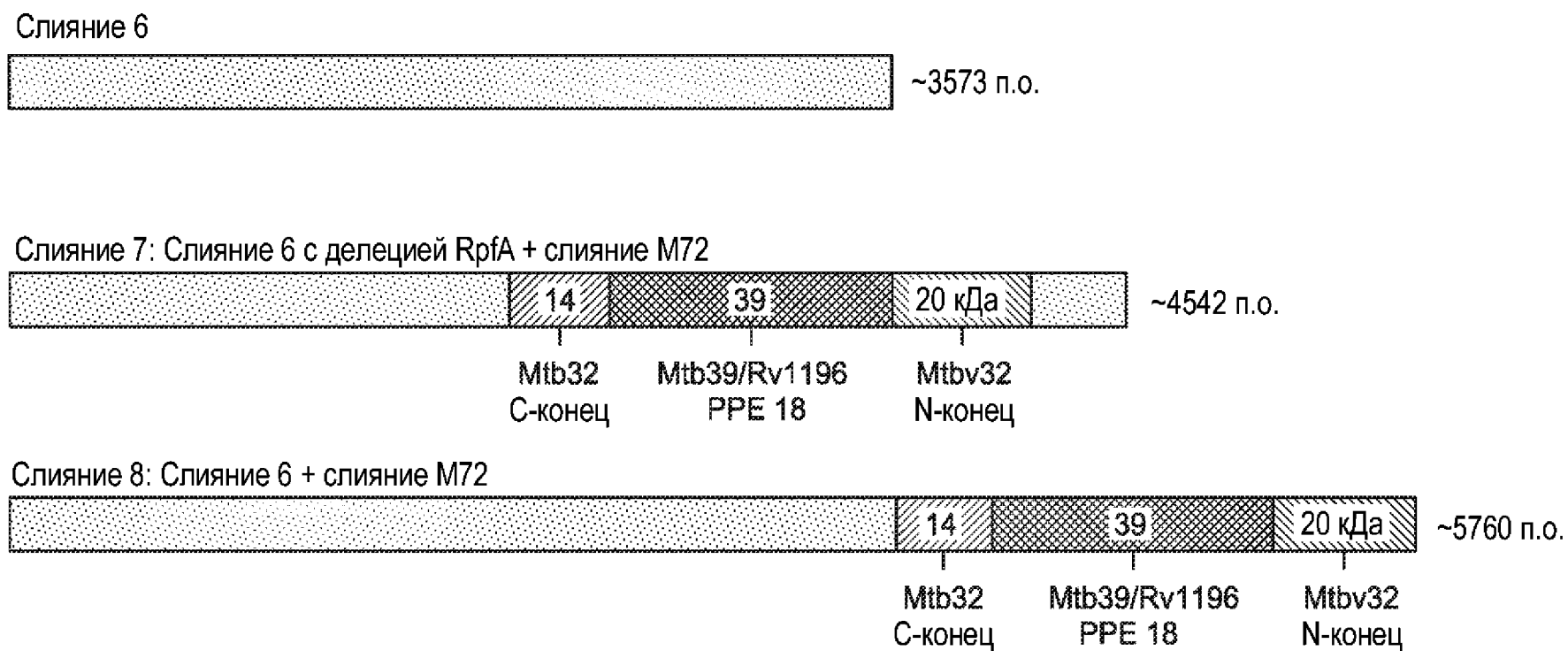
69. Способ лечения или предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту CD4<sup>+</sup> Т-клетки по п. 68.

70. Применение CD4+ Т-клетки по п. 68 в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.
71. CD4+ Т-клетка по п. 68 для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.
72. CD8+ Т-клетка, полученная способом по любому из пп. 62–67.
73. Способ лечения или предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту CD8+ Т-клетки по п. 72.
74. Применение CD8+ Т-клетки по п. 72 в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.
75. CD8+ Т-клетка по п. 72 для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.



Фиг. 1



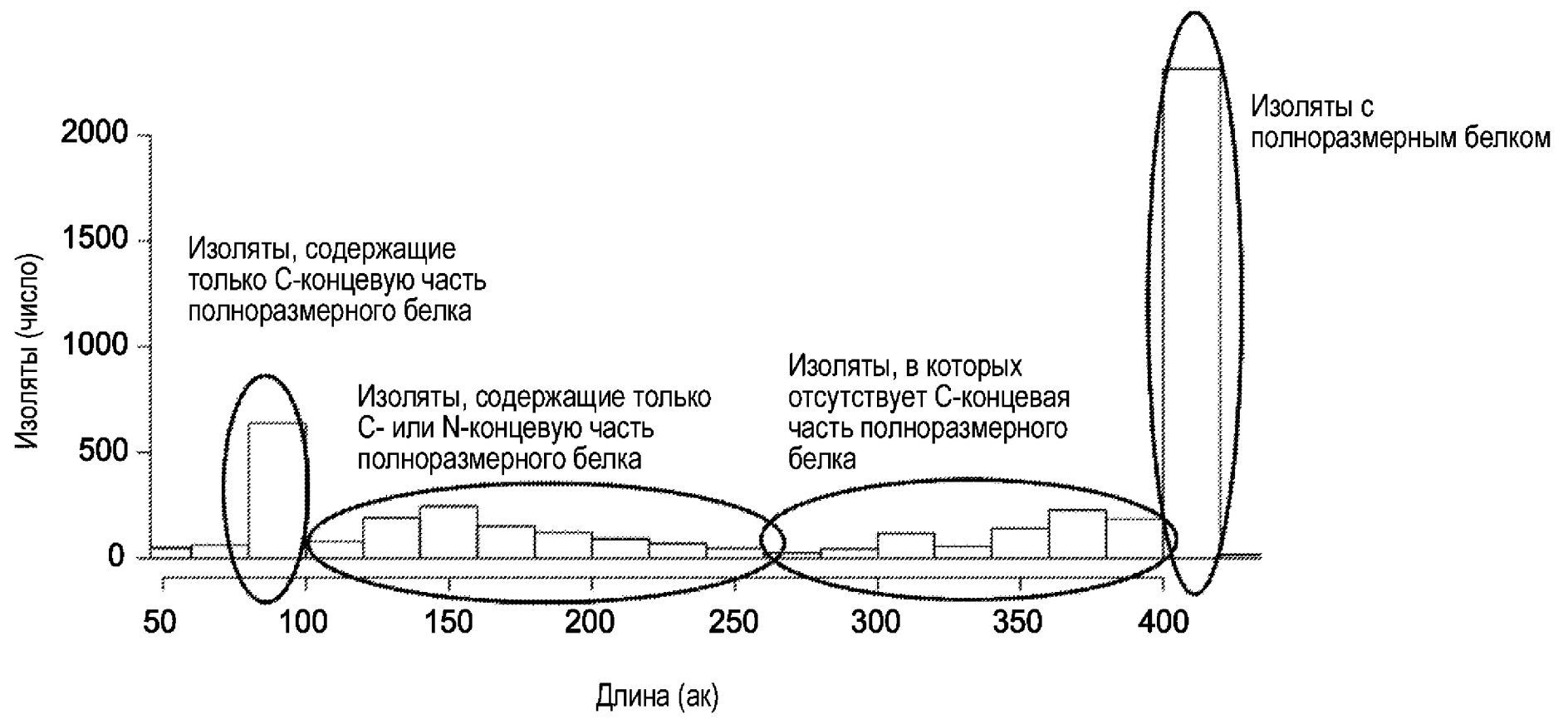


Фиг. 2

Антиген	ак	Стадия	Выровненные изоляты/ позиция	Число позиций / % последовательности с <99,55% консервативности	Макс. уровень вариации
Ag85A	297	Активный	4005	104 ак / 35%	6,2%
ESAT-6	94	Активный	4397	27 ак / 29%	2,5%
Rv3407 (VarB47)	98	Латентный	1717	2 ак / 2%	20,5%
Rv2626c (Hrp1)	142	Латентный	4341	0 ак / 0%	0,1%
RpfA	406	Повторная активация	2840*	12 ак / 3 %	12,3%
RpfD	153	Повторная активация	4581	1 ак / <1%	0,8%
<i>Mtb</i> 32 (PepA)	323	Сериновая протеаза	3911	0 ак / 0%	0,4%
<i>Mtb</i> 39 (PPE18)	391	Семейство генов PPE	1575	41 ак / 10%	40% ( ак 287)

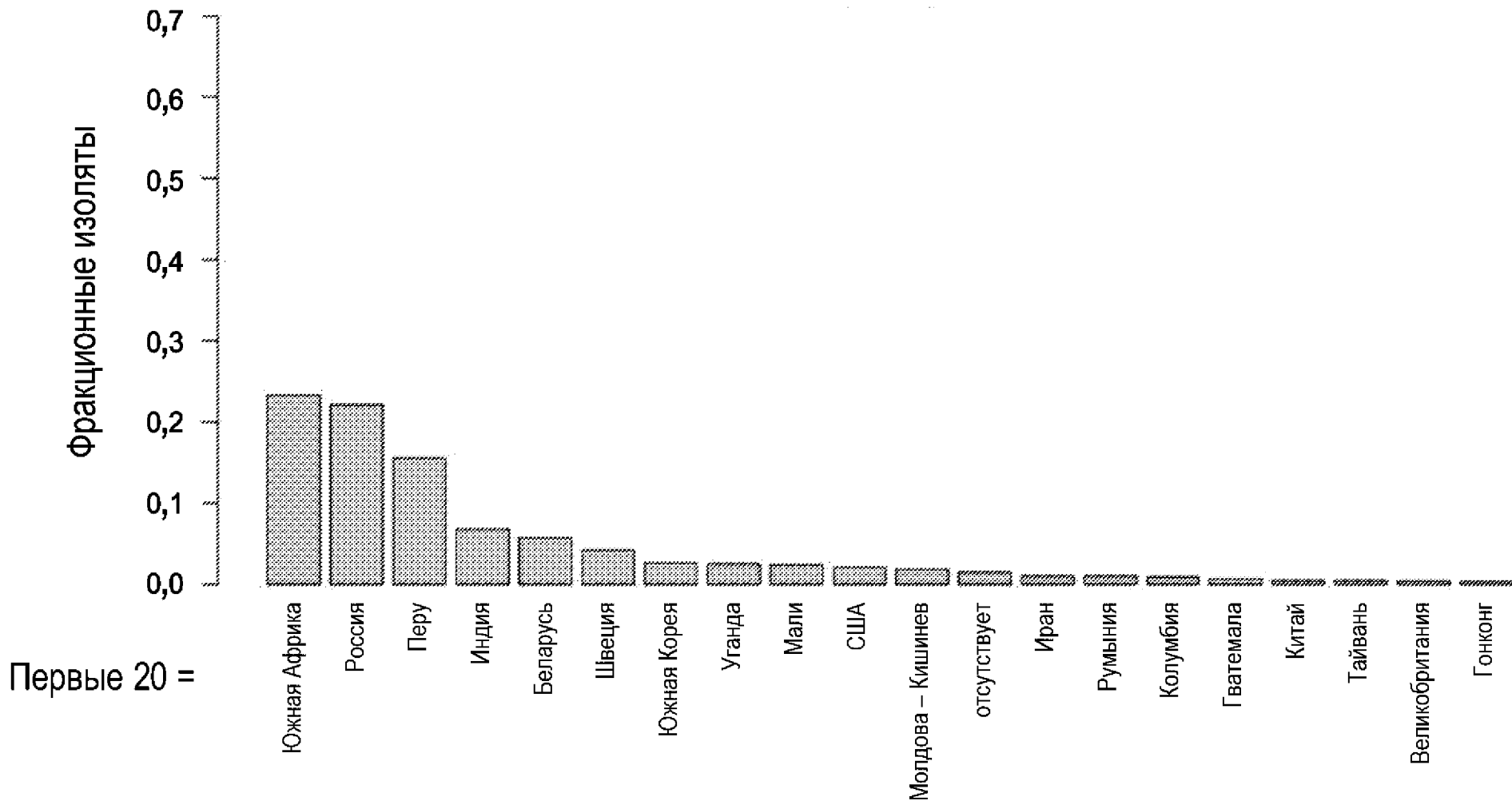
\*Изъятые изоляты с аннотацией «Rv0867c»: 4884 штамма/изолята, но минимальное число выровненных изолятов на позицию: 2840 штаммов/изолятов = много штаммов с намного меньшим белком

Фиг. 3

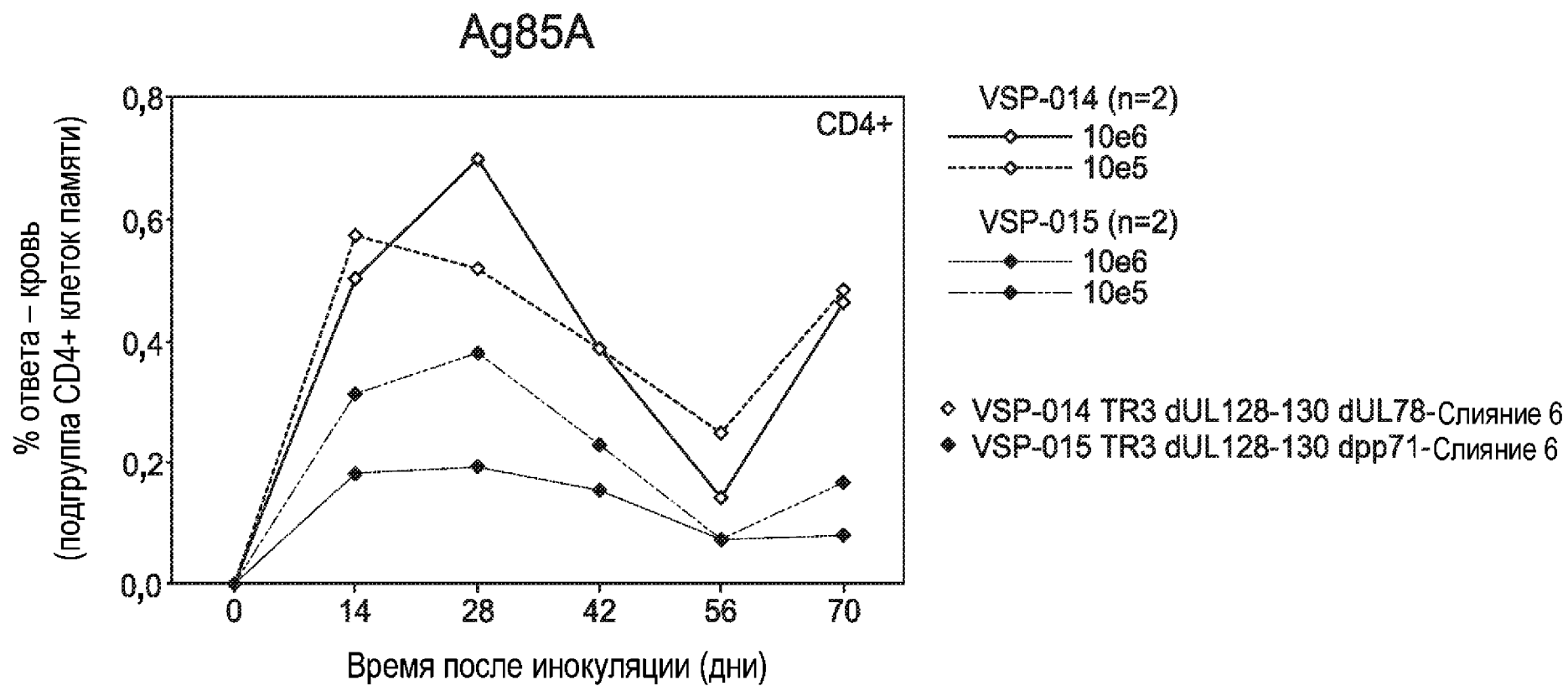


Фиг. 4

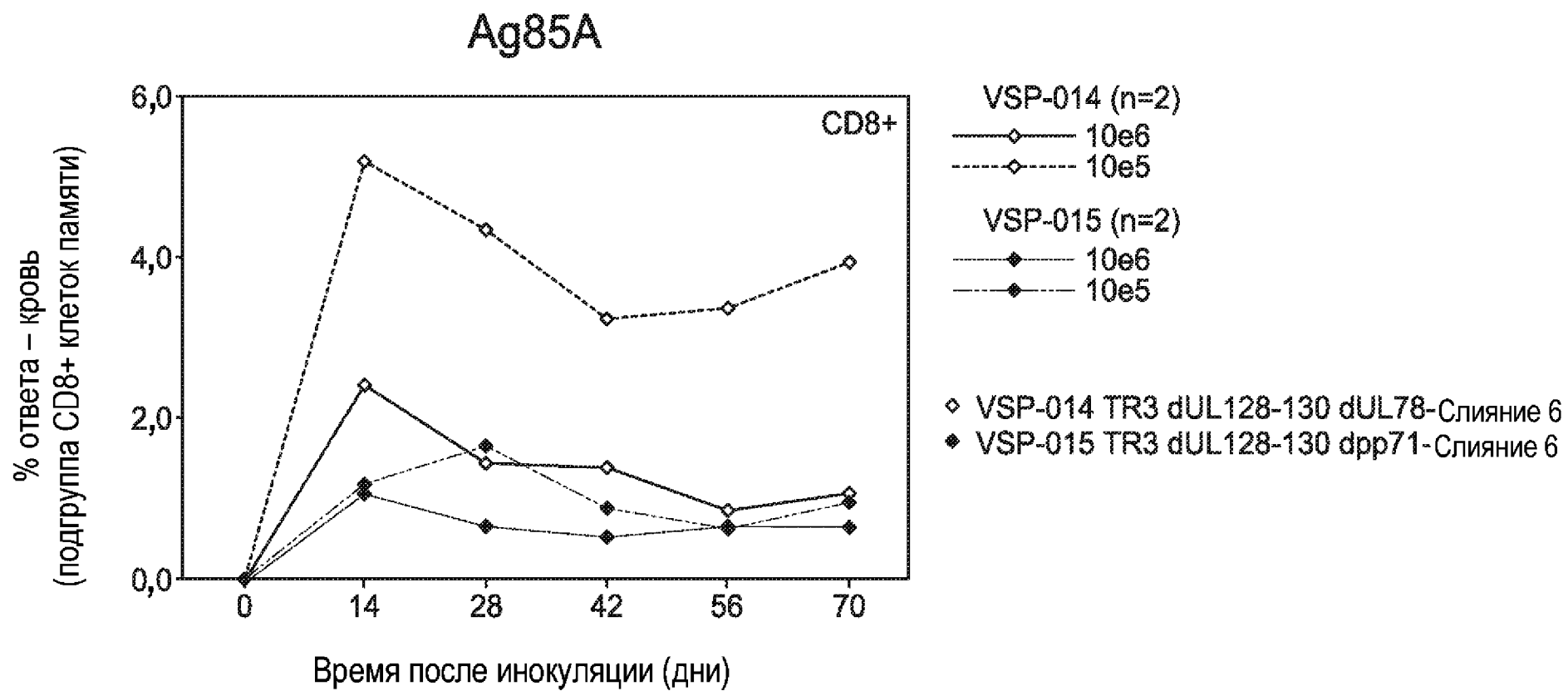
# Полноразмерный белок (N=2322)



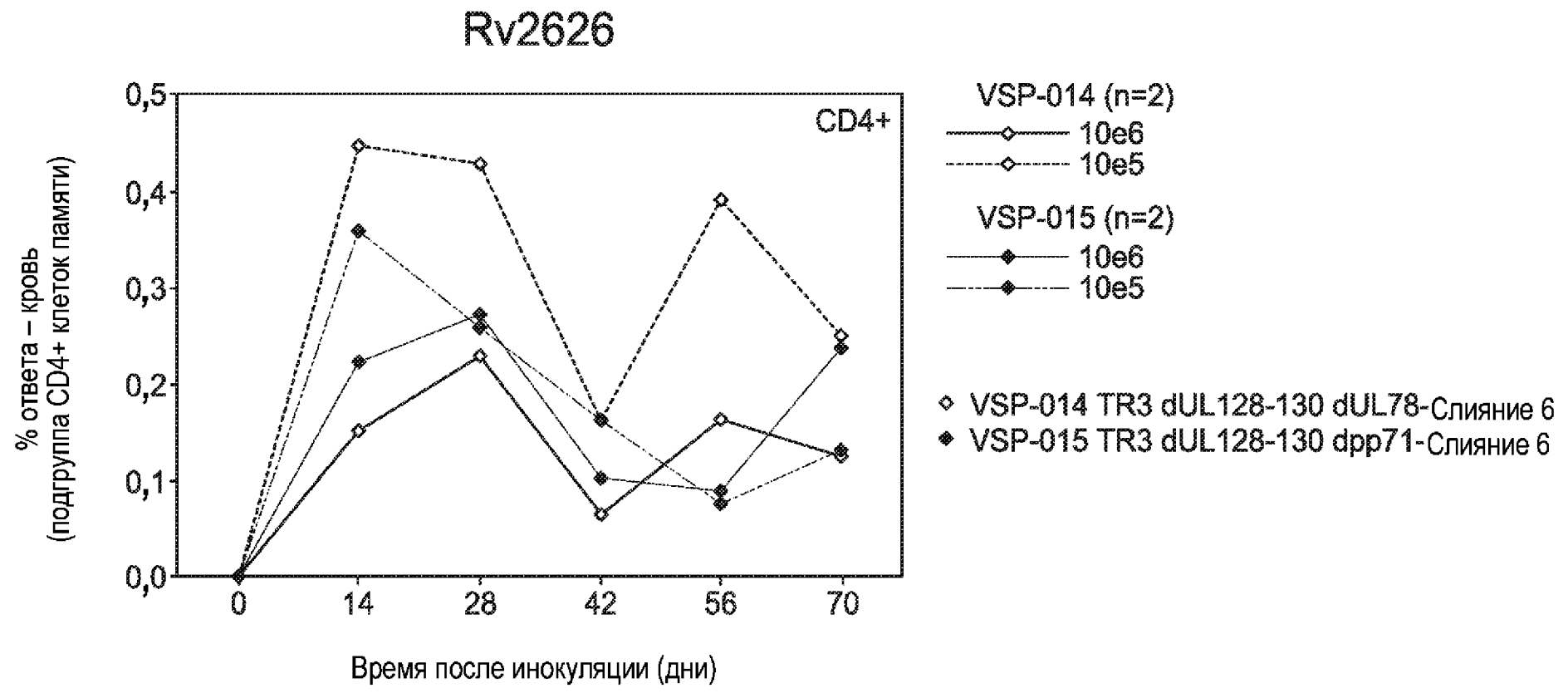
Фиг. 5



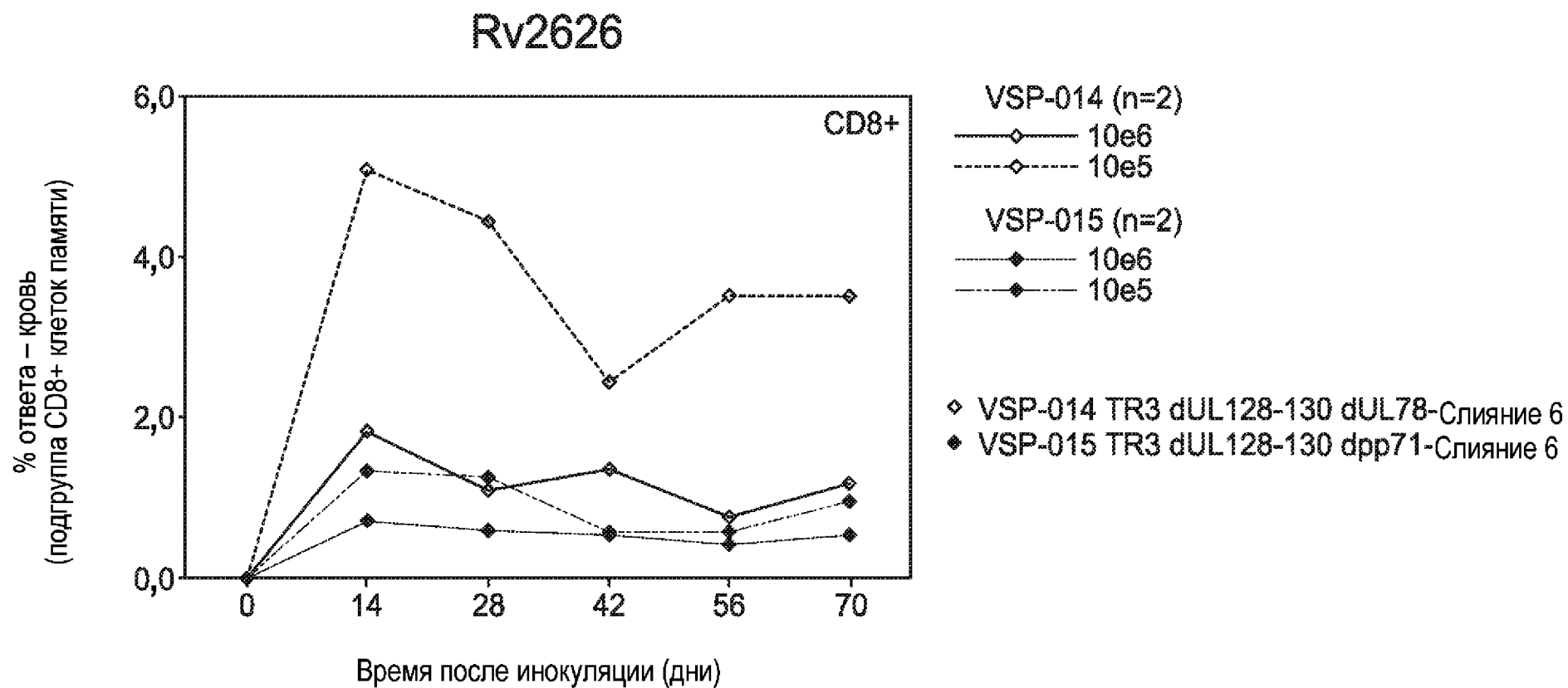
Фиг. 6А



Фиг. 6В



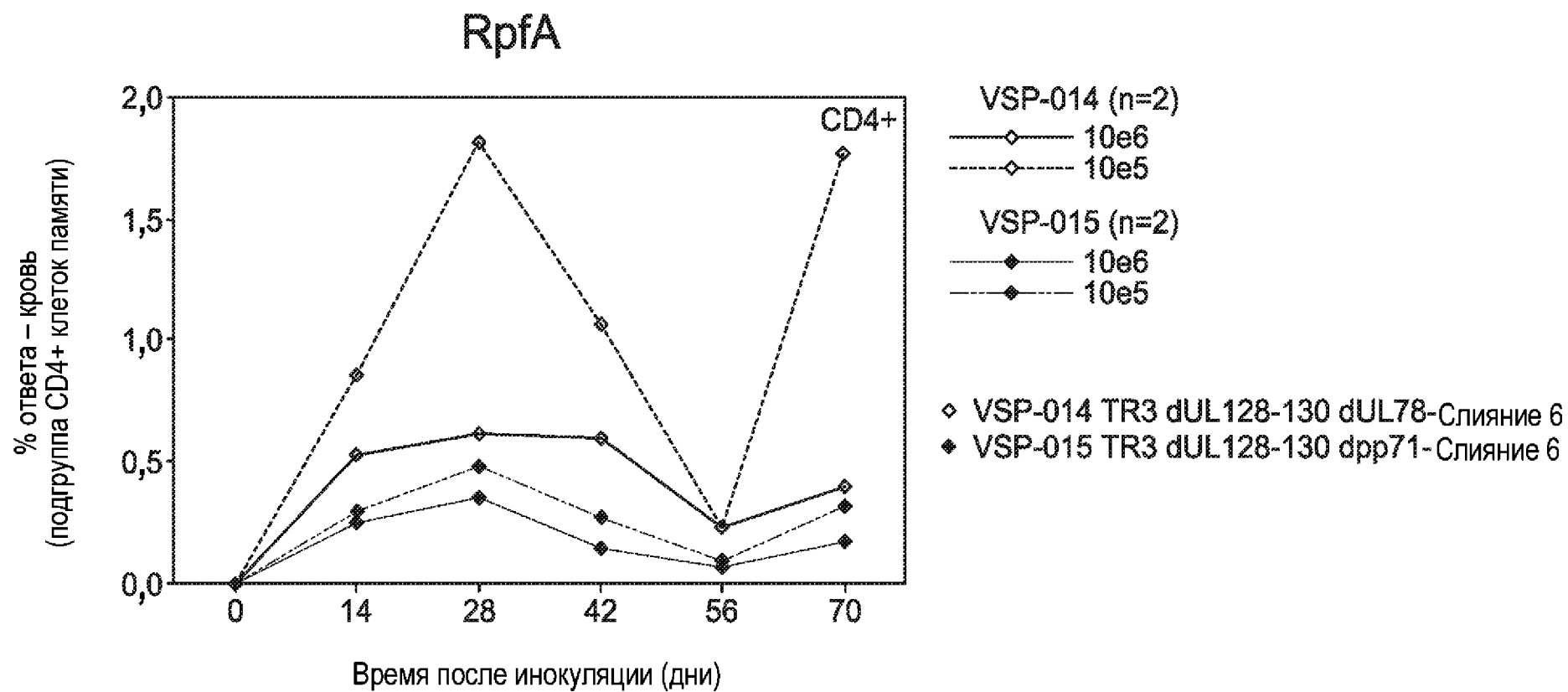
Фиг. 6С



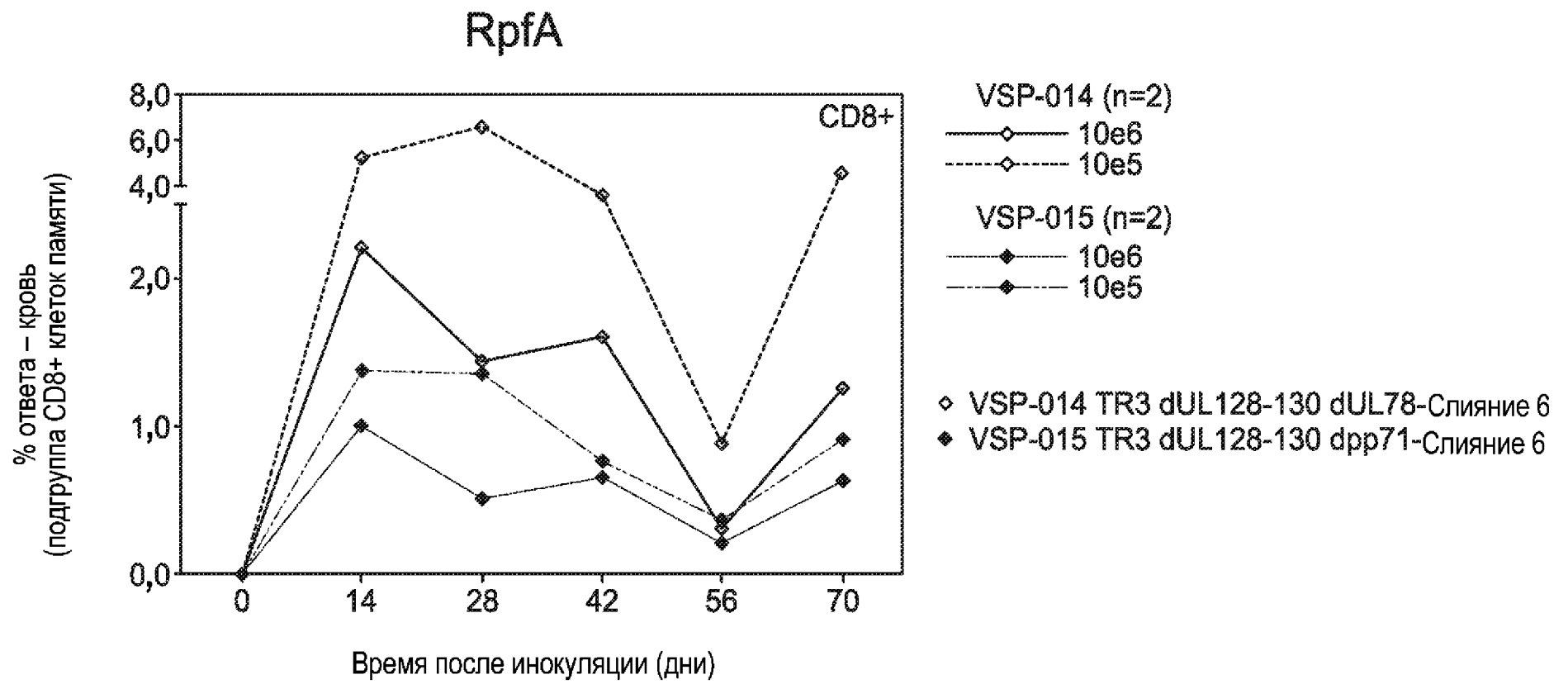
Фиг. 6D



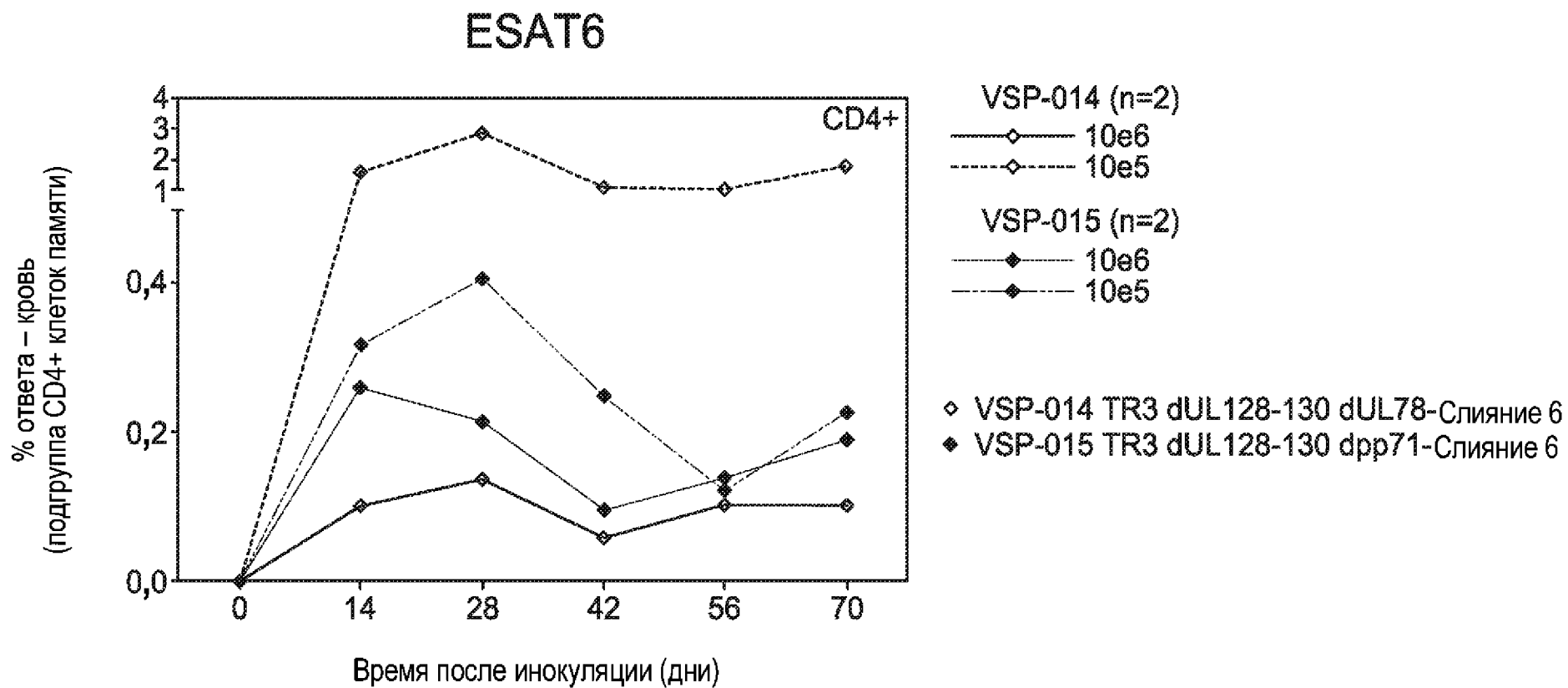
10/34



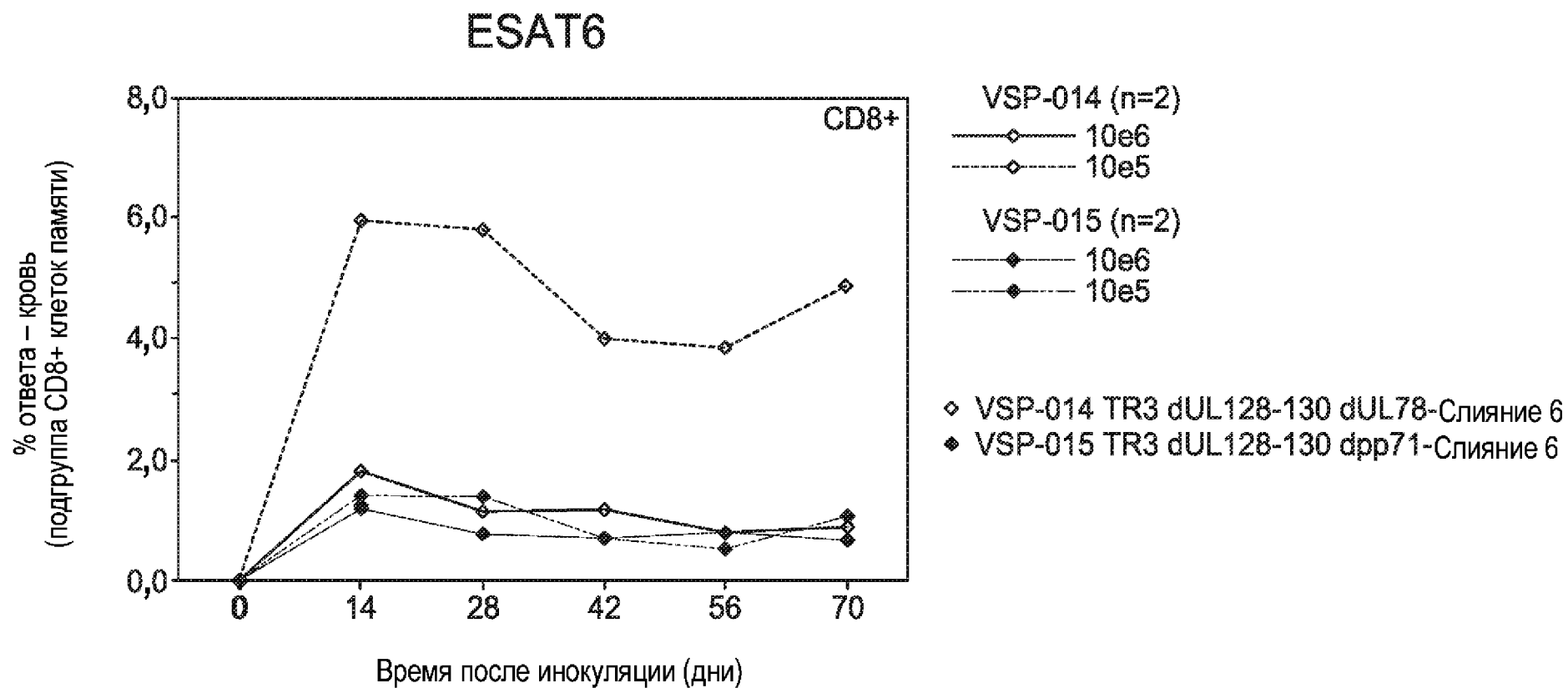
Фиг. 6Е



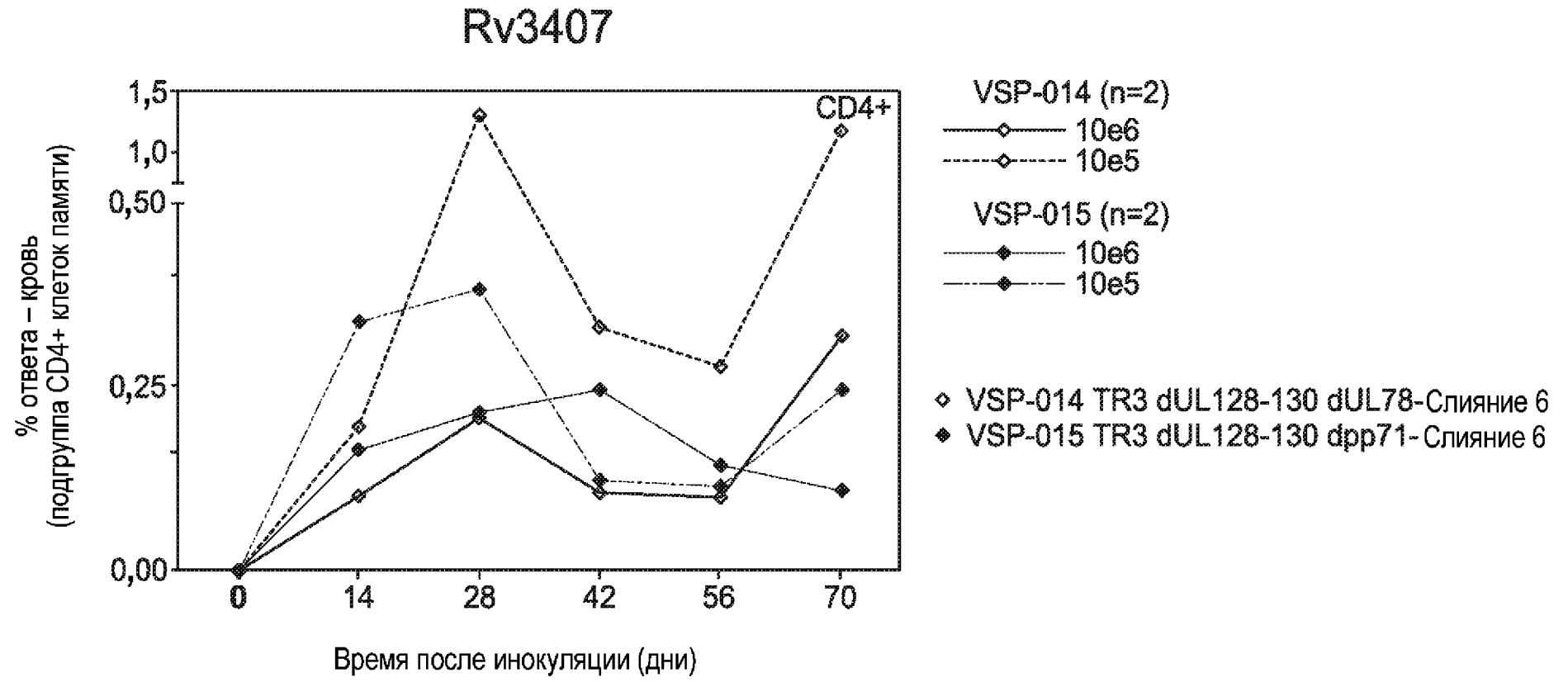
Фиг. 6F



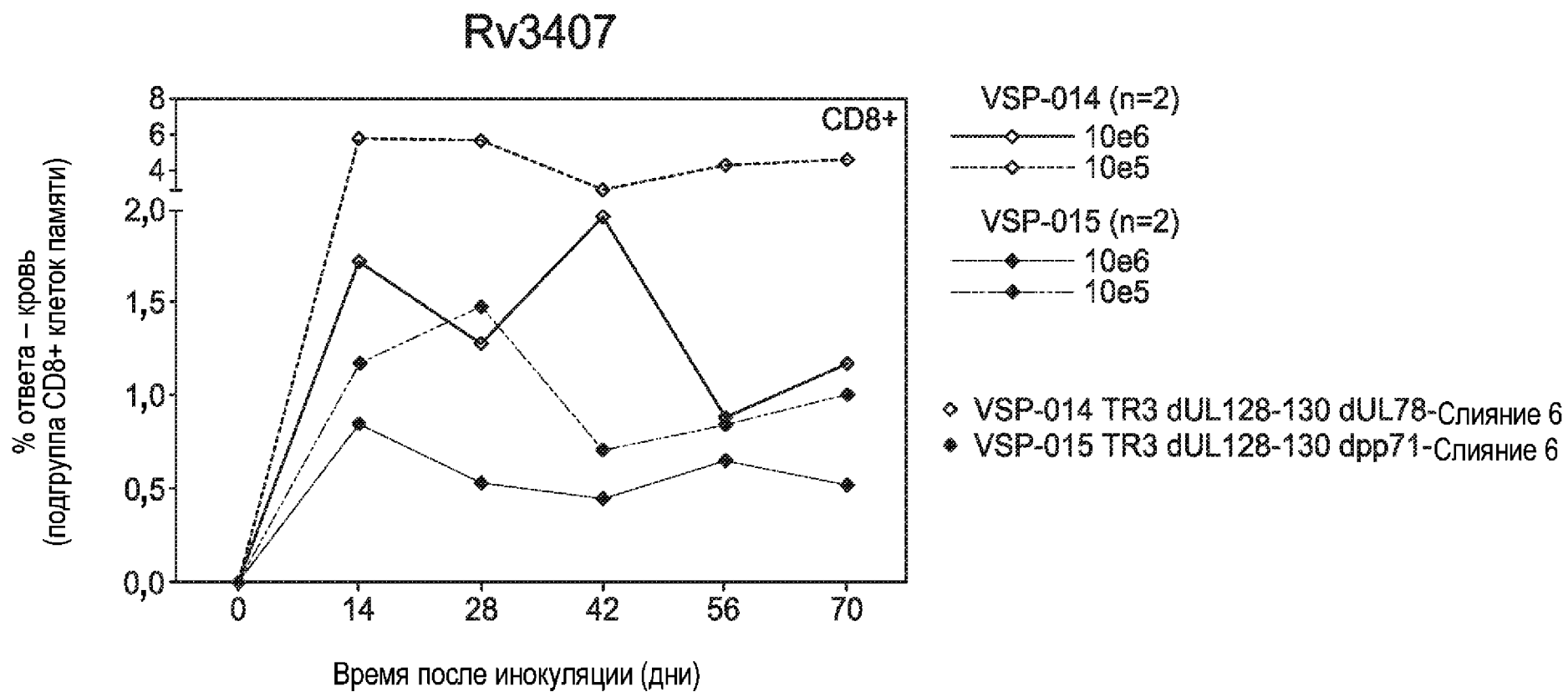
Фиг. 6G



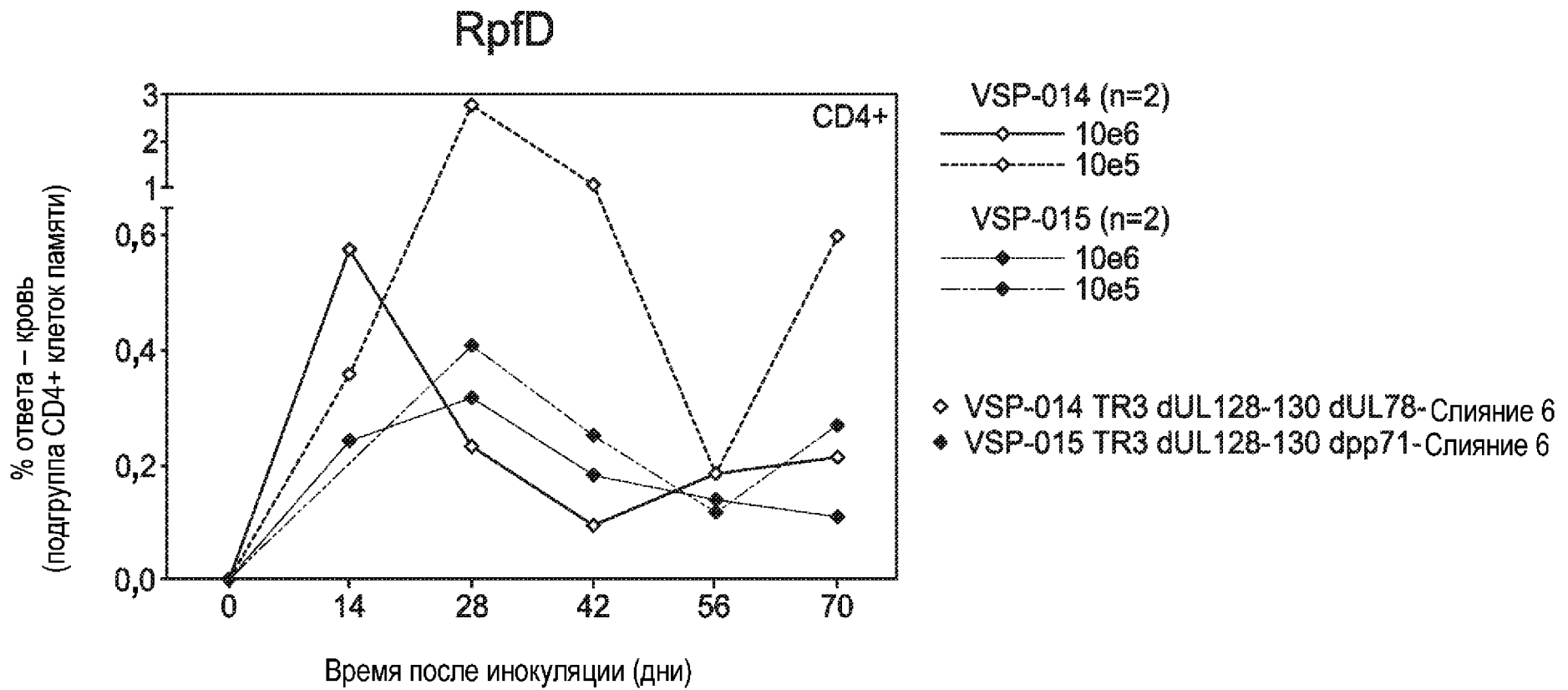
Фиг. 6H



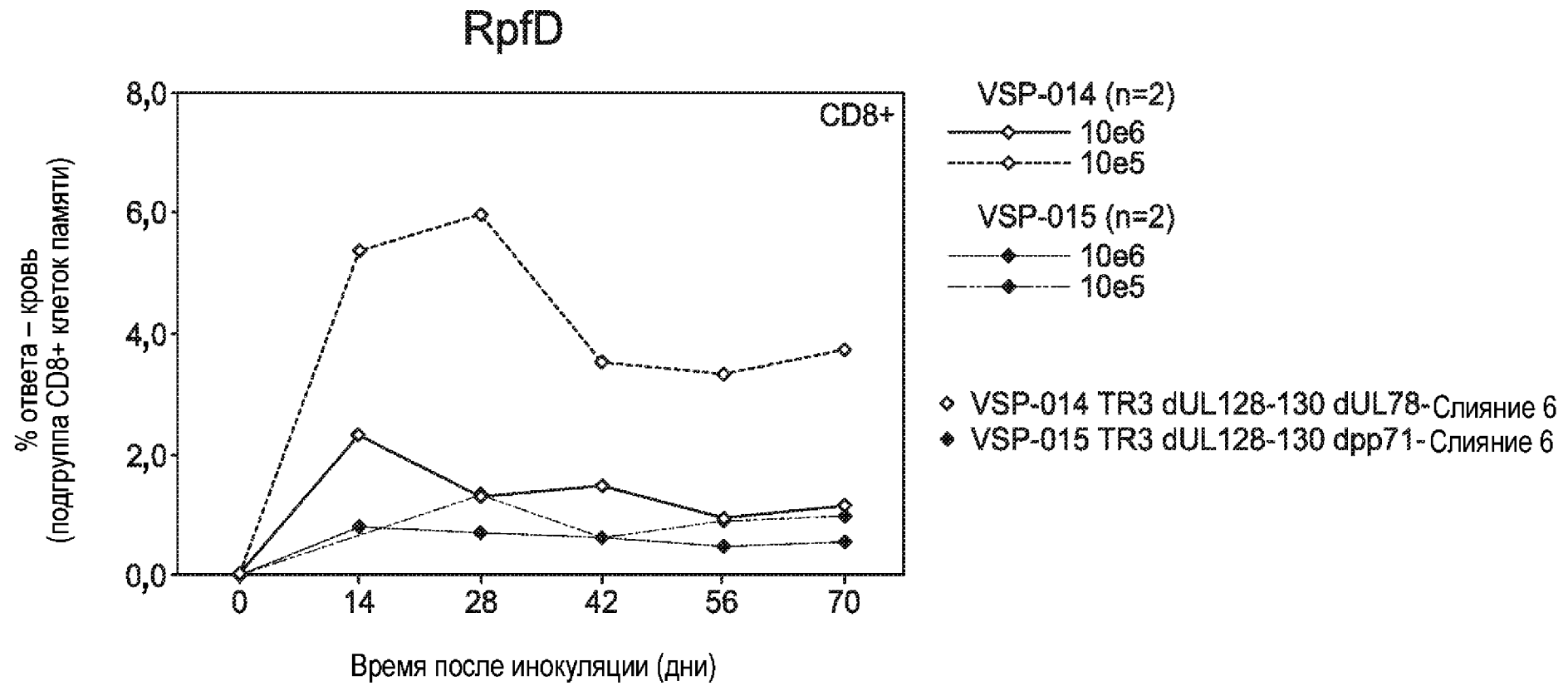
Фиг. 6I



Фиг. 6J

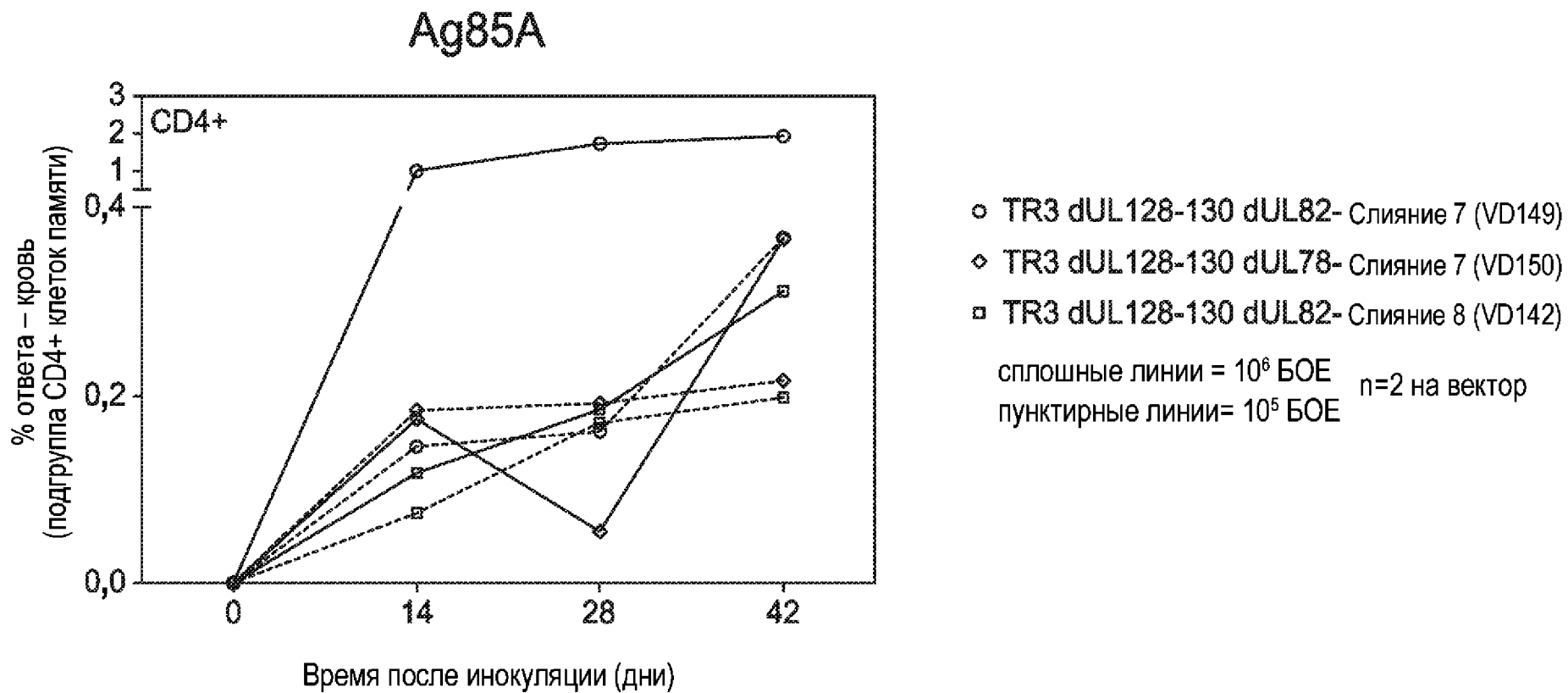


Фиг. 6К

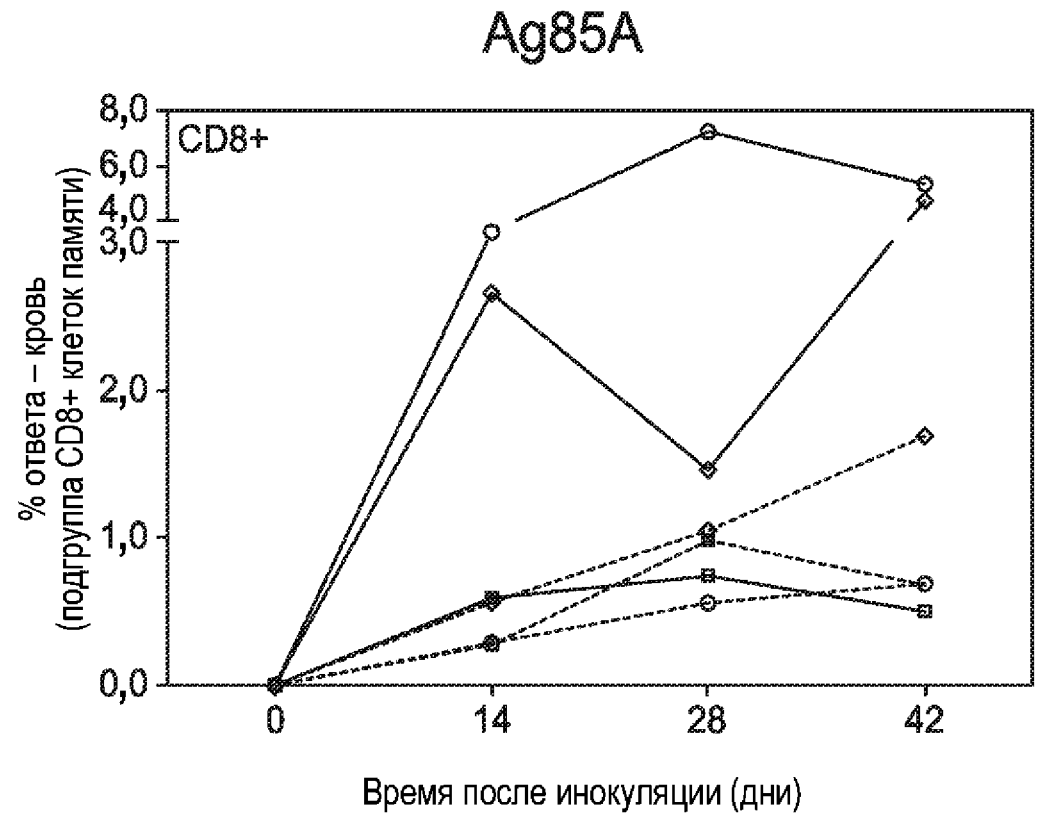


Фиг. 6L





Фиг. 7А

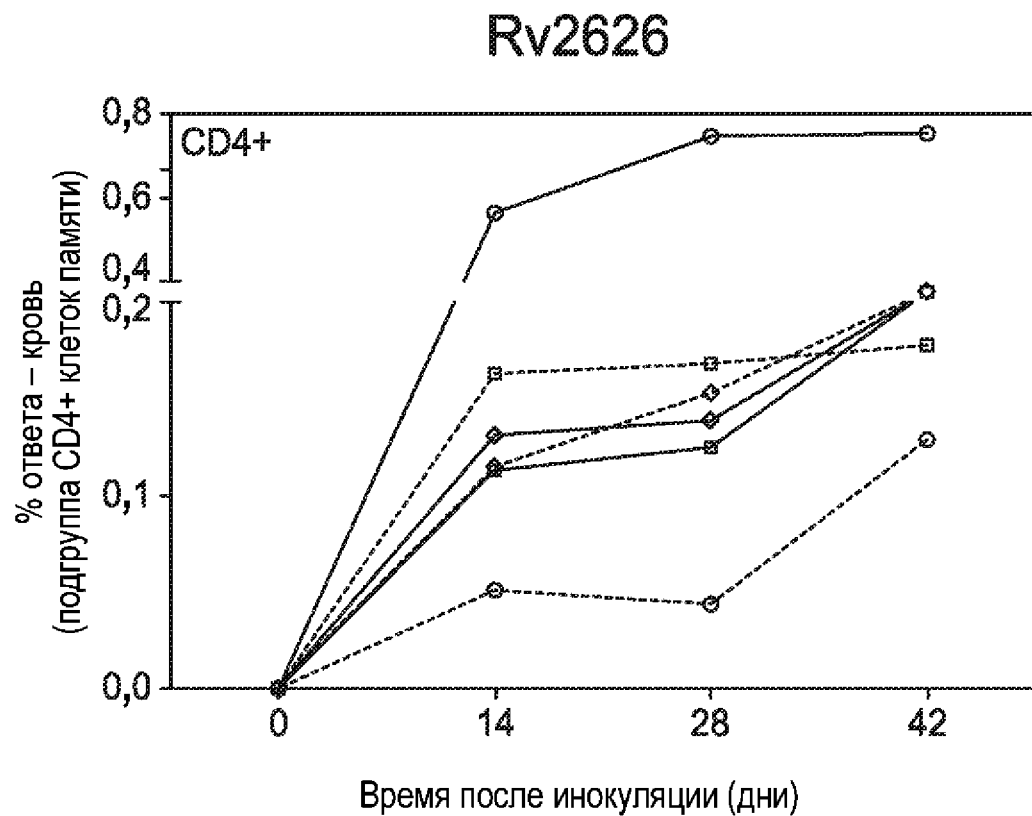


- TR3 dUL128-130 dUL82- Слияние 7 (VD149)
- ◇ TR3 dUL128-130 dUL78- Слияние 7 (VD150)
- TR3 dUL128-130 dUL82- Слияние 8 (VD142)

сплошные линии = 10<sup>6</sup> БОЕ    n=2 на вектор  
 пунктирные линии = 10<sup>5</sup> БОЕ

Фиг. 7В

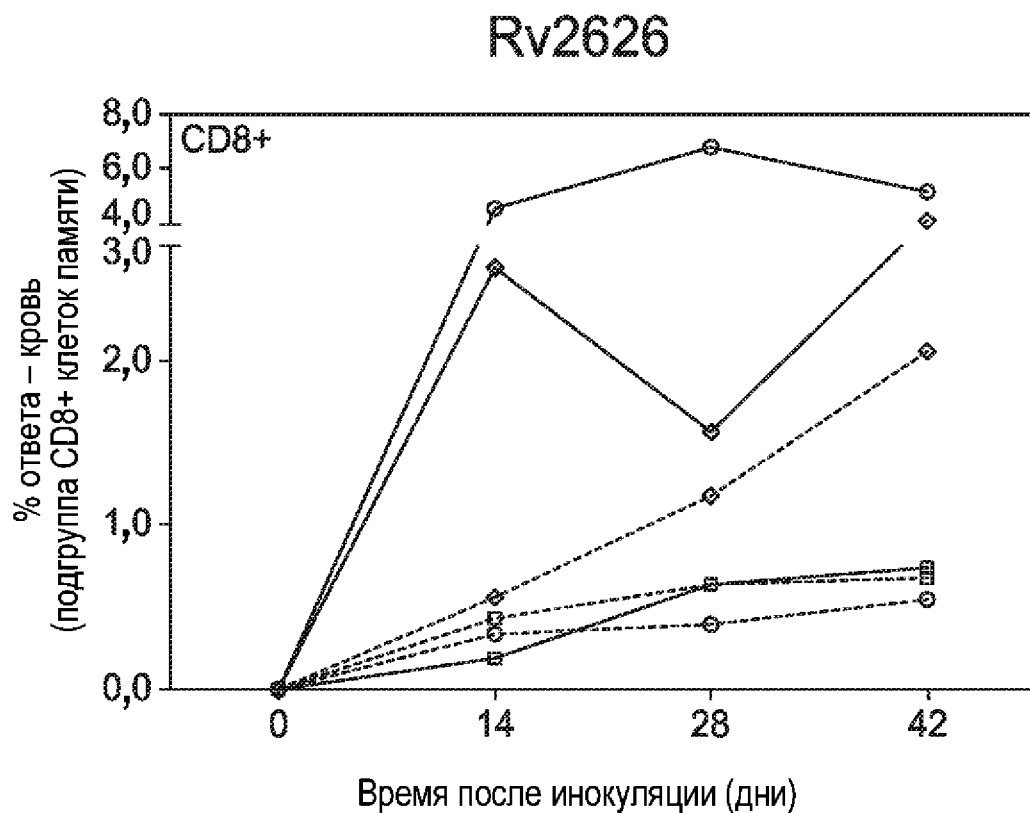
20/34



- TR3 dUL128-130 dUL82- Слияние 7 (VD149)
- ◇ TR3 dUL128-130 dUL78- Слияние 7 (VD150)
- TR3 dUL128-130 dUL82- Слияние 8 (VD142)

сплошные линии =  $10^6$  БОЕ    n=2 на вектор  
пунктирные линии =  $10^5$  БОЕ

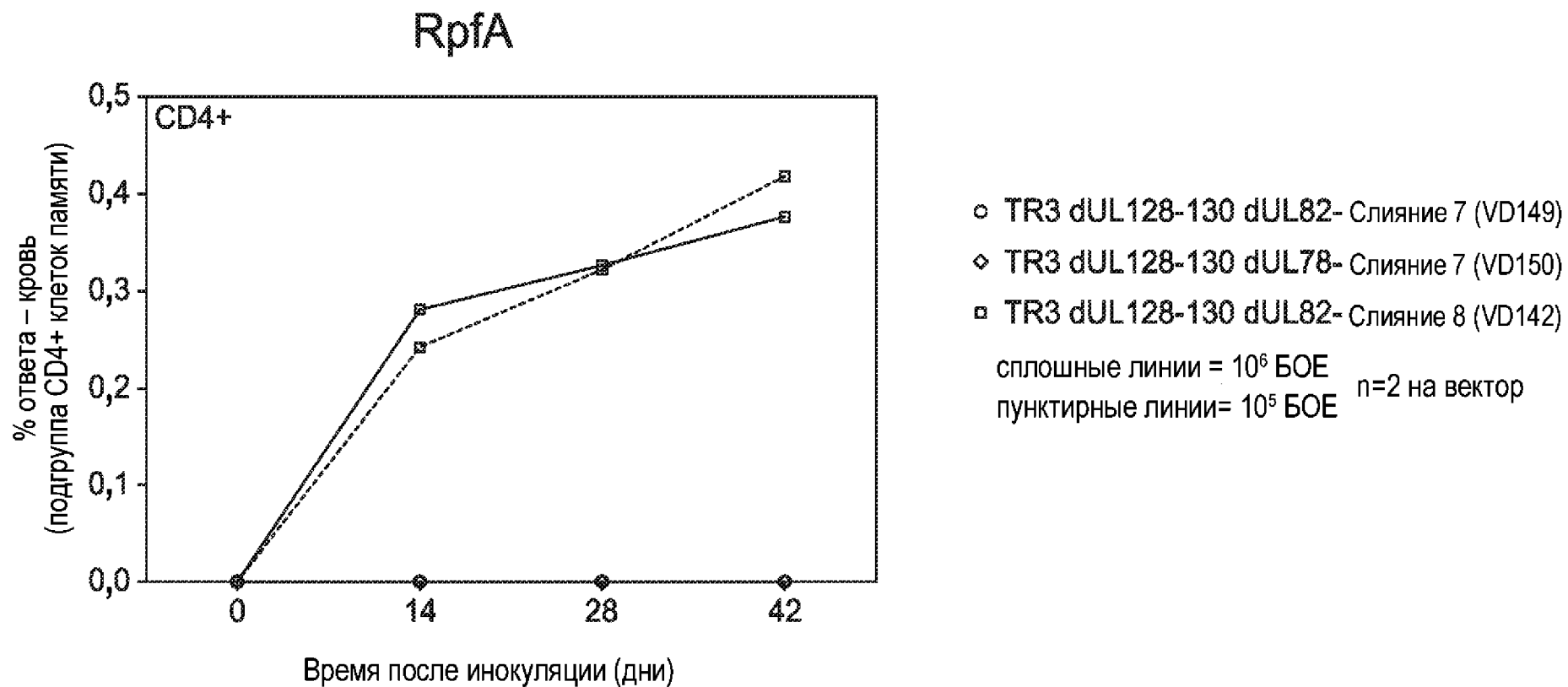
Фиг. 7С



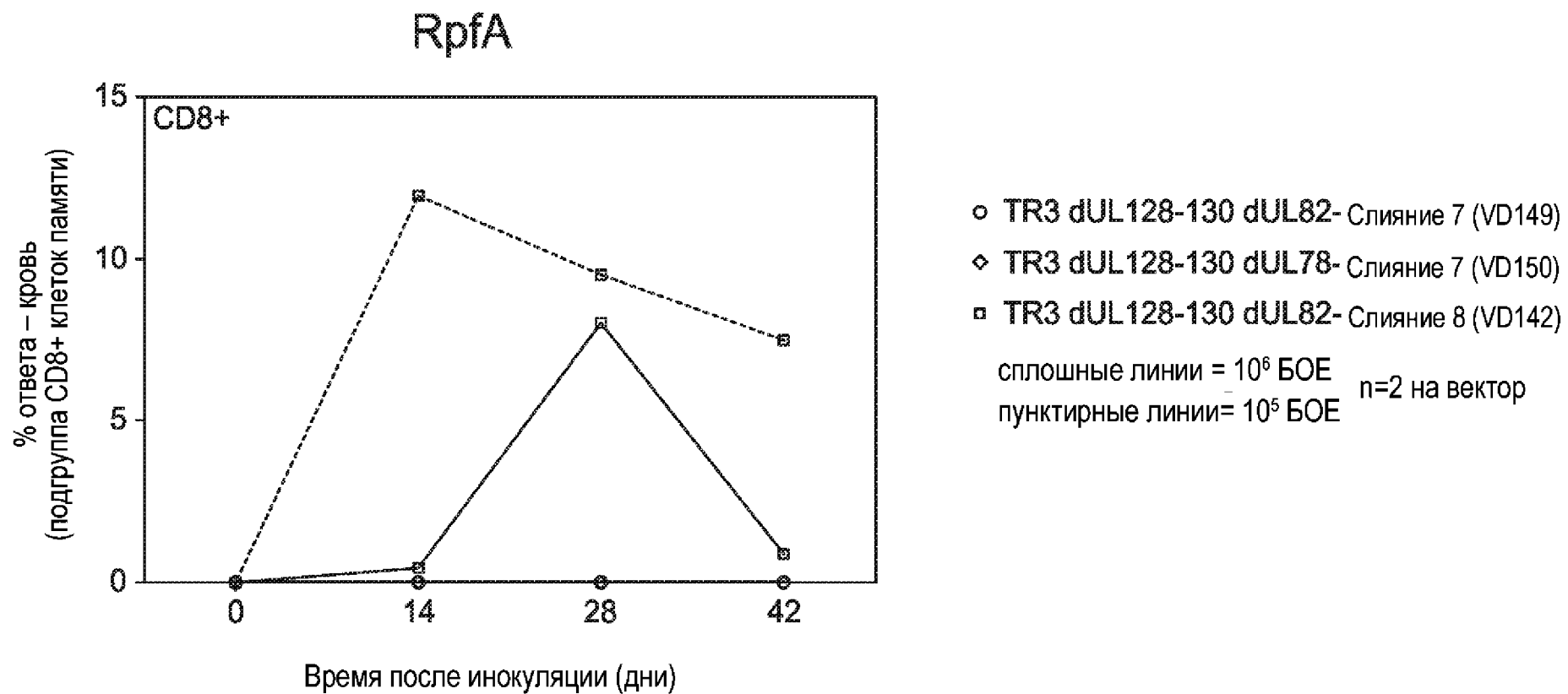
○ TR3 dUL128-130 dUL82-Слияние 7 (VD149)  
 ◇ TR3 dUL128-130 dUL78-Слияние 7 (VD150)  
 □ TR3 dUL128-130 dUL82-Слияние 8 (VD142)

сплошные линии = 10<sup>6</sup> БОЕ  
 пунктирные линии = 10<sup>5</sup> БОЕ    n=2 на вектор

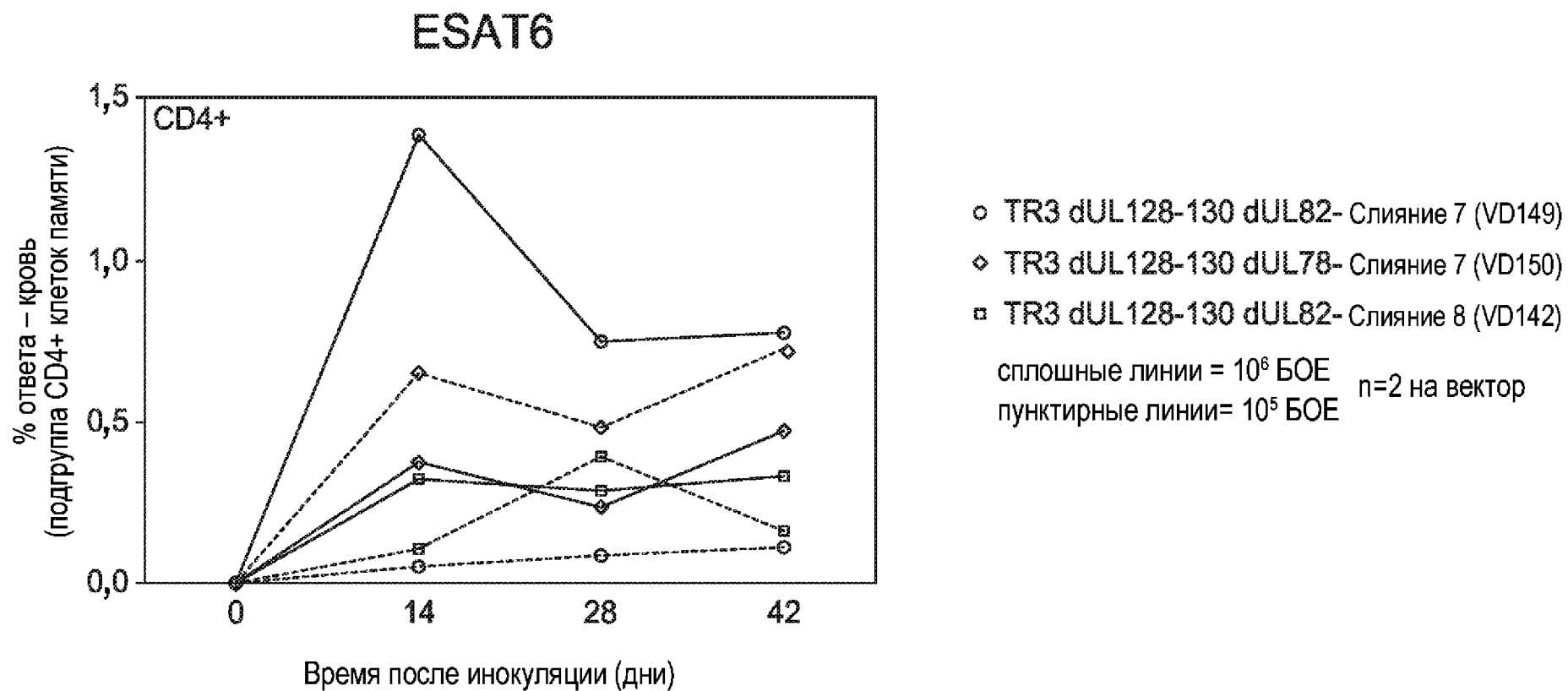
Фиг. 7D



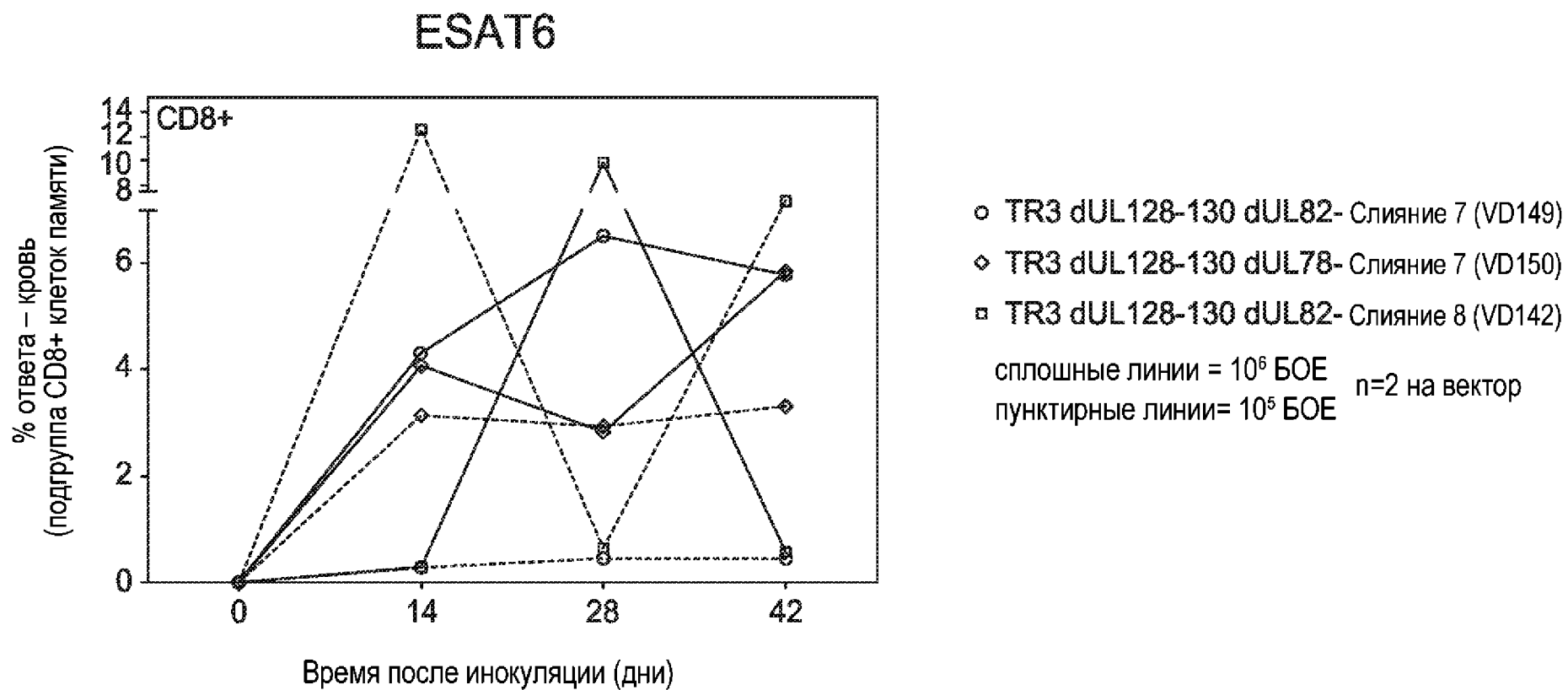
Фиг. 7E



Фиг. 7F

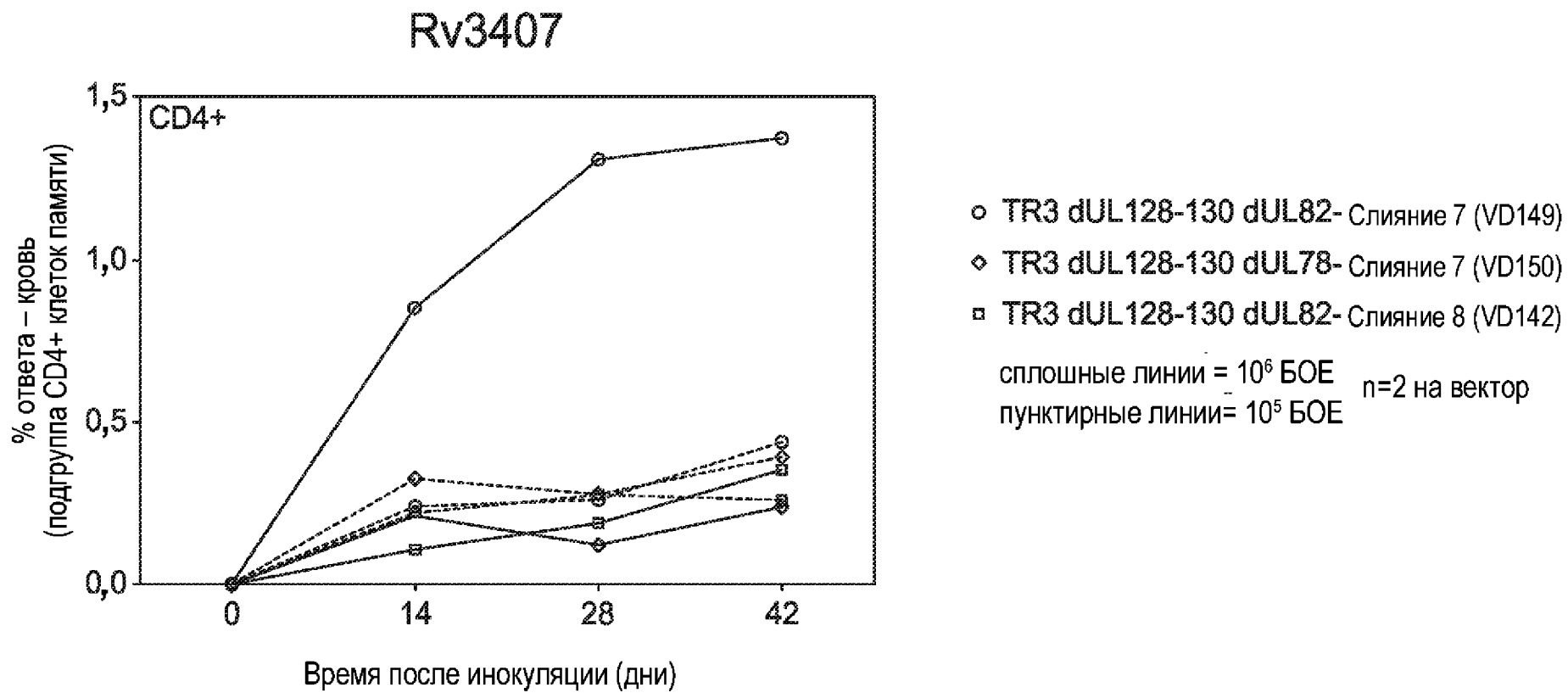


Фиг. 7G

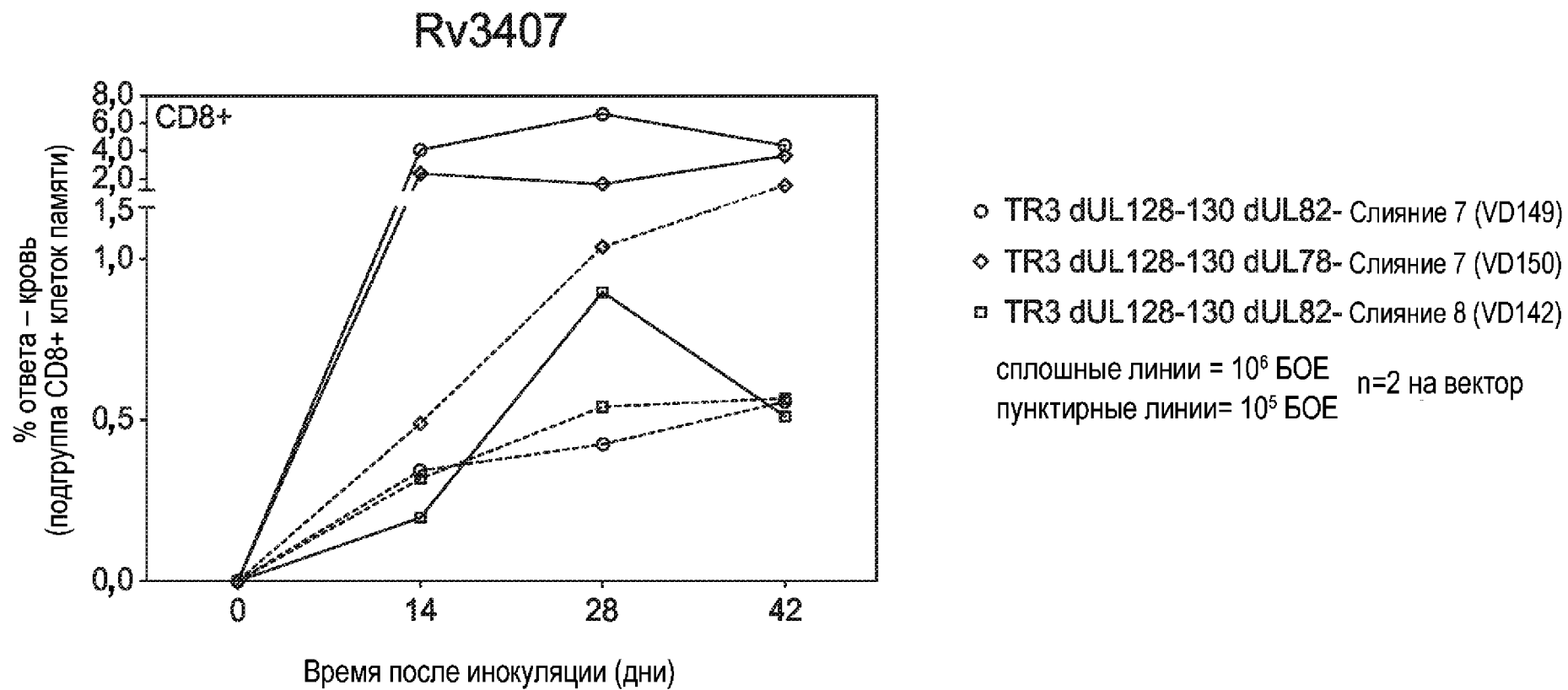


Фиг. 7H

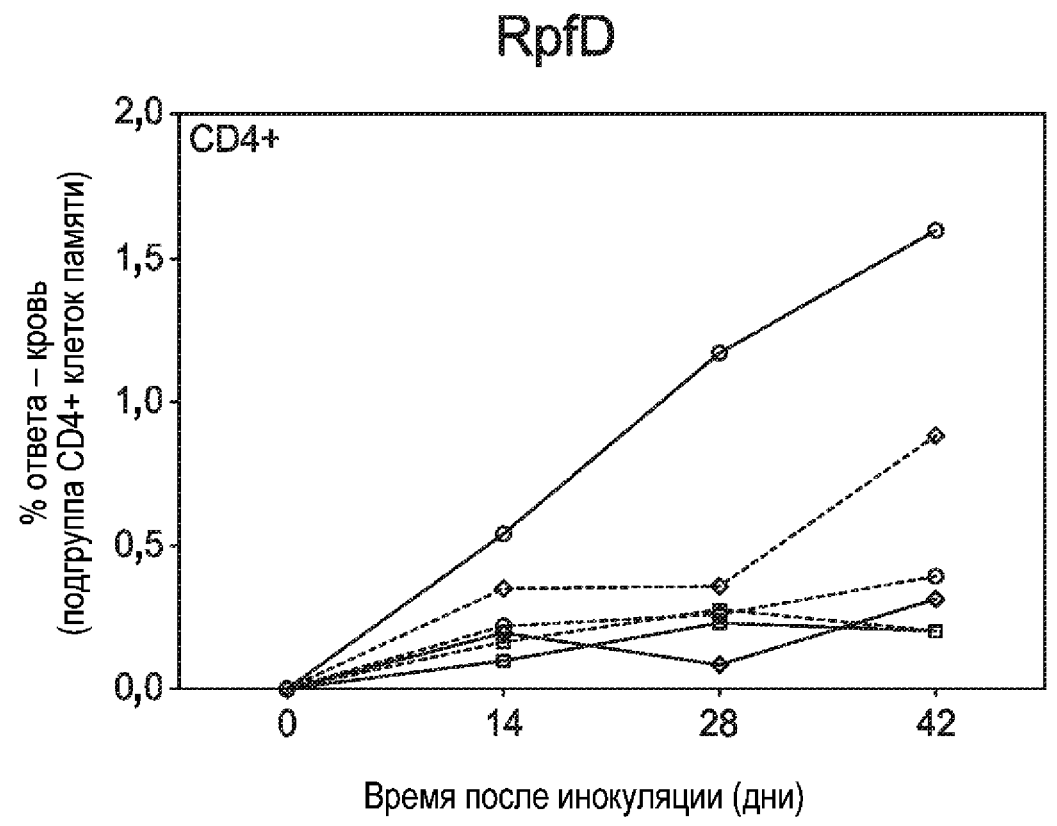




Фиг. 71

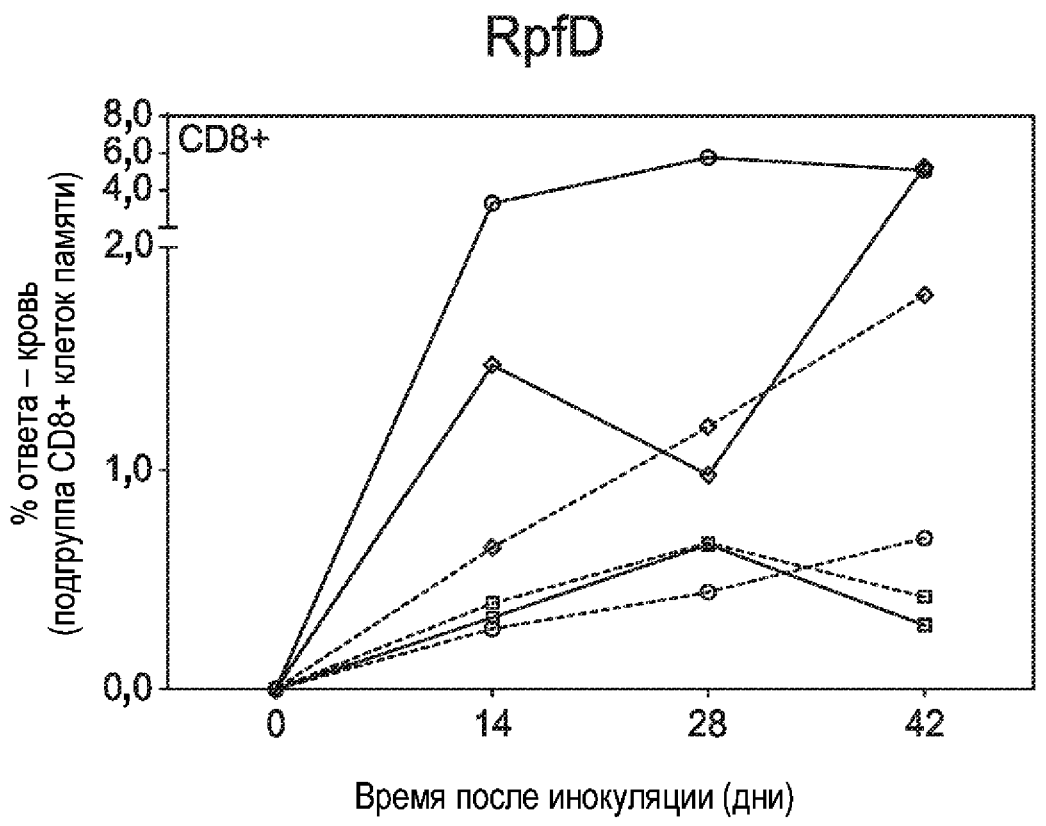


Фиг. 7J



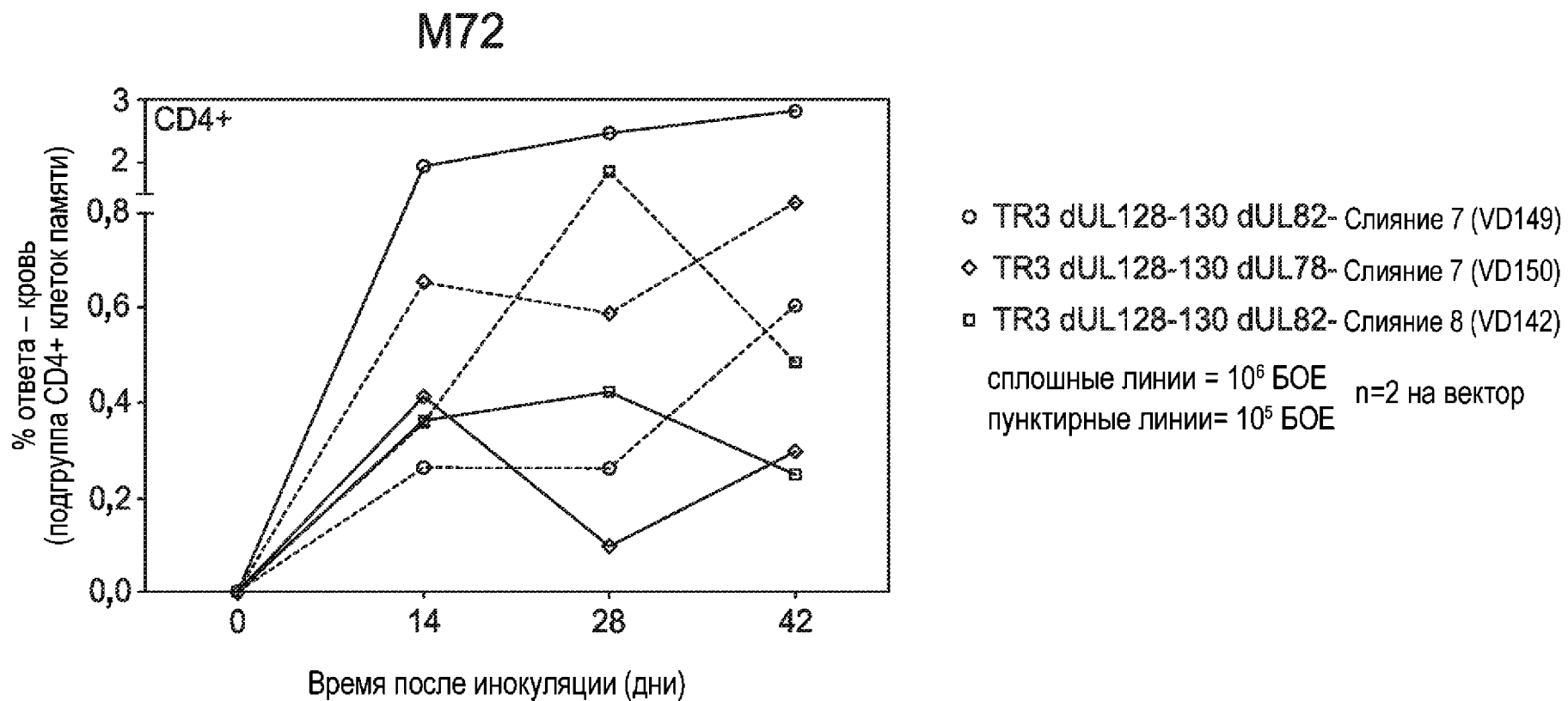
- TR3 dUL128-130 dUL82- Слияние 7 (VD149)
  - ◇ TR3 dUL128-130 dUL78- Слияние 7 (VD150)
  - TR3 dUL128-130 dUL82- Слияние 8 (VD142)
- сплошные линии =  $10^6$  БОЕ    n=2 на вектор  
пунктирные линии =  $10^5$  БОЕ

Фиг. 7К

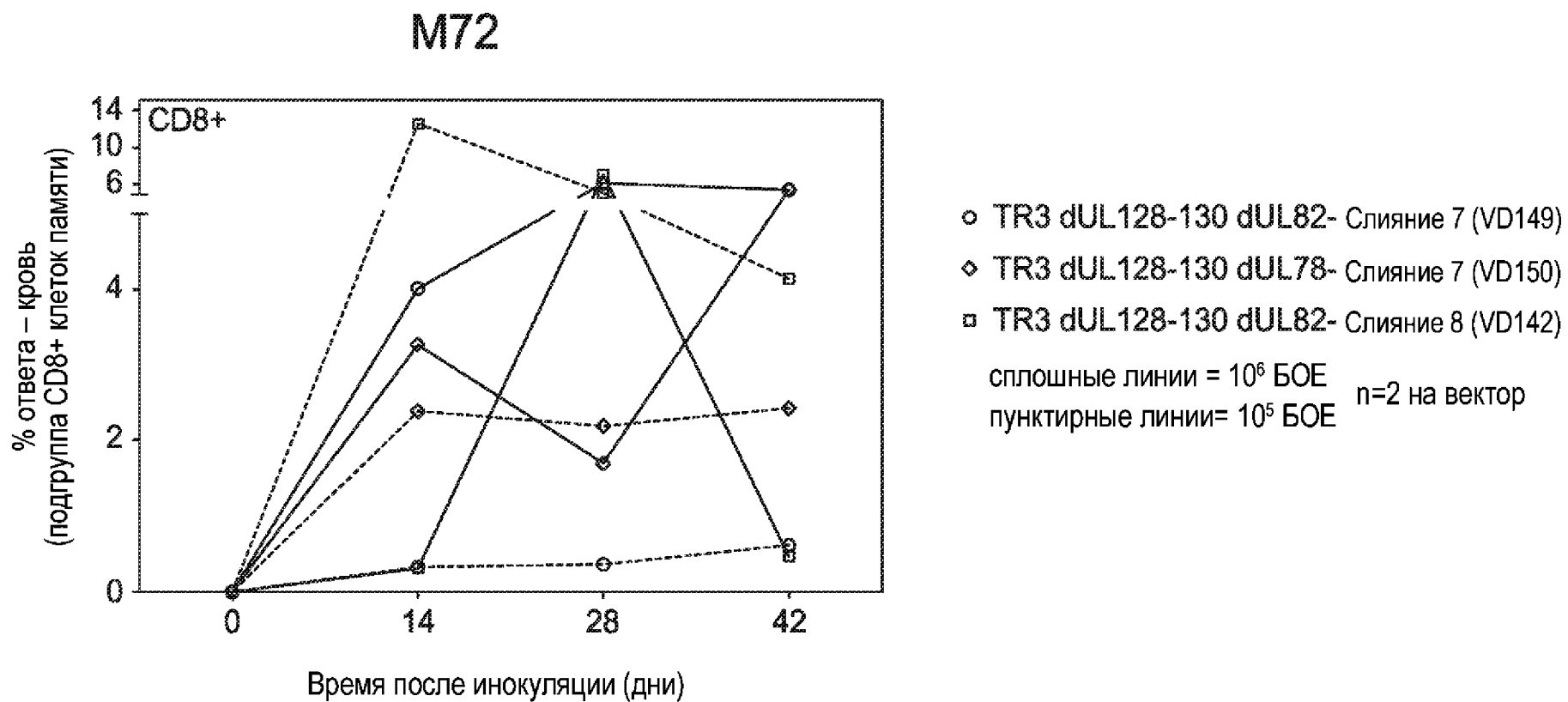


- TR3 dUL128-130 dUL82- Слияние 7 (VD149)
  - ◇ TR3 dUL128-130 dUL78- Слияние 7 (VD150)
  - TR3 dUL128-130 dUL82- Слияние 8 (VD142)
- сплошные линии = 10<sup>6</sup> БОЕ    n=2 на вектор  
пунктирные линии = 10<sup>5</sup> БОЕ

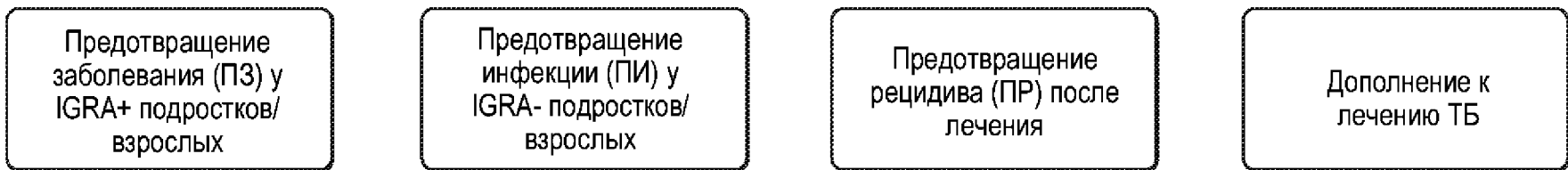
Фиг. 7L



Фиг. 7М



Фиг. 7N



32/34

Фиг. 8

Фаза 1 N = 10-100	Показание	Фаза 2 N = 1000	Фаза 3 N = от 1000 до 10000
CMV+ или CMV- BCG-/IGRA- (USA)	Предотвращение ТБ легких у подростков/ взрослых	Фаза 2 • Популяция: HIV-, Mtb- инфицированные (IGRA+) взрослые без признаков активного ТБ • Конечные точки: Иммуногенность и уменьшение частоты случаев активного ТБ легких (подтвержденного с помощью культивирования или теста Xpert)	Определяющее исследование ПЗ в эндемических областях
CMV+/BCG+/ IGRA+ ИЛИ IGRA- (эндемики)			
Подростки (эндемики)			
HIV + на ART (эндемики)			
Вакцинация			

Фиг. 9



34/34

Фаза 1 N = 10-100	Показание	Фаза 2a N = 1000	Фаза 3 N = от 1000 до 10000
CMV+ или CMV- BCG-/IGRA- (USA)	Предотвращение инфекции (ПИ)	Фаза 2a • HIV-, BCG+, IGRA- взрослые с высокой степенью риска • Конверсия IGRA	Определяющее исследование ПИ в популяции с высокой заболеваемостью
CMV+/ BCG+/ IGRA+ ИЛИ IGRA- (эндемики)			
Подростки (эндемики)	Предотвращение рецидива (ПР)	Фаза 2a • Иммуногенность/ определение дозы в конце лечения	Определяющее исследование ПР в эндемических областях
HIV + на ART (эндемики)		Фаза 2b • Иммуногенность/ уменьшение количества рецидивов	
Вакцинация			

Фиг. 10